



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E ANALGÉSICO DO
2-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZOL (2-
DMPI) EM CAMUNDONGOS**

TESE DE DOUTORADO

Jardel Gomes Villarinho

Santa Maria, RS, Brasil

2012

POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E ANALGÉSICO DO 2-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-4,5-DIIDRO-1*H*-IMIDAZOL (2-DMPI) EM CAMUNDONGOS

Jardel Gomes Villarinho

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia.**

Orientador: Dr. Juliano Ferreira

Co-orientadora: Dra. Roselei Fachinetto

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).

Villarinho, Jardel Gomes

POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E ANALGÉSICO DO 2-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZOL (2-DMPI) EM CAMUNDONGOS / Jardel Gomes Villarinho.-2012.

91 f.; 30cm

Orientador: Juliano Ferreira

Coorientador: Roselei Fachinetto

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Depressão 2. Inibidor reversível da MAO-A 3. Dor neuropática 4. Metabolismo de monoaminas I. Ferreira, Juliano II. Fachinetto, Roselei III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

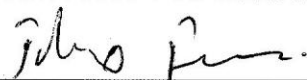
A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E ANALGÉSICO DO 2-(3,4-
DIMETOXI-FENIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZOL (2-DMPI) EM
CAMUNDONGOS**

elaborada por
Jardel Gomes Villarinho


como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:



**Juliano Ferreira, Dr.
(Presidente/Orientador)**



Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra. (UFSC)

Patrícia Dutra Saizem, Dra. (UNICRUZ)

Kátia Padilha Barreto, Dra. (UFSM)

Maria Rosa C. Schetinger, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 18 de dezembro de 2012.

Às duas mulheres da minha vida:
minha mãe, Araci (*in memoriam*), e
à minha companheira, Stela.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Juliano Ferreira, pela excelente orientação, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência e pela compreensão e, acima de tudo, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

À minha companheira, Stela, pelo amor, incentivo e compreensão. Sem o seu apoio e companheirismo certamente eu não teria chegado até aqui. Obrigado por estar sempre presente em minha caminhada.

À minha família por me ensinarem a acreditar nos meus sonhos. Gostaria de agradecer em especial à minha mãe Araci (*in memoriam*), que embora não possa estar presente aqui hoje, está sempre iluminando o meu caminho.

À minha co-orientadora, professora Roselei Fachinetto, pela amizade, incentivo e ensinamentos.

Aos meus colegas do LABNEURO pelos diversos aprendizados, pela convivência e pelos inúmeros momentos alegres que vivenciamos juntos. Agradeço em especial às colegas e amigas Kelly, Francielle e Sara, cuja ajuda foi imprescindível para a finalização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que de diferentes formas contribuíram para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização deste curso, bem como a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Os resultados que conseguimos na vida não são decorrência dos nossos sonhos, mas do comprometimento que temos com eles.”

(Evandro Mota)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E ANALGÉSICO DO 2-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZOL (2-DMPI) EM CAMUNDONGOS

Autor: Jardel Gomes Villarinho

Orientador: Juliano Ferreira

Co-orientadora: Roselei Fachinetto

Local e data da Defesa: Santa Maria, 18 de dezembro de 2012.

A depressão e a dor coexistem em muitos pacientes e podem ser moduladas pelos mesmos sistemas de neurotransmissores. Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado que antidepressivos da classe dos inibidores da enzima monoamina oxidase-A (MAO-A) apresentam efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor em animais experimentais, assim como ação analgésica em estudos clínicos. Em vista disso, no presente estudo foram avaliadas as propriedades inibitórias sobre a atividade da MAO-A, assim como os potenciais antidepressivo e antinociceptivo do novo composto imidazolínico 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1H-imidazol (2-DMPI) em camundongos. Foi observado que o 2-DMPI é um inibidor misto, reversível e preferencial da MAO-A. O tratamento com 2-DMPI (100-1000 µmol/kg, s.c.) produziu um efeito tipo-antidepressivo no teste de suspensão da cauda, sem afetar a atividade motora dos animais. Os camundongos tratados com 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c.) apresentaram uma diminuição na taxa de renovação da serotonina e da dopamina em regiões cerebrais específicas, sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo desse composto foi mediado pelos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico. Isto foi confirmado por experimentos que mostraram que o efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI foi abolido pelo pré-tratamento com antagonistas de receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos. A fim de avaliar um possível efeito antinociceptivo do 2-DMPI, foi utilizado um modelo de dor neuropática, induzida pela injúria por constrição crônica (CCI) do nervo ciático, em camundongos. Observou-se que os camundongos submetidos à CCI apresentaram um aumento na atividade da MAO-A na medula espinhal lombar comparado com os animais falso-operados e que o tratamento com 2-DMPI (30-300 µmol/kg, s.c.) reverteu a hiperalgesia mecânica induzida pela CCI. Além disso, o efeito antinociceptivo do 2-DMPI foi revertido pela administração intratecal do antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₃, ondansetrona (10 µg/sítio). Esses resultados sugerem que o 2-DMPI, devido à sua capacidade de modular a atividade da MAO-A e, conseqüentemente, os sistemas monoaminérgicos, parece ser um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antidepressiva e analgésica.

Palavras-chave: Depressão; Metabolismo de monoaminas; Dor neuropática; Inibidor reversível da MAO-A.

ABSTRACT

PhD thesis
Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ANTIDEPRESSANT AND ANALGESIC POTENTIAL OF 2-(3,4-DIMETHOXY-PHENYL)-4,5-DIHYDRO-1*H*-IMIDAZOLE (2-DMPI) IN MICE

Author: Jardel Gomes Villarinho

Advisor: Juliano Ferreira

Co-advisor: Roselei Fachinetto

Place and date: Santa Maria, December, 18th, 2012.

Depression and chronic pain coexist in several patients and may be modulated by the same neurotransmitter systems. In this context, various studies have demonstrated that antidepressants from the class of the inhibitors of monoamine oxidase-A (MAO-A) enzyme presented antinociceptive effect in different pain models in experimental animals, as well as analgesic action in clinic studies. Thus, in the present study were evaluated the MAO-A inhibitory properties, as well as the antidepressant and antinociceptive potential of the novel imidazoline compound 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazole (2-DMPI) in mice. 2-DMPI showed to be a mixed, reversible and preferential MAO-A inhibitor. The treatment with 2-DMPI (100-1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) produced an antidepressant-like effect in the tail suspension test without affecting motor activity of the animals. The mice treated with 2-DMPI showed a decrease in serotonin and dopamine turnover in specific brain regions, suggesting that the antidepressant-like effect of this compound was mediated by serotonergic and dopaminergic systems. This was confirmed by experiments showing that the antidepressant-like effect of 2-DMPI was abolished by pretreatment with serotonergic and dopaminergic receptor antagonists. In order to evaluate a possible antinociceptive action of 2-DMPI, a mice model of neuropathic pain, induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was used. It was observed that mice submitted to CCI presented an increase in MAO-A activity in lumbar spinal cord compared with sham-submitted mice and that the treatment with 2-DMPI (30-300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) reversed the CCI-induced mechanical hyperalgesia. Furthermore, the antihyperalgesic effect of 2-DMPI was reversed by intrathecal injection of the serotonergic 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (10 $\mu\text{g/site}$). These results suggest that 2-DMPI, due to its ability to modulate MAO-A activity and, consequently, the monoaminergic systems, could be a promising prototype to the development of new drugs with antidepressant and analgesic properties.

Keywords: Depression; Monoamine metabolism; Neuropathic pain; Reversible MAO-A inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

Tese

Figura 1 - Sintomas necessários para o diagnóstico da depressão de acordo com o Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais.....	03
Figura 2 - Reação de desaminação oxidativa de monoaminas catalisada pela enzima monoamina oxidase (MAO).....	07
Figura 3 - Mecanismo proposto para o efeito tipo-antidepressivo do 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol (2-DMPI) em camundongos.....	56
Figura 4 - Mecanismo proposto para o efeito antinociceptivo do 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol (2-DMPI) e da moclobemida em camundongos.....	60

Artigo

Fig. 1 - (A) Molecular structure of 2-DMPI. (B) Inhibitory potential of 2-DMPI on <i>in vitro</i> MAO-A and MAO-B activities in the mitochondrial fraction of mouse brain. (C) Substrate concentration curves for <i>in vitro</i> MAO-A activity in the absence or presence of 2-DMPI (10, 30 or 100 μ M) in the mitochondrial fraction of mouse brain. (D) Reversibility of MAO-A inhibition produced by 2-DMPI (30 μ M) after 24 h of dialysis.....	23
Fig. 2 - (A) Inhibitory potential of moclobemide on <i>in vitro</i> MAO-A and MAO-B activities in the mitochondrial fraction of mouse brain. (B) Effect of moclobemide administration (30-1000 μ mol/kg, s.c.) on immobility time in the TST in mice.....	24
Fig. 3 - Dose-response curve of subcutaneous (s.c.) 2-DMPI administration on immobility time in the TST in mice.....	24
Fig. 4 - Effects of 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c., 2 h before test), moclobemide (300 μ mol/kg, s.c., 1 h before test) or vehicle (10 mL/kg, s.c., 1 or 2 h before test) treatment on locomotor activity in the open field test in mice.....	25
Fig. 5 - Effects of 2-DMPI (300 or 1000 μ mol/kg, s.c., 2 h before testing; panels A or B, respectively), moclobemide (300 or 1000 μ mol/kg, s.c., 1 h before test; panels C or D, respectively) or vehicle (10 mL/kg, s.c., 1 or 2 h before test) treatment on the fall number in the rota-rod test in mice.....	25
Fig. 6 - Effects of 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c.), diazepam (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 mL/kg, s.c.) administration on anxiety-related behavior in the plus-maze test in mice.....	25

Fig. 7 - Monoamines and their metabolite levels in the hippocampus (panel A), cerebral cortex (panel B) and striatum (panel C) of mice treated with vehicle or 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.).....	26
Fig. 8 - Metabolite/monoamine ratios in the hippocampus (panel A), cerebral cortex (panel B) and striatum (panel C) of mice treated with vehicle or 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.).....	26
Fig. 9 - Effect of pretreatment of mice with methysergide (2 mg/kg, s.c.; panel A), WAY10635 (0.1 mg/kg, s.c.; panel B) or haloperidol (0.05 mg/kg, i.p.; panel C) on the anti-immobility effect of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) in the TST.....	27

Manuscrito

Fig. 1 - Effect of moclobemide treatment on mechanical nociceptive threshold in a mice neuropathic pain model	47
Fig. 2 - Effect of 2-DMPI treatment on mechanical nociceptive threshold in a mice neuropathic pain model.....	48
Fig. 3 - Monoamine oxidase-A (MAO-A) activity in the lumbar spinal cord, cerebral cortex and striatum of sham-operated or chronic constriction injury (CCI)-submitted mice.....	49
Fig. 4 - Effects of intrathecal treatment with the 5-HT ₃ receptor antagonist ondansetron (10 $\mu\text{g/site}$; 90 min after s.c. treatment) or phosphate buffered saline (PBS) on the antihyperalgesic effect of the reversible MAO-A inhibitors (A) moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$) and (B) 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$), administered subcutaneously 2 h before the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) measurement, in chronic constriction injury (CCI)-submitted mice.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CCI	Injúria por constrição crônica
DA	Dopamina
DHPG	Diidroxifenilglicol
DI ₅₀	Dose inibitória 50%
2-DMPI	2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina
TNF	Teste do nado forçado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
HVA	Ácido homovanílico
IMAOs	Inibidores da monoamina oxidase
I _{max}	Inibição máxima
MAO	Monoamina oxidase
NA	Noradrenalina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(dipropilamino)-tetralina
SNC	Sistema nervoso central
SNRIs	inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
SSRIs	inibidores seletivos da recaptção de serotonina
TNF	Teste do nado forçado
TSC	Teste de suspensão da cauda

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Depressão.....	02
1.2. Inibidores da enzima monoamina oxidase.....	06
1.3. Dor.....	09
1.4. Antidepressivos e o tratamento da dor.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Artigo: Efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI em camundongos.....	20
3.2. Manuscrito: Efeito antinociceptivo do 2-DMPI em um modelo de dor neuropática.....	30
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÕES.....	63
6. PERSPECTIVAS.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão pode ser caracterizada como um distúrbio heterogêneo que se manifesta frequentemente com sintomas nos níveis psicológico, comportamental e fisiológico. Ela é uma doença crônica e com forte componente hereditário, e estimativas indicam que aproximadamente 20% da população mundial venha a apresentar depressão ao longo da vida. Embora alguns estudos sugiram que os fatores genéticos sejam responsáveis por 40 a 50% do risco de uma pessoa vir a desenvolver depressão, os genes específicos responsáveis por essa patologia ainda não foram identificados. Apesar de os outros 50 a 60% de riscos não genéticos ainda permanecerem pouco conhecidos, há estudos que sugerem que traumas na infância, estresse emocional, doenças físicas e mesmo infecções virais poderiam estar envolvidos (BERTON & NESTLER, 2006). Além disso, a depressão é mais prevalente em mulheres do que em homens, podendo a razão mulheres:homens chegar a 5:2 (WONG & LICINIO, 2001).

De acordo com a quarta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (DMS-IV, do inglês "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - fourth edition"), o diagnóstico da depressão requer a presença de diversos sintomas (Figura 1). O paciente deve apresentar uma alteração no humor, caracterizado como um humor deprimido ou irritável, ou a perda de interesse por atividades prazerosas (anedonia/apatia), acompanhada por pelo menos quatro dos seguintes sintomas: alterações do peso/apetite, distúrbios no sono (insônia ou hipersonia), agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de culpa, desvalia ou inutilidade, dificuldade de concentração ou pensamento e pensamentos suicidas recorrentes. Essas mudanças devem durar ao menos duas semanas e interferir consideravelmente nas atividades profissionais e nas relações pessoais do indivíduo.

De maneira geral, as síndromes depressivas podem ser classificadas em dois tipos distintos, que são a depressão unipolar (depressão maior), na qual as oscilações do humor são sempre na mesma direção, e a depressão bipolar (doença maníaco-depressiva), na qual a depressão se alterna com a mania (BRUNTON *et al.*, 2012). A depressão unipolar, também denominada como depressão reativa, é comumente não familiar (cerca de 75% dos casos) e associada a eventos estressantes da vida, podendo estar acompanhada por sintomas de ansiedade e

agitação. Outros casos de depressão (cerca de 25%) mostram um padrão familiar e não estão relacionados a fatores externos, sendo muitas vezes denominados de depressão endógena (RANG *et al.*, 2007).



Figura 1. Sintomas necessários para o diagnóstico da depressão de acordo com o Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (Fonte: STAHL, 2010).

Embora não se tenha identificado uma região cerebral específica associada à depressão, indícios crescentes têm relacionado certas regiões cerebrais com diversos sintomas da depressão. O hipocampo e as regiões frontais do córtex cerebral parecem estar associadas com anormalidades cognitivas, enquanto que alterações no apetite, no sono e no ritmo circadiano sugerem também um envolvimento do hipotálamo. Um papel para as vias de recompensa cerebral, como os neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e suas regiões alvos, em especial o *nucleus accumbens*, também tem sido proposto baseado na prevalência de anedonia, perda de energia e motivação diminuída observadas na maioria dos pacientes depressivos (BERTON & NESTLER, 2006).

A principal hipótese postulada para explicar a fisiologia da depressão consiste na hipótese das monoaminas, que relaciona a depressão a uma diminuição funcional de transmissores monoaminérgicos em locais específicos do cérebro. Esta hipótese originou-se a partir da observação de que todos os fármacos com ação

antidepressiva utilizados clinicamente aumentavam os níveis de monoaminas (especialmente serotonina e noradrenalina) nas fendas sinápticas do sistema nervoso central (SNC) e de que a reserpina, um fármaco capaz de depletar os estoques de catecolaminas por impedir o armazenamento dos mesmos em vesículas pré-sinápticas, causava sintomas tipo-depressivos em animais de laboratório (WONG & LICINIO, 2001). Outra evidência que apoia a hipótese das monoaminas é que agentes que sabidamente bloqueiam a síntese de noradrenalina e serotonina, embora não sejam capazes de induzir depressão em pacientes saudáveis, reverterem consistentemente os efeitos terapêuticos dos antidepressivos que atuam seletivamente sobre esses sistemas de neurotransmissores, causando recaídas em pacientes que estavam em remissão clínica (RUHÉ *et al.*, 2007).

Embora existam evidências consideráveis respaldando a hipótese das monoaminas, existem ainda algumas inconsistências, como o fato de que nem todas as drogas capazes de aumentar os níveis de monoaminas apresentam efeitos antidepressivos (por exemplo, anfetamina). Além disso, apesar dos efeitos bioquímicos diretos dos antidepressivos (aumento dos níveis de monoaminas no SNC) aparecerem muito rapidamente, os efeitos clínicos dos antidepressivos (melhora do humor deprimido) levam semanas para se desenvolver (WONG & LICINIO, 2001). Desta maneira, parece que alterações fisiológicas secundárias do cérebro, que ocorrem posteriormente ao aumento dos níveis de monoaminas, são responsáveis pela melhora clínica, de modo que as monoaminas poderiam estar agindo como reguladoras de efeitos tróficos a longo prazo, cuja evolução no tempo é paralela às alterações de humor (CHARNEY & MANJI, 2004; DUMAN, 2004).

Embora a hipótese das monoaminas em sua forma simples seja insuficiente para explicar a etiologia da depressão, a manipulação farmacológica da transmissão monoaminérgica continua a ser o enfoque terapêutico mais bem sucedido. De fato, há vários fármacos antidepressivos no mercado, sendo que a grande maioria exerce seus efeitos farmacológicos via modulação da neurotransmissão monoaminérgica (BERTON & NESTLER, 2006; WONG & LICINIO, 2004). Esses fármacos exercem seus efeitos por um dos seguintes mecanismos: (1) bloqueio de proteínas pré-sinápticas transportadoras de monoaminas, as quais removem o neurotransmissor liberado da fenda sináptica; (2) inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), responsável pela degradação pré-sináptica das monoaminas e (3) inibição ou excitação de receptores pré ou pós-sinápticos que regulam a liberação de

neurotransmissores monoaminérgicos e/ou as taxas de ativação neuronal (NEMEROFF & OWENS, 2002).

O primeiro antidepressivo prescrito foi um inibidor da MAO, chamado iproniazida, o qual foi inicialmente testado para o tratamento da tuberculose e apresentava um efeito colateral bastante interessante de aumentar o nível de energia e melhorar o humor dos pacientes (BLOCH *et al.*, 1954; LOOMER *et al.*, 1957). Contudo, após ter sido utilizada com sucesso na clínica, a iproniazida foi retirada do mercado devido ao seu potencial hepatotóxico (YOU DIM *et al.*, 2006). O segundo fármaco antidepressivo descoberto foi a imipramina, um membro da classe dos antidepressivos tricíclicos, que inibem a recaptção de monoaminas. A imipramina também foi descoberta acidentalmente, quando se buscavam novos fármacos antipsicóticos a partir de compostos com estrutura química similar à clorpromazina. Outros exemplos de antidepressivos tricíclicos são os fármacos amitriptilina, nortriptilina e clomipramina (WONG & LICINIO, 2004). Contudo, a utilização dos antidepressivos tricíclicos pode causar uma série de efeitos adversos, devido ao bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos M_1 , dos receptores adrenérgicos α_1 , dos receptores para histamina H_1 e dos canais de sódio sensíveis a voltagem (STAHL, 2010).

Isso impulsionou o desenvolvimento de inibidores de recaptção seletivos para determinadas monoaminas, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (SSRIs, do inglês “selective serotonin reuptake inhibitors”) e os inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (SNRIs, do inglês “selective noradrenaline reuptake inhibitors”), que apresentaram eficácia comparável aos antidepressivos tricíclicos e melhor tolerabilidade do que esses, exceto pelo potencial de disfunção sexual associado ao uso dos SSRIs. Fármacos da classe dos SSRIs incluem a fluoxetina, a fluvoxamina, a paroxetina, o citalopram e a sertralina, enquanto que a reboxetina é um exemplo de SNRI (BERTON & NESTLER, 2006). Além disso, na tentativa de aumentar a eficácia e melhorar a tolerabilidade dos antidepressivos, vêm sendo desenvolvidos fármacos capazes de inibir a recaptção de serotonina e noradrenalina (como a duloxetina, a venlafaxina e o milnaciprano) ou a recaptção de noradrenalina e dopamina (como a bupropiona), os quais são desprovidos das ações anticolinérgicas, anti-histamínicas e antiadrenérgicas que limitam o uso dos antidepressivos tricíclicos (STAHL, 2010).

Nesse contexto, embora os inibidores de recaptação seletivos sejam atualmente os antidepressivos mais utilizados, muitos pacientes não respondem adequadamente a esses tratamentos, de forma que fármacos capazes de modular os níveis de mais de uma monoamina, como os inibidores da MAO, especialmente os fármacos mais recentes que possuem um perfil de inibição reversível e seletivo para a MAO-A (por exemplo, moclobemida), continuam sendo utilizados com grande sucesso (BERTON & NESTLER, 2006; YOUDIM *et al.*, 2006).

1.2 Inibidores da enzima monoamina oxidase

A enzima monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) é responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (Figura 2). Com base em estudos farmacológicos, bioquímicos e genéticos, duas isoformas da MAO foram identificadas e denominadas como MAO-A e MAO-B (BACH *et al.*, 1988; JOHNSTON, 1968; MAGYAR & KNOLL, 1977). Para a maioria das espécies de mamíferos, a MAO-A preferencialmente desamina a serotonina e é seletivamente inibida por baixas concentrações de clorgilina, enquanto que a MAO-B desamina a β -feniletilamina e a benzilamina e é sensível à inibição por baixas concentrações de selegilina. A dopamina, a noradrenalina e a tiramina são oxidadas por ambas as isoformas na maioria das espécies (YOUDIM *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, assim como da concentração da enzima e da espécie analisada (SHIH *et al.*, 1999). Por exemplo, apenas a MAO-A está envolvida no metabolismo da dopamina em cérebro de rato, enquanto que ambas MAO-A e MAO-B podem contribuir para o metabolismo da dopamina no cérebro humano (YOUDIM *et al.*, 2006). Já no estriado de camundongo, a dopamina é metabolizada apenas pela MAO-A em condições basais, mas por ambas as isoformas quando em altas concentrações (FORNAI *et al.*, 1999).

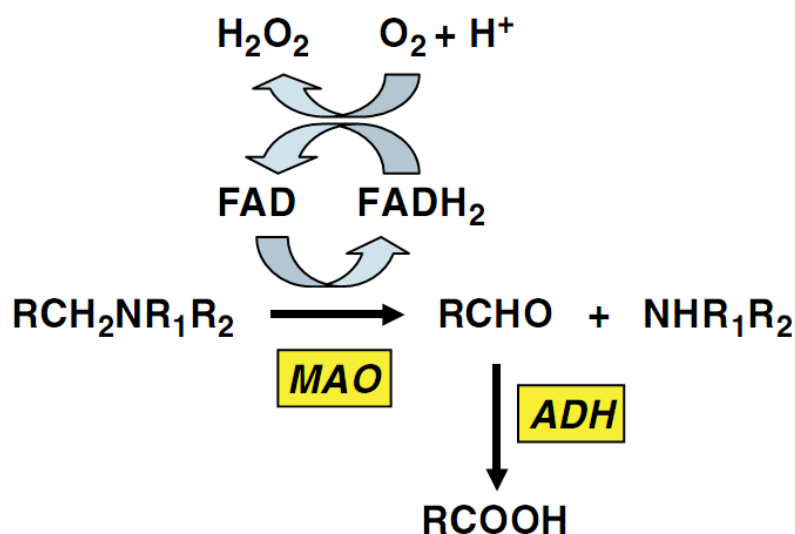


Figura 2. Reação de desaminação oxidativa de monoaminas catalisada pela enzima monoamina oxidase (MAO). $RCH_2NR_1R_2$: amina primária, secundária ou terciária; $RCHO$: derivado aldeído; NHR_1R_2 : amina substituída ou amônia; ADH: aldeído desidrogenase; $RCOOH$: derivado ácido; FAD: dinucleotídeo de flavina-adenina; $FADH_2$: FAD reduzido; O_2 : oxigênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio (Fonte: YODIM & BAKHLE, 2006).

A MAO é expressa na maioria dos tecidos de mamíferos, contudo a proporção das duas isoformas varia entre os tecidos. Além disso, a distribuição da MAO-A e da MAO-B no SNC exibe pouca variação entre as espécies (SHIH *et al.*, 1999). Em tecidos neuronais, a MAO-A é encontrada predominantemente em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como *locus coeruleus*, *substantia 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 (JAHNG *et al.*, 1997; SAURA *et al.*, 1996; WESTLUND *et al.*, 1985). Tem sido sugerido que a MAO-A e a MAO-B neuronais possuem um papel importante em proteger os neurônios de amins exógenas, em terminar as ações das amins neurotransmissoras, assim como em regular os estoques de amins intracelulares. Em tecidos periféricos, como intestino, fígado, pulmão e placenta, a MAO protege o organismo oxidando amins provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea. Em microvasos da barreira hemato-encefálica, por exemplo, a MAO possui função protetora agindo como uma barreira metabólica (YODIM *et al.*, 2006).

Devido à sua função no metabolismo dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina, a MAO parece exercer um papel importante na patofisiologia de diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos. 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 apresentaram uma densidade aumentada de MAO-A em diversas regiões do cérebro quando comparados a indivíduos saudáveis. Os autores sugerem que esse aumento na quantidade de MAO-A poderia ser a causa da hipofunção monoaminérgica relacionada à depressão. De fato, os inibidores da MAO (IMAOs) foram os primeiros fármacos antidepressivos descritos e continuam sendo utilizados até hoje com grande sucesso em pacientes refratários a outros tratamentos (BERTON & NESTLER, 2006).

Apesar da primeira geração de IMAOs irreversíveis e não seletivos (por exemplo, fenelzina e tranilcipromina) apresentar atividade antidepressiva, seu uso acarretava uma série de efeitos colaterais, como as crises hipertensivas agudas quando ingeridos juntamente com alimentos ricos em tiramina. Essas limitações impulsionaram o desenvolvimento dos IMAOs de segunda geração, os quais ainda apresentavam um perfil de atividade irreversível, porém seletivo para MAO-A (por exemplo, clorgilina) ou MAO-B (por exemplo, selegilina). Contudo, as indesejáveis crises hipertensivas continuavam a limitar o uso dos inibidores seletivos da MAO-A. Nos últimos anos, inibidores seletivos da MAO-A com perfil reversível (por exemplo, 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) (LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2007; ROBINSON, 2002).

A tiramina ingerida na dieta é metabolizada no intestino principalmente pela MAO-A (80%), de forma que os inibidores seletivos da MAO-B não causam a indesejável reação do queijo, caracterizada por crises hipertensivas agudas e potencialmente fatais, que ocorre devido a uma potencialização dos efeitos cardiovasculares da tiramina ou de outras aminas simpatomiméticas não inativadas (YOU DIM & BAKHLE, 2006). De fato, o inibidor irreversível e seletivo da MAO-B selegilina é utilizado clinicamente como adjuvante juntamente com levodopa e

também como monoterapia no tratamento da doença de Parkinson, a qual é caracterizada pela perda do controle de movimentos voluntários causada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. O uso dos inibidores da MAO-B no tratamento dessa patologia foi baseado em estudos que mostraram que os níveis de MAO-B estavam aumentados no cérebro de pacientes acometidos pela doença de Parkinson (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; RIEDERER & JELLINGER, 1983); que a atividade da MAO-B era predominante em relação à da MAO-A no gânglio basal humano (COLLINS *et al.*, 1970) e que a dopamina, a qual se encontra diminuída em pacientes com a doença de Parkinson, pode ser igualmente metabolizada por ambas as isoformas da MAO em humanos (GLOVER *et al.*, 1977).

Dessa forma, os IMAOs demonstraram ser alternativas terapêuticas importantes para o tratamento de distúrbios psiquiátricos (como a depressão) e neurodegenerativos (como a doença de Parkinson). Nesse contexto, vários estudos têm demonstrado que a dor é comumente encontrada entre os sintomas não motores da doença de Parkinson, sendo que 40 a 85 % dos pacientes acometidos por essa patologia apresentam algum tipo de dor (BEISKE *et al.*, 2009; GIUFFRIDA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006; LETRO *et al.*, 2009; TINAZZI *et al.*, 2006). Em um estudo recente realizado na Noruega, Beiske e colaboradores (2009) demonstraram que a prevalência da dor foi maior nos pacientes com a doença de Parkinson (83%) quando comparada à prevalência na população geral desse país (30%). Além disso, uma relação entre depressão e dor tem sido estabelecida, de forma que os antidepressivos tricíclicos são amplamente utilizados no tratamento de dores crônicas e refratárias a outros tratamentos (BAIR *et al.*, 2003; FEINMANN, 1985; LYNCH, 2001; SINDRUP *et al.*, 2005; VON KORFF & SIMON, 1996). Em vista disso, a MAO poderia estar envolvida nos mecanismos fisiopatológicos da dor e assim os inibidores desta enzima poderiam apresentar potencial terapêutico no tratamento de condições dolorosas.

1.3 Dor

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em

termos que sugerem tal lesão (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Em indivíduos saudáveis, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. O primeiro propósito da dor aguda é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), tais como objetos perigosamente quentes ou cortantes (WATKINS & MAIER, 2002).

O componente sensorial da dor (nocicepção) é formado por várias vias que ligam diversos componentes do sistema nervoso de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e ao núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (WOOLF & MA, 2007). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (WATKINS & MAIER, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetivo-motivacionais (descontentamento) da dor (CRAIG, 2003; HUNT & MANTYH, 2001). Esta percepção supra-espinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa (CRAIG, 2003; WATKINS & MAIER, 2002).

A transferência das informações nociceptivas entre a medula espinhal e os níveis supra-segmentares sofre alterações intensas devido à participação de mecanismos modulatórios supra-espinhais. A modulação da dor feita pelas vias descendentes ocorre a partir de diversas estruturas, como por exemplo a substância cinzenta periaquedutal, o tálamo, o hipotálamo, o núcleo caudato, o núcleo magno da rafe e o núcleo gigantocelular. Dentre os mediadores envolvidos nesse sistema de modulação descendente, encontram-se as monoaminas, como a noradrenalina, a serotonina e a dopamina, e os opióides endógenos, como as encefalinas, os quais podem exercer efeitos inibitórios na transmissão da informação dolorosa (MILLAN, 2002). Além disso, evidências crescentes têm demonstrado que a neurotransmissão

dopaminérgica desempenha um papel importante nos mecanismos de dor e analgesia (WOOD, 2008).

Um segundo propósito da dor é desencadear comportamentos de recuperação, em resposta à dor originada por lesões no próprio organismo. Neste caso, a lesão tecidual já ocorreu e a área lesionada está inflamada ou infectada, e os reflexos espinhais não são tão importantes, pois não existe uma fonte externa de estímulo para ser evitada. Os estímulos provenientes da área lesionada chegam a centros cerebrais superiores (por exemplo, tálamo e córtex) que organizam comportamentos apropriados de recuperação para proteger e facilitar a resolução da lesão (WATKINS & MAIER, 2002).

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode tornar-se crônica quando o organismo não é capaz de produzir a resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa (neuropatias). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (ASHBURN & STAATS, 1999). Nessas síndromes, o processamento sensorial é anormal. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente, sem a necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou em choque. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas principalmente por estar associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (COSTIGAN *et al.*, 2009; WOOLF & MA, 2007; WOOLF & SALTER, 2000).

Dentre as dores crônicas mais prevalentes encontra-se a dor neuropática. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês “International Association for the Study of Pain”), esta pode ser definida como uma dor causada por uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial, podendo ocorrer tanto a nível periférico quanto central (LOESER

& TREEDE, 2008). Esse tipo de dor envolve mecanismos fisiopatológicos complexos que originam diversas alterações no sistema envolvido na transmissão da informação nociceptiva, como geração ectópica de potenciais de ação; facilitação e desinibição da transmissão sináptica; mudanças nas conectividades sinápticas; e interações neuroimunes (COSTIGAN *et al.*, 2009). As dores neuropáticas em humanos estão, em muitos casos, associadas com lesões de nervos periféricos causadas por trauma (como amputação, tração, compressão), fármacos (como vincristina, cisplatina, paclitaxel), distúrbios metabólicos (por exemplo, a diabetes) ou infecções virais (como herpes vírus) (WOOLF & MANNION, 1999). Embora seja difícil quantificar a prevalência global de dor neuropática na população geral, devido ao grande número de causas subjacentes e à falta de métodos de medição consistentes, estima-se que 6 a 8% da população mundial apresente dor crônica com características neuropáticas (HAANPAA *et al.*, 2009; TORRANCE *et al.*, 2006).

Diversos modelos animais foram desenvolvidos a fim de estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor neuropática, assim como desenvolver tratamentos mais eficazes para esse tipo de dor (JAGGI *et al.*, 2009). Dentre os modelos de dor neuropática mais utilizados, encontra-se o modelo de mononeuropatia periférica induzida pela injúria por contração crônica (CCI, do inglês “Chronic Constriction Injury”) do nervo ciático, desenvolvido por Bennett e Xie (1988). Os animais submetidos à CCI apresentam alterações comportamentais, como hiperalgesia mecânica e térmica, dor espontânea, alodínia ao frio e hipersensibilidade química, que persistem por pelo menos sete semanas após a lesão do nervo ciático (BENNETT & XIE, 1988). Além disso, acredita-se que a dor neuropática induzida pela CCI esteja relacionada a uma sensibilização de fibras aferentes sensoriais do tipo C e A δ (GABAY & TAL, 1994). As respostas comportamentais induzidas pela CCI correspondem a causalgia e a síndrome dolorosa regional complexa observadas em humanos (JAGGI *et al.*, 2009).

Na prática clínica, tem sido extensivamente descrito que a dor neuropática é de difícil tratamento, pois envolve etiologia distinta e, principalmente, porque os mecanismos celulares e moleculares envolvidos são complexos e até o momento pouco entendidos (BRIDGES *et al.*, 2001; STACEY, 2005). Uma vez que os pacientes com dor neuropática não apresentam melhora clínica satisfatória com os analgésicos clássicos, alternativas farmacológicas vêm sendo utilizadas, como alguns fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes. De fato, os antidepressivos

tricíclicos estão entre os fármacos de primeira escolha no tratamento dessas condições dolorosas (DWORKIN *et al.*, 2007).

1.4 Antidepressivos e o tratamento da dor

Os fármacos antidepressivos vêm sendo utilizados há décadas no tratamento de síndromes dolorosas crônicas, especialmente em dores neuropáticas (FEINMANN, 1985). A maioria dos estudos demonstra que os antidepressivos da classe dos tricíclicos, os quais promovem um aumento na disponibilidade de noradrenalina e serotonina no SNC através da inibição dos transportadores dessas monoaminas, são úteis para o tratamento da dor (LYNCH, 2001) e apresentam uma boa eficácia em síndromes dolorosas de difícil tratamento (SINDRUP *et al.*, 2005). De fato, os antidepressivos tricíclicos, juntamente com alguns anticonvulsivantes, têm sido considerados os fármacos de primeira linha para o tratamento da dor neuropática (DWORKIN *et al.*, 2007; MICÓ *et al.*, 2006). Os antidepressivos da classe dos SSRIs também têm sido avaliados para o tratamento da dor crônica. Existem alguns estudos clínicos demonstrando a eficácia analgésica de diversos SSRIs, como fluoxetina, citalopram, fluvoxamina, sertralina e paroxetina, contudo a analgesia obtida é menos consistente que a produzida pelos antidepressivos tricíclicos (FINNERUP *et al.*, 2005; MCDERMOTT *et al.*, 2006).

Além disso, a dor também é apresentada frequentemente entre os sintomas não motores de pacientes acometidos pela doença de Parkinson, a qual pode ser tratada com inibidores da MAO-B (BEISKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2006; TINAZZI *et al.*, 2006). Nesse sentido, evidências crescentes têm apontado para um envolvimento da dopamina nos mecanismos de dor e analgesia (WOOD, 2008). Pedersen e colaboradores (2005) demonstraram que um inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina, a bupropiona, foi mais eficaz em reverter a alodínia mecânica em modelos de dor neuropática em ratos do que a fluoxetina, cuja ação está restrita apenas ao sistema serotoninérgico. Os autores mostraram também que o inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina (reboxetina) e o inibidor misto da recaptação de serotonina e noradrenalina (venlafaxina) não tiveram efeito algum sobre a alodínia mecânica induzida por neuropatia (PEDERSEN *et al.*, 2005). Além disso, um estudo clínico avaliou o uso de bupropiona no tratamento de pacientes

com dor neuropática, demonstrando uma significativa melhora na dor e uma diminuição na interferência da dor na qualidade de vida dos pacientes que receberam bupropiona, quando comparados aos que receberam placebo (SEMENCHUK *et al.*, 2001).

Embora os antidepressivos exerçam seus efeitos em circuitos neuronais que regulam a emoção (um componente essencial da dor), tem sido demonstrado que esses fármacos apresentam eficácia analgésica mesmo em pacientes não depressivos e em doses menores às necessárias para a ação antidepressiva, sugerindo que os efeitos analgésico e antidepressivo ocorram independentemente (MICÓ *et al.*, 2006). Além disso, os antidepressivos podem exercer ações farmacológicas em áreas e núcleos cruciais para o sistema de controle endógeno da dor, como o núcleo *locus coeruleus*, os núcleos dorsal e magnus da *rafe* e o corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 2002). Embora os mecanismos envolvidos na ação analgésica dos antidepressivos ainda não sejam bem conhecidos, acredita-se que o aumento da disponibilidade de monoaminas no SNC esteja diretamente envolvido, de forma a aumentar o controle endógeno da dor mediante modulação das vias inibitórias descendentes (ARDID *et al.*, 1995).

Desta maneira, fármacos capazes de modular o metabolismo desses neurotransmissores monoaminérgicos, como os inibidores da MAO, apresentam um potencial analgésico a ser explorado. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que os inibidores da MAO-A apresentam efeito antinociceptivo em modelos de dor em animais de experimentação, assim como ação analgésica em estudos clínicos (APAYDIN *et al.*, 2001; BIANCHI *et al.*, 1992; DINA *et al.*, 2008; PIRILDAR *et al.*, 2003; SCHREIBER *et al.*, 1998). Com relação a isso, o inibidor reversível e seletivo da MAO-A moclobemida tem sido avaliado para o tratamento da dor tanto em estudos pré-clínicos quanto clínicos. Schreiber e colaboradores (1998) demonstraram que a moclobemida apresentou efeito antinociceptivo em um teste de sensibilidade térmica (teste de retirada da cauda) em camundongos, o qual foi prevenido pela administração de um antagonista α_2 -adrenérgico, mas não pela administração de antagonistas opióide ou serotoninérgico. Além disso, a moclobemida também se mostrou eficaz em reduzir a nocicepção produzida por estímulo mecânico em um modelo de mononeuropatia unilateral em ratos (APAYDIN *et al.*, 2001). Os estudos clínicos, contudo, mostram resultados contraditórios quanto ao uso desse fármaco no tratamento da dor. Menkes e colaboradores (1995)

relataram sete casos clínicos sendo que apenas um paciente obteve um efeito analgésico parcial após dois meses de tratamento com moclobemida, sugerindo que o fármaco possui eficácia limitada no tratamento da dor neuropática. Por outro lado, Pirildar e colaboradores (2003) realizaram um estudo clínico aberto e não randomizado envolvendo 14 pacientes e demonstraram que a moclobemida foi eficaz em diminuir a dor percebida pelos mesmos.

Existem estudos que sugerem a existência de uma relação entre a MAO e sítios de ligação para compostos imidazolínicos do tipo 2 (sítios I₂) (EGLEN *et al.*, 1998; RADDATZ & LANIER, 1997; TESSON *et al.*, 1995). Estes sítios são encontrados na membrana mitocondrial externa e possuem como característica importante a sua alta afinidade para uma série de compostos imidazolínicos e guanidínicos. Além disso, os sítios I₂ têm sido subdivididos conforme sua capacidade de reconhecer o composto guanidínico, amilorida. Sítios sensíveis à amilorida são designados I_{2A}, e provavelmente estejam localizados na MAO-A, enquanto que os sítios I_{2B} são insensíveis à amilorida e encontrados na MAO-B. Embora ainda não se saiba o mecanismo de interação entre os sítios I₂ e as isoformas da MAO, acredita-se que este sítio seja distinto do sítio catalítico da enzima, e independente do grupo prostético dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), ou dos domínios de ligação a inibidores clássicos da MAO (EGLEN *et al.*, 1998). Muitos relatos na literatura demonstram que derivados imidazolínicos são capazes de alterar a atividade da MAO, como é o caso dos compostos 2-BFI (2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1H-imidazol) e BU224 (2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-quinolina) que inibem a enzima de maneira reversível e não seletiva (CARPENÉ *et al.*, 1995; LALIES *et al.*, 1999; OZAITA *et al.*, 1997; RAASCH *et al.*, 1999). Em vista disso, o Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sintetizou diversos derivados 2-imidazolínicos, sendo esses testados quanto ao seu potencial de inibição da atividade da MAO. Recentemente, foi demonstrado que muitos desses compostos mostraram boa potência e seletividade em inibir a atividade da MAO, *in vitro*, em encéfalo de ratos (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Dentre esses compostos, o 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1H-imidazol (2-DMPI) exibiu ótima potência e seletividade para inibir reversivelmente a atividade da MAO-A (SANT'ANNA *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm fornecido evidências de que a dor é um sintoma comumente encontrado em pacientes com distúrbios depressivos (BAIR *et al.*, 2003;

VACCARINO *et al.*, 2009). Por outro lado, a depressão também é uma queixa frequente de pacientes com dores crônicas persistentes (BANKS & KERNS, 1996; MONGINI *et al.*, 2007; NICHOLSON & VERMA, 2004). Além disso, recaídas para estados depressivos são mais comuns em pacientes com dores crônicas. Tem sido sugerido que o uso de um antidepressivo com ação analgésica poderia ajudar esses pacientes, prevenindo recaídas e permitindo a remissão completa dos sintomas (MICÓ *et al.*, 2006). Deste modo, o 2-DMPI, via inibição da atividade da MAO-A, poderia ser útil no tratamento de distúrbios depressivos e de condições dolorosas crônicas. Com base nisso, torna-se interessante avaliar o potencial antidepressivo e analgésico desse composto *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antidepressivo e analgésico do 2-DMPI em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Examinar se o 2-DMPI inibe a atividade da MAO-A, *in vitro*, em encéfalo de camundongo, assim como o efeito desse composto nos parâmetros cinéticos dessa enzima;

2.2.2. Avaliar o potencial antidepressivo do 2-DMPI no teste de suspensão da cauda;

2.2.3. Verificar se esse possível efeito tipo-antidepressivo induzido pelo 2-DMPI pode estar relacionado com alterações na locomoção ou na ansiedade;

2.2.4. Investigar os efeitos do 2-DMPI sobre os níveis de monoaminas e seus metabólitos;

2.2.5. Avaliar a participação dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico no possível efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI;

2.2.6. Avaliar um possível efeito antinociceptivo dos inibidores reversíveis da MAO-A, 2-DMPI e moclobemida, em um modelo animal de dor neuropática;

2.2.7. Verificar se há alguma alteração na atividade da MAO-A, *ex vivo*, em camundongos neuropáticos;

2.2.8. Verificar se os receptores 5-HT₃ espinhais estão envolvidos no possível efeito antinociceptivo do 2-DMPI e da moclobemida.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo: Efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI em camundongos

Título:

Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice

Artigo publicado no periódico:

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

ISSN:

0278-5846



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice

Jardel Gomes Villarinho ^a, Roselei Fachinnetto ^a, Francielle de Vargas Pinheiro ^a, Gabriela da Silva Sant'Anna ^a, Pablo Machado ^b, Patrícia Andréia Dombrowski ^c, Cláudio da Cunha ^c, Daniela de Almeida Cabrini ^c, Marcos Antônio Pinto Martins ^b, Helio Gauze Bonacorso ^b, Nilo Zanatta ^b, Maribel Antonello Rubin ^a, Juliano Ferreira ^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2012

Received in revised form 10 April 2012

Accepted 10 April 2012

Available online 17 April 2012

Keywords:

Depression

Monoamine metabolism

Moclobemide

Reversible MAO-A inhibitor

ABSTRACT

Monoamine oxidase (MAO) inhibitors were the first antidepressant drugs to be prescribed and are still used today with great success, especially in patients resistant to other antidepressants. In this study, we evaluated the MAO inhibitory properties and the potential antidepressant action of 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice. We found that 2-DMPI inhibited both MAO isoforms (K_i values were 1.53 (1.3–1.8) μ M and 46.67 (31.8–68.4) μ M for MAO-A and MAO-B, respectively) with 30-fold higher selectivity toward MAO-A. In relation to the nature of MAO-A inhibition, 2-DMPI showed to be a mixed and reversible inhibitor. The treatment with 2-DMPI (100–1000 μ mol/kg, s.c.) caused a significant decrease in immobility time in the tail suspension test (TST) without affecting locomotor activity, motor coordination or anxiety-related activities. Conversely, moclobemide (1000 μ mol/kg, s.c.) caused a significant increase in immobility time in the TST, which appeared to be mediated by a nonspecific effect on motor coordination function. 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c.) decreased serotonin turnover in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, whereas dopamine turnover was diminished only in the striatum, and norepinephrine turnover was not changed. The antidepressant-like effect of 2-DMPI was inhibited by the pretreatment of mice with methysergide (2 mg/kg, s.c., a non-selective serotonin receptor antagonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) or haloperidol (0.05 mg/kg, i.p., a non-selective dopamine receptor antagonist). These results suggest that 2-DMPI is a prototype reversible and preferential MAO-A inhibitor with potential antidepressant activity, due to its modulatory effect on serotonergic and dopaminergic systems.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Depression is a chronic, recurring and potentially life-threatening psychiatric illness that affects approximately 20% of the worldwide population (Berton and Nestler, 2006). Although several different antidepressant drugs are available to treat depression, all of these compounds modulate monoamine neurotransmission, specially serotonergic and noradrenergic systems (Wong and Licinio, 2004). However, increasing evidence from human and animal studies suggest a relationship between dopamine (DA) neurotransmission and depression (Dailly et al., 2004; Millan, 2004; Papakostas, 2006).

Monoamine oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) catalyses the oxidative deamination of biogenic amines, such as serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), norepinephrine (NE) and DA, and it seems to play

important roles in several psychiatric and neurological disorders. MAO is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme located at the outer mitochondrial membrane of monoaminergic neurons, glia, and other cells. On the basis of pharmacological, biochemical and genetic studies, two isoforms of MAO were proposed and designated MAO-A and MAO-B (Bach et al., 1988; Johnston, 1968). MAO-A preferentially deaminates 5-HT and is inhibited by low concentrations of clorgyline, whereas MAO-B deaminates phenylethylamine and benzylamine and is inhibited by low concentrations of selegiline. Epinephrine, NE, DA, tryptamine and tyramine are oxidized by both isoforms of the enzyme in most species (Youdim et al., 2006).

Monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) have been used for decades in the treatment of depression and their antidepressant properties result from selective MAO-A inhibition in the central nervous system, which could lead to increased brain levels of 5-HT, NE and DA (López-Muñoz et al., 2007; Robinson, 2002). Moreover, Meyer et al. (2006), using positron emission tomography, found a marked increase in brain

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8756.
E-mail address: ferreiraj99@gmail.com (J. Ferreira).

MAO-A levels in patients with major depressive disorders compared with healthy subjects, suggesting that elevated MAO-A levels may be the primary cause of monoamine depletion in depression. In fact, MAOIs were the first antidepressant drugs described and are still used today with great success, especially in patients who are resistant to other treatments (Berton and Nestler, 2006; López-Muñoz et al., 2007; Thase et al., 1995; Wong and Licinio, 2004). Although the first generation of irreversible and nonselective MAOIs (i.e., phenelzine and tranylcypromine) displayed antidepressant activity, they induced serious side effects, such as acute hypertensive crises, when given in combination with foods containing tyramine. These liabilities led to the search for a second generation of MAOIs (i.e., clorgyline) that exhibited an irreversible and selective profile. However, undesirable hypertensive crises persisted, limiting the use of second-generation MAOIs. Afterward, selective and reversible MAO-A inhibitors, having a much better safety profile than irreversible inhibitors, have been described (López-Muñoz et al., 2007; Robinson, 2002).

Recently, a series of 2-substituted-2-imidazoline compounds were synthesized using a greener synthetic approach, and their ability to inhibit *in vitro* MAO activity was evaluated in rat brain (Sant'Anna et al., 2009). Potent and selective inhibitory activities toward both MAO isoforms were observed for certain compounds, including 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI). Thus, the aims of this study were to evaluate the MAO inhibitory properties of 2-DMPI in mice brain and its effects on a predictive test for antidepressant activity (the tail suspension test), as well as on monoamine metabolism and the participation of the monoaminergic system in the potential antidepressant-like action of this compound. We also investigated the effect of 2-DMPI during tests of locomotor activity, motor coordination and anxiety-related activities.

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 and on a 12 h alternating light–dark schedule in a temperature-controlled room (22 ± 3 °C). The animals were allowed to adapt to the test environment for 2 days before testing. Mice were kept and used in accordance to the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA) and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals. All experiments pertaining to this study were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number 59/2008). For behavioral tests, drugs were administered in random order, and the behavioral measure was carried out by a blinded investigator. Each mouse was tested individually and only once. Results of mice treated with any drug were compared with those obtained for a vehicle treated (control) group.

2.2. Drugs

The synthesis of 2-DMPI was carried out by the previously reported method of condensation involving aldehydes and ethylenediamine in the presence of *N*-bromosuccinimide (Sant'Anna et al., 2009). The chemical structure of 2-DMPI is shown in Fig. 1A. Analysis of ^1H and ^{13}C Nuclear magnetic resonance spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with the assigned structure. For *in vivo* studies, 2-DMPI and moclobemide (Aurorix®, Roche, Brazil) were dissolved in a vehicle solution (5% Tween 80, 20% polyethylene-glycol and 75% saline), and for *in vitro* studies, in 10% dimethyl sulfoxide (maximum final concentration of 1%). WAY100635 and methysergide (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), diazepam (Compaz®, Cristália, Brazil) and haloperidol (Haldol®, Janssen-Cilag, Brazil) were dissolved in saline. All other reagents were of analytical grade and were purchased

from local suppliers. Injections were performed in a 10 mL/kg volume by the subcutaneous (s.c.) or intraperitoneal (i.p.) route.

2.3. Biochemical measurements

2.3.1. Determination of the kinetic parameters of MAO inhibition *in vitro*

2-DMPI was tested for its *in vitro* inhibitory potential on mice MAO-A and MAO-B activities in brain mitochondrial preparations by a fluorometric method using kynuramine as a substrate, as previously described (Matsumoto et al., 1985; Sant'Anna et al., 2009). Briefly, assays were performed in duplicate in a final volume of 500 μL containing 0.45 mg of protein and incubated at 37 °C for 30 min. Activities of the A and B isoforms were isolated pharmacologically by incorporating 250 nM selegiline (selective MAO-B inhibitor) or 250 nM clorgyline (selective MAO-A inhibitor) into the reaction mix. The reaction mixture (containing mitochondrial fractions, 2-DMPI and inhibitors) was preincubated at 37 °C for 5 min, and the reaction was started by the addition of 50 μL of kynuramine (90 μM for MAO-A and 60 μM for MAO-B). Also, 2-DMPI and moclobemide were tested at a concentration range of 1 to 1000 μM , and the IC_{50} and K_i values for both MAO isoforms were determined.

For kinetic experiments, various concentrations of kynuramine (1–300 μM) were used, and the MAO-A activity was determined in the absence or presence of different concentrations of 2-DMPI (10, 30 or 100 μM) in order to calculate K_m and V_{max} values.

The reversibility of MAO-A inhibition was studied using the dialysis method as described by Harfenist et al. (1996) with minor modifications. Mixtures of buffer, brain mitochondrial preparations and selegiline with and without 2-DMPI (30 μM) were dialyzed at 25 °C for 24 h. In the control mixture, 0.003% dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. For each 1 mL of mixture dialyzed, 40 mL of outer buffer (16.8 mM Na_2HPO_4 , 10.6 mM KH_2PO_4 , 3.6 mM KCl, 1 mM dithiothreitol) was used. The outer buffer was replaced with fresh buffer at 1, 2, 4 and 6 h after the start of dialysis. Undialyzed portions of each mixture were maintained at 25 °C over the same time period. Twenty-four hours after the start of dialysis, dialyzed and undialyzed mixtures were simultaneously assayed for MAO-A activity in order to evaluate the reversibility of the inhibition produced by 2-DMPI.

2.3.2. Monoamine neurotransmitters and metabolites levels

Mice were killed 2 h after the administration of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, s.c.) or vehicle solution (10 mL/kg, s.c.). The brains were excised, and the cerebral cortex, hippocampus and striatum were immediately separated and stored at -80 °C until analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The levels of the monoamines DA, 5-HT, NE and their metabolites homovanillic acid (HVA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) and 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) were estimated by high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, as described by Ferraz et al. (2002).

2.4. Behavioral measurements

2.4.1. Tail suspension test (TST)

Antidepressant-like effect was measured using the tail suspension test (Steru et al., 1985), with minor alterations (Tonello et al., 2012). Mice were suspended by their tail 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 a period of 6 min, and the duration of immobility was scored manually during the last 4 min interval of the test (activity in the first 2 min was discarded because animals predominantly try to escape during this period). Mice were considered immobile only when they hung passively.

For the time–course curve, mice were submitted to the TST 0.5, 1, 2, 4 or 6 h after the administration of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, s.c.) or

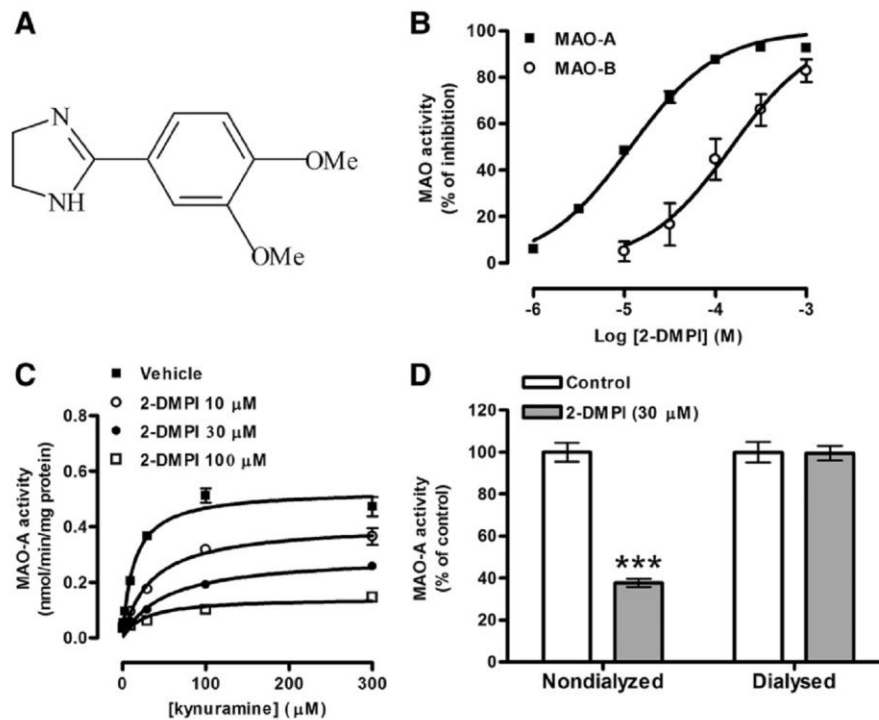


Fig. 1. (A) Molecular structure of 2-DMPI. (B) Inhibitory potential of 2-DMPI on *in vitro* MAO-A and MAO-B activities in the mitochondrial fraction of mouse brain. (C) Substrate concentration curves for *in vitro* MAO-A activity in the absence or presence of 2-DMPI (10, 30 or 100 μ M) in the mitochondrial fraction of mouse brain. (D) Reversibility of MAO-A inhibition produced by 2-DMPI (30 μ M) after 24 h of dialysis. Values are means \pm SEM of three to four experiments performed in duplicate. *** P <0.001 compared with the respective control group, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

vehicle solution (10 mL/kg, s.c.). For the dose–response curve, mice were treated with 2-DMPI (30, 100, 300 or 1000 μ mol/kg, s.c.; equivalent to 6, 21, 62 or 206 mg/kg, respectively) or vehicle solution 2 h before the TST. Moclobemide (30, 100, 300 or 1000 μ mol/kg, s.c., 1 h before testing; equivalent to 8, 27, 81 or 269 mg/kg, respectively) was used as a positive control.

To assess the involvement of serotonergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of 2-DMPI, mice received a single injection of methysergide (2 mg/kg, s.c., a non-selective 5-HT receptor antagonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), haloperidol (0.05 mg/kg, i.p., a non-selective DA receptor antagonist) or saline (10 mL/kg) 30 min before the administration of 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c.) or vehicle. Two hours after treatment with 2-DMPI or vehicle, the animals were submitted to the TST. All doses of antagonists used in this work were chosen according previously published data (Duarte et al., 2008; Machado et al., 2007).

2.4.2. Open field test

Spontaneous locomotor activity was assessed in an open field test, as described previously (Archer, 1973). Animals were injected with 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c.) or vehicle 2 h before testing. Another group of mice was treated with moclobemide (300 μ mol/kg, s.c.) or vehicle 1 h before testing. The number of crossings and rearings were counted in a 5 min session.

2.4.3. Rota-rod test

Motor coordination activity was evaluated using the rota-rod test (Dunham and Miya, 1957) with minor alterations (Godoy et al., 2004). The apparatus consisted of a bar (3.7 cm in diameter) divided into 3 separate compartments, placed at a 25 cm height and rotating at a fixed velocity of 8 rpm. Twenty-four hours before testing, all animals were submitted to a training session until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the test day, mice received a single injection of 2-DMPI (300 or 1000 μ mol/kg, s.c.) or

vehicle 2 h before testing. Another group of mice was treated with moclobemide (300 or 1000 μ mol/kg, s.c.) or vehicle 1 h before testing. During the test session, the total number of falls during a 4 min period was observed.

2.4.4. Elevated plus-maze test

Anxiety-related behavior was assessed using the mouse elevated plus-maze test (Lister, 1987). The apparatus consists of two open arms (30 \times 5 cm) and two enclosed arms (30 \times 5 \times 15 cm) positioned 40 cm above the floor. The junction of the four arms forms a central square platform (5 \times 5 cm). Mice received a single administration of 2-DMPI (300 μ mol/kg, s.c.) or vehicle 2 h before testing. As a positive control, diazepam (1 mg/kg, s.c.) was administered to mice 30 min before testing (Naderi et al., 2008). Each animal was placed in the central platform facing one of the open arms and was allowed to explore freely for 5 min. The behavior parameters recorded were the number of entries into the open or closed arms and the average time spent by the mouse in each of the arms. The percentage of the time spent on the open arms and the percentage of the entries into the open arms were calculated as follows: time spent or number of entries into the open arms/total time or total number of the entries into closed and open arms \times 100, respectively.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 4.0 software. The results were expressed as means \pm SEM, except for K_i values, which were reported as means followed by 95% confidence intervals. Also, the number of crossings or rearings (open field test) and fall number (rota-rod test) were expressed as medians followed by their 25th and 75th percentiles. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression using sigmoidal dose–response with a variable slope equation, whereas K_m (μ M) and V_{max} (nmol/min/mg protein) values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis–Menten

equation. Apparent K_i values were calculated using the following equation: $K_i = IC_{50}/[1 + ([S]/K_m)]$ (Cheng and Prusoff, 1973). Differences between groups were evaluated for significance using the unpaired *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for parametric data. The Mann–Whitney test was used to analyze nonparametric data (number of crossings, number of rearings and fall number). Significance was considered to be when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of 2-DMPI on MAO activity

We observed that 2-DMPI inhibited both MAO isoforms in a concentration-dependent manner with K_i values of 1.5 (1.3–1.8) μM and 46.7 (31.8–68.4) μM and n_H values of 0.91 ± 0.05 and 0.93 ± 0.15 for MAO-A and MAO-B, respectively (Fig. 1B). Subsequently, kinetic experiments for MAO-A activity were carried out using different concentrations of substrate. 2-DMPI (30 μM) caused an increase in the K_m value ($50.2 \pm 10.0 \mu\text{M}$) and a decrease in the V_{max} value ($0.29 \pm 0.02 \text{ nmol/min/mg protein}$) compared to K_m and V_{max} values obtained in the absence of 2-DMPI ($13.6 \pm 2.1 \mu\text{M}$ and $0.53 \pm 0.02 \text{ nmol/min/mg protein}$, respectively) (Fig. 1C). We evaluated the reversibility of the MAO-A inhibition induced by 2-DMPI using the dialysis method. It was observed that the inhibition of MAO-A activity produced by 2-DMPI was completely reversed after 24 h of dialysis compared with undialyzed activity (Fig. 1D). We also determined the inhibitory effect of moclobemide on MAO-A and MAO-B activities. Moclobemide selectively inhibited the MAO-A isoform in a concentration-dependent manner, showing a K_i value of 7.4 (6.3–8.7) μM and an n_H value of 0.72 ± 0.05 (Fig. 2A).

3.2. Effects of 2-DMPI in the TST

Moclobemide, used as a positive control, significantly decreased the immobility time at doses 100 ($35 \pm 8\%$) and 300 ($40 \pm 7\%$) $\mu\text{mol/kg}$ when administered 1 h before testing ($F(4, 33) = 12.32, P < 0.0001$). However, at 1000 $\mu\text{mol/kg}$, moclobemide caused a significant increase ($27 \pm 13\%$) in immobility time compared to the vehicle-treated group (Fig. 2B). Systemic treatment with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) significantly reduced the immobility time at 2 h and 4 h after administration ($F(1,73) = 10.07, P < 0.01$). This effect was not found at 0.5, 1 or 6 h after treatment (data not shown). Therefore, a 2 h pretreatment was chosen to carry out the dose–response curve and the following experiments. A significant reduction in immobility time was observed at 100 ($34 \pm 7\%$), 300 ($46 \pm 6\%$) and 1000 ($29 \pm 6\%$) $\mu\text{mol/kg}$ doses of 2-DMPI ($F(4,50) = 8.41, P < 0.0001$; Fig. 3).

3.3. Effects of 2-DMPI in the open field and the rota-rod tests

The treatment with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 2 h before testing) did not cause significant alterations in both crossing (Fig. 4A) and rearing (Fig. 4B) numbers compared with vehicle-treated mice. Moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 1 h before testing) caused no change in the number of crossings (Fig. 4C); however, it significantly decreased the rearing number compared with control mice (Fig. 4D). In addition, 2-DMPI (300 or 1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 2 h before testing; Fig. 5A or B, respectively) caused no change in motor coordination activity compared with control animals, as evaluated by the total fall number in the rota-rod test. On the other hand, moclobemide (1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 1 h before testing) caused a significant increase in the total fall number compared to vehicle-treated mice (Fig. 5D). At a dose of 300 $\mu\text{mol/kg}$, moclobemide did not alter the motor coordination function of mice (Fig. 5C).

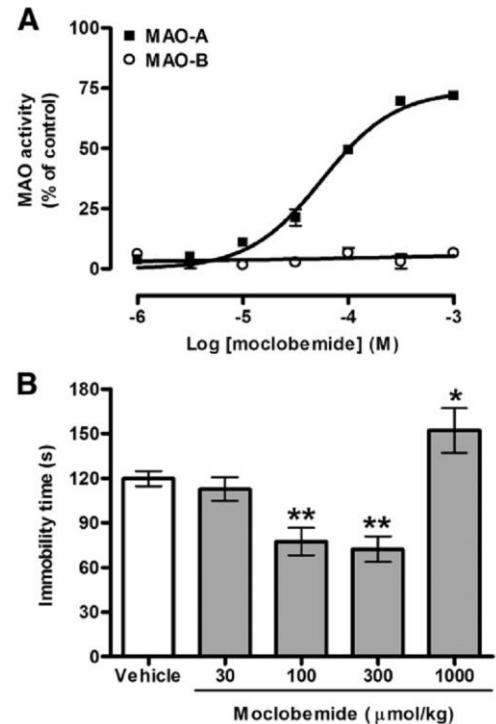


Fig. 2. (A) Inhibitory potential of moclobemide on *in vitro* MAO-A and MAO-B activities in the mitochondrial fraction of mouse brain. Values are means \pm SEM of three experiments performed in duplicate. (B) Effect of moclobemide administration (30–1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) on immobility time in the TST in mice. Values are means \pm SEM for each group ($n = 5–9$ per group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated group, one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

3.4. Effects of 2-DMPI in the plus-maze test

As shown in Fig. 6, 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 2 h before testing) did not cause any changes in the percentage of time (Fig. 6A) or percentage of entries (Fig. 6B) into the open arms compared to vehicle-treated mice. Diazepam (1 mg/kg, s.c.), used as positive control in this test, significantly increased the percentage of time ($F(2,24) = 4.31, P < 0.05$; Fig. 6A) and percentage of entries ($F(2,24) = 8.54, P < 0.01$; Fig. 6B) in the open arms compared to vehicle-treated mice.

3.5. Effects of 2-DMPI on monoamine neurotransmitter levels and its metabolites

We observed that 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) induced a significant increase in hippocampal (Fig. 7A), cortical (Fig. 7B) and striatal

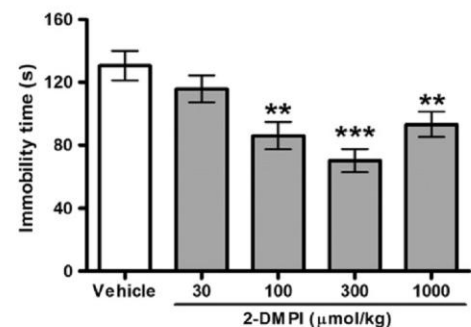


Fig. 3. Dose–response curve of subcutaneous (s.c.) 2-DMPI administration on immobility time in the TST in mice. The values are means \pm SEM for each group ($n = 10–14$ per group). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with the control group, one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

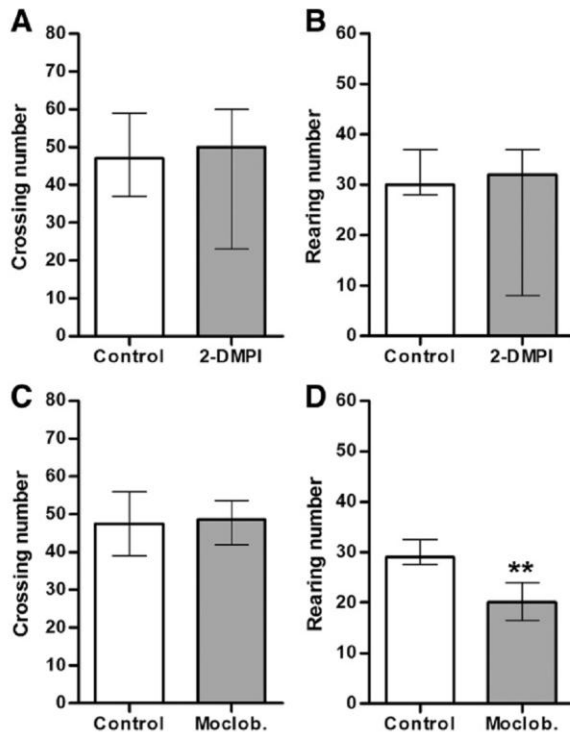


Fig. 4. Effects of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 2 h before test), moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 1 h before test) or vehicle (10 mL/kg, s.c., 1 or 2 h before test) treatment on locomotor activity in the open field test in mice. (A) Effect of 2-DMPI on crossing number. (B) Effect of 2-DMPI on rearing number. (C) Effect of moclobemide on crossing number. (D) Effect of moclobemide on rearing number. Values are medians (interquartile ranges) of 7–8 animals per group. ** $P < 0.01$ compared to the respective vehicle-treated group, Mann Whitney test.

(Fig. 7C) 5-HT levels, whereas 5-HIAA levels were significantly decreased in the cerebral cortex (Fig. 7B) and striatum (Fig. 7C). However, 5-HIAA levels were not significantly altered in hippocampus (Fig. 7A). Furthermore, the 5-HIAA/5-HT ratio diminished in all of the brain regions examined (Fig. 8). We also detected an increase in DA level and a decrease in DOPAC level in the striatum of 2-DMPI treated mice (Fig. 7C). The ratios of DOPAC/DA and HVA/DA were significantly reduced only in the striatum (Fig. 8C) Moreover, there were no alterations in NE or DHPG levels (Fig. 7) or in the DHPG/NE ratio in any of the brain regions examined (Fig. 8).

3.6. Involvement of the serotonergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of 2-DMPI

Fig. 9A shows that the pretreatment of mice with the nonselective 5-HT receptor antagonist methysergide (2 mg/kg, s.c.) significantly prevented the decrease in the immobility time elicited by 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.). There was a significant effect of treatment x pretreatment interaction [$F(1,36) = 7.46$, $P < 0.01$]. Moreover, the pretreatment of mice with the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.) also prevented the antidepressant-like effect produced by 2-DMPI ($F(1,30) = 9.60$, $P < 0.01$ for treatment x pretreatment interaction; Fig. 9B). In addition, the results depicted in Fig. 9C show that the pretreatment of animals with the nonselective DA receptor antagonist haloperidol (0.05 mg/kg, i.p.) prevented the effect of 2-DMPI in the TST ($F(1,32) = 9.56$, $P < 0.01$ for treatment x pretreatment interaction).

4. Discussion

In the present study, 2-DMPI showed inhibitory activity for both brain MAO isoforms in mice, with a 30-fold higher selectivity being

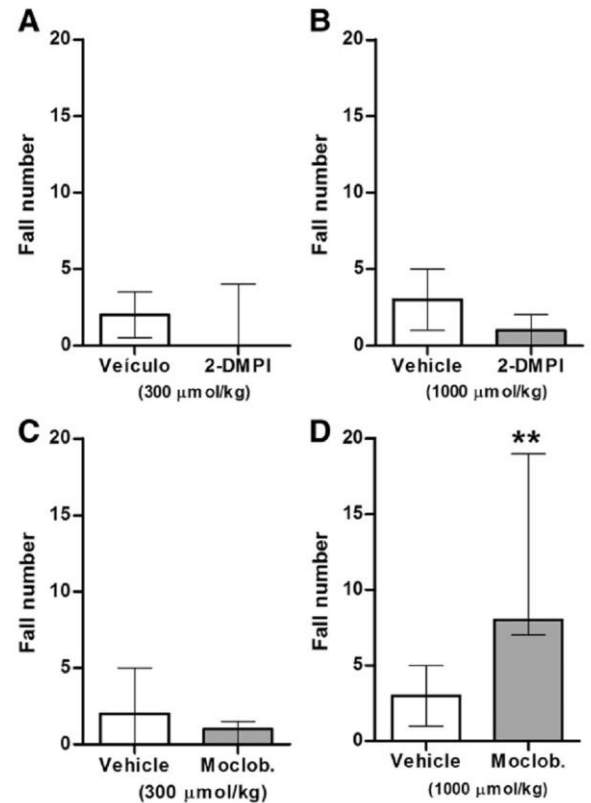


Fig. 5. Effects of 2-DMPI (300 or 1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 2 h before testing; panels A or B, respectively), moclobemide (300 or 1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., 1 h before test; panels C or D, respectively) or vehicle (10 mL/kg, s.c., 1 or 2 h before test) treatment on the fall number in the rota-rod test in mice. Values are medians (interquartile ranges) of 7–9 animals per group. ** $P < 0.01$ compared to the respective vehicle-treated group, Mann Whitney test.

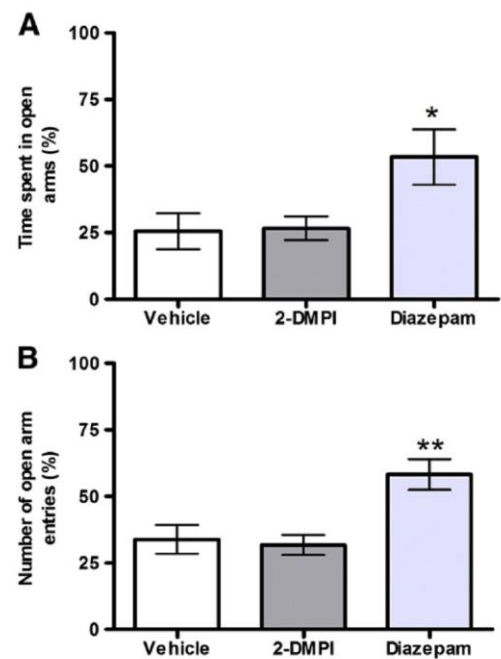


Fig. 6. Effects of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), diazepam (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 mL/kg, s.c.) administration on anxiety-related behavior in the plus-maze test in mice. (A) Percentage of time spent in open arms. (B) Percentage of open arm entries. Values are means \pm SEM for each group ($n = 9$ per group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared with vehicle- and 2-DMPI-treated groups, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls’ test.

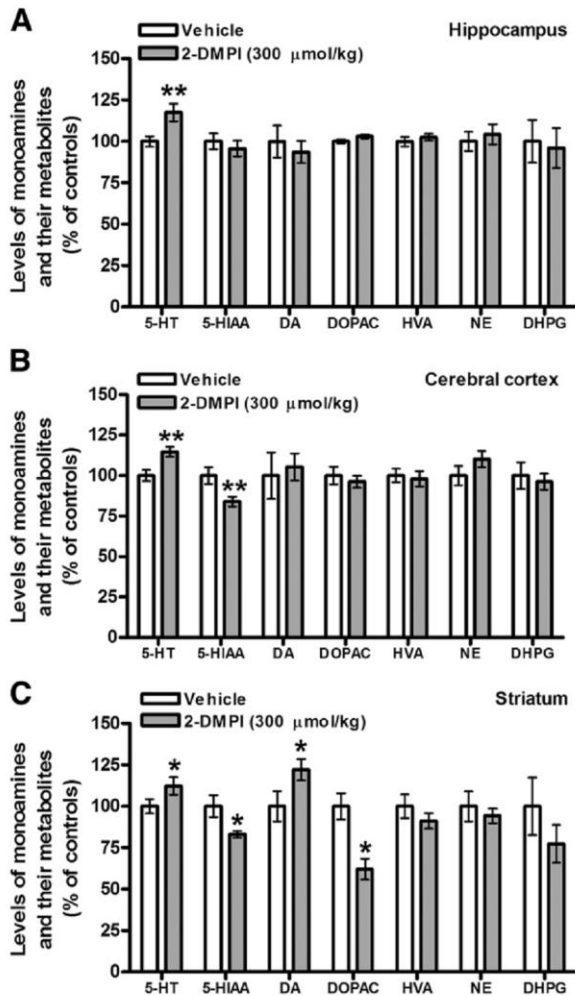


Fig. 7. Monoamines and their metabolite levels in the hippocampus (panel A), cerebral cortex (panel B) and striatum (panel C) of mice treated with vehicle or 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c.). The results are expressed as a percentage of variation versus respective controls. Each point represents the mean value \pm SEM of 7–8 animals per group. Control levels (nanograms per gram of tissue): hippocampus: 5-HT, 1589 \pm 51; 5-HIAA, 819 \pm 38; DA, 18 \pm 2; DOPAC, 123 \pm 2; HVA, 137 \pm 4; NE, 591 \pm 34; DHPG, 104 \pm 13; cerebral cortex: 5-HT, 1438 \pm 49; 5-HIAA, 488 \pm 26; DA, 126 \pm 18; DOPAC, 169 \pm 9; HVA, 191 \pm 8; NE, 470 \pm 28; DHPG, 171 \pm 14; striatum: 5-HT, 2088 \pm 89; 5-HIAA, 939 \pm 63; DA, 11280 \pm 1041; DOPAC, 2113 \pm 168; HVA, 1104 \pm 77; NE, 414 \pm 37; DHPG, 174 \pm 30; * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared to the respective vehicle-treated group, unpaired t -test.

observed toward MAO-A than MAO-B. Our present findings are in agreement with a previous study where 2-DMPI exhibited a higher selectivity toward cerebral MAO-A than MAO-B in rats (Sant'Anna et al. 2009). Because 2-DMPI was preferential inhibitor for MAO-A, kinetic experiments were carried out to further explore the inhibitory effect of 2-DMPI on MAO-A activity. We found that 2-DMPI caused a significant increase in the K_m value and decrease in the V_{max} value, exhibiting a typical profile of a mixed inhibitor. In accordance with this result, moclobemide behaved as a mixed competitive/noncompetitive MAO-A inhibitor when preincubated *in vitro* with brain homogenates before exposure to substrate (Da Prada et al., 1989). It was also observed that MAO-A activity was completely recovered after 24 h of dialysis. Thus, 2-DMPI was shown to be a mixed, reversible and preferential MAO-A inhibitor.

Several models of antidepressant-like action have been developed and used for rapid screening of novel drugs, such as the forced swim test (FST) and the TST. Similar to the FST, the TST is based on the observation that mice, after initial escape-oriented movements, develop an immobile posture when placed in an inescapable stressful

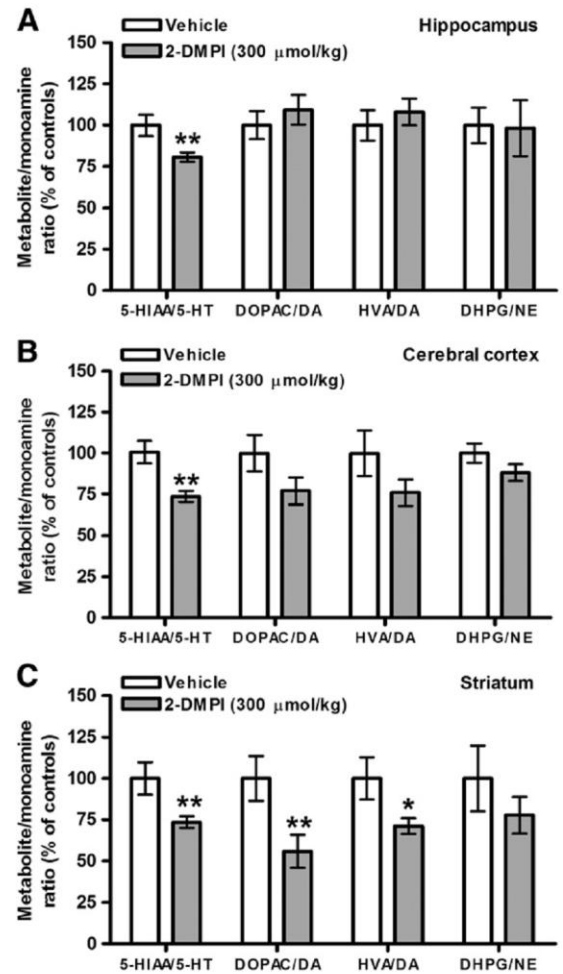


Fig. 8. Metabolite/monoamine ratios in the hippocampus (panel A), cerebral cortex (panel B) and striatum (panel C) of mice treated with vehicle or 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c.). Results are expressed as a percentage of variation versus respective controls. Each point represents the mean value \pm SEM of 7–8 animals per group. Control levels (nanograms per gram of tissue): hippocampus: 5-HIAA/5-HT, 0.52 \pm 0.03; DOPAC/DA, 7.37 \pm 0.62; HVA/DA, 8.22 \pm 0.74; DHPG/NE, 0.17 \pm 0.02; cerebral cortex: 5-HIAA/5-HT, 0.34 \pm 0.02; DOPAC/DA, 1.47 \pm 0.16; HVA/DA, 1.71 \pm 0.24; DHPG/NE, 0.37 \pm 0.02; striatum: 5-HIAA/5-HT, 0.46 \pm 0.04; DOPAC/DA, 0.20 \pm 0.03; HVA/DA, 0.10 \pm 0.01; DHPG/NE, 0.44 \pm 0.09; * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared to the respective vehicle-treated group, unpaired t -test.

situation. The TST has been argued to be less stressful than the FST and has greater pharmacological sensitivity (Cryan et al., 2005). In this study, 2-DMPI decreased the immobility time when administered subcutaneously 2 h before TST at 100, 300 and 1000 µmol/kg, exhibiting an antidepressant-like effect. Moclobemide also exhibited an antidepressant-like action, decreasing the immobility time at 100 and 300 µmol/kg. However, this agent significantly increased the immobility time at a dose of 1000 µmol/kg, due to a dysfunction in motor activity as observed in the rota-rod test. This result is in agreement with a previous study showing that moclobemide causes impairment in motor performance at higher doses (Burkard et al., 1989). The efficacy of 2-DMPI and moclobemide for reducing immobility time was similar (I_{max} values of 46 \pm 6 or 40 \pm 7% for the dose of 300 µmol/kg, respectively). In accordance with our results, other reversible MAOIs, including biefloxatone and toloxatone, have been demonstrated to be effective in reducing the immobility time in the TST (Prakhie and Oxenkrug, 1998; Steru et al., 1987).

Mice submitted to the TST are usually also tested in the open field test to dissociate locomotor stimulant action from the antidepressant-like effect of antidepressants (Steru et al., 1985). 2-DMPI, at a dose that

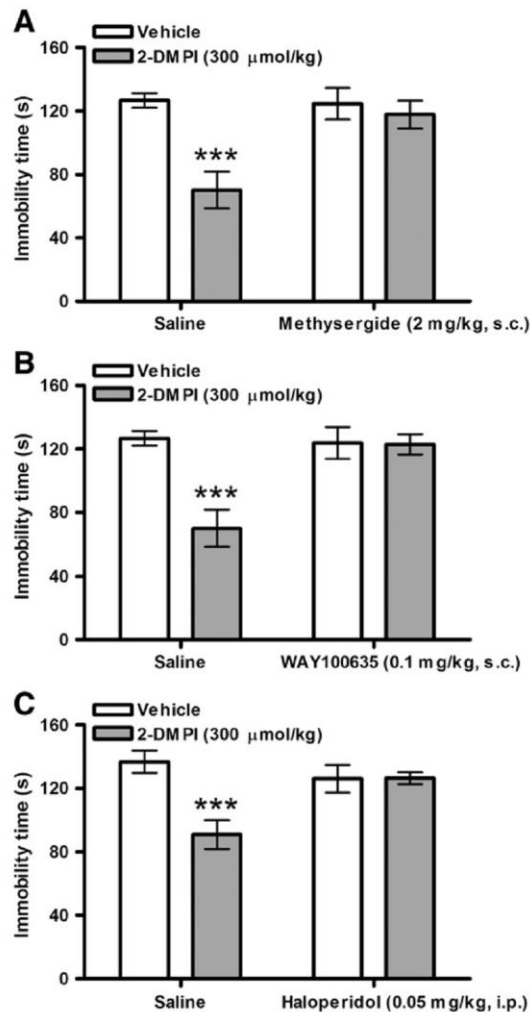


Fig. 9. Effect of pretreatment of mice with methysergide (2 mg/kg, s.c.; panel A), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; panel B) or haloperidol (0.05 mg/kg, i.p.; panel C) on the anti-immobility effect of 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c.) in the TST. Values are means \pm SEM for each group ($n = 7$ – 10 per group). *** $P < 0.001$ compared with the respective vehicle-treated group, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

was effective in the TST (300 µmol/kg, s.c.), caused no alteration in locomotor activity compared with vehicle-treated mice. The effect of 2-DMPI (300 and 1000 µmol/kg, s.c.) was also evaluated in the rotarod test, and no changes in motor coordination activity were observed. These results suggest that the antidepressant-like activity of 2-DMPI in the TST was not mediated by an unspecific stimulation of locomotor activity and that this compound did not cause any dysfunction in motor performance, even at high doses.

As some antidepressants may also possess anxiolytic properties (Liu et al., 2010), we investigated the effect of 2-DMPI on the mouse plus-maze test. Results showed that 2-DMPI did not alter the percentage of time or the percentage of entries into the open arms compared to the control, suggesting that 2-DMPI did not present anxiolytic properties. This result is in agreement with previous studies showing that acute treatment with others MAOIs, including moclobemide, phenelzine and bexlofatone, had no anxiolytic effects in several animal anxiety models (Graeff et al., 1998; Griebel et al., 1997, 1998; Hascoët et al., 2000; Holmes and Rodgers, 2003).

Monoamine neurotransmitters, such as 5-HT, NE and DA, are believed to be involved in depressive disorders and play important roles in mediating behavioral effects of antidepressant drugs (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004). In order to investigate if the antidepressant-like

effect of 2-DMPI was due to MAO-A inhibition, we measured the *ex vivo* levels of monoamines and their metabolites in three brain structures (cerebral cortex, hippocampus and striatum). It has been proposed that these brain regions might mediate certain symptoms of depression, such as cognitive abnormalities and anhedonia (Berton and Nestler, 2006). 2-DMPI, at a dose (300 µmol/kg, s.c.) and time (2 h before testing) sufficiently effective to exert an antidepressant-like effect, significantly increased 5-HT levels in the cerebral cortex and hippocampus of mouse brain. Additionally, a decrease in 5-HIAA levels was detected in the striatum and cerebral cortex. Also, there was an increase in DA levels and a decrease in DOPAC levels in the striatum of 2-DMPI-treated mice. However, NE and DHPG levels were not altered in any brain region. Thus, the antidepressant-like effect of 2-DMPI in the TST appears to be mediated by 5-HT and DA neurotransmitters but not by NE.

The ratio of the major metabolite to the corresponding monoamine is commonly used as an index of monoamine turnover (Kitanaka et al., 2005, 2006; Miura et al., 1996). In this study, 2-DMPI induced a decrease in 5-HIAA/5-HT ratios in all of the brain regions examined, indicating a reduction in 5-HT turnover. DA metabolism also was diminished but only in the striatum, as indicated by the diminution in both DOPAC/DA and HVA/DA ratios. Conversely, NE turnover was not affected in the three brain areas analyzed. These results strongly indicate that 2-DMPI exerts its antidepressant-like action by decreasing 5-HT and DA turnover, and consequently, elevating the availability of these neurotransmitters in specific regions of the brain.

As only 5-HT and DA metabolism were changed by 2-DMPI treatment, we further investigated the involvement of both serotonergic and dopaminergic systems in its antidepressant-like effect in the TST. The effects of certain pharmacological antagonists of serotonergic and dopaminergic receptors were evaluated for the anti-immobility action of 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c., 2 h before testing) in mice.

Methysergide, a non-selective 5-HT receptor antagonist, is a useful tool used to investigate the participation of the serotonergic system in behavioral responses (Duarte et al., 2008; Rodrigues et al., 2005; Zomkowski et al., 2004). In this study, the anti-immobility effect of 2-DMPI was abolished when mice were pretreated with methysergide, thereby confirming the involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect, as observed in monoamine measurement. Several studies have suggested that 5-HT_{1A} receptors are particularly relevant to the antidepressant responses of numerous antidepressant drugs (Blier and Ward, 2003; Elhwuegi, 2004). Some 5-HT_{1A} partial agonists (such as gespirone and bupirone) have been reported to exert an antidepressant activity in numerous clinical trials (Feiger, 1996; Feiger et al., 2003; Jenkins et al., 1990; McGrath et al., 1994; Robinson et al., 1990). In addition, Haddjeri et al. (1998) demonstrated that various antidepressant treatments, including MAO-A inhibition, might alleviate depression by enhancing the tonic activation of forebrain postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. In our study, the pretreatment of mice with the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 was able to prevent the anti-immobility effect produced by 2-DMPI, suggesting that this receptor subtype is involved in the mechanism for the antidepressant-like action of 2-DMPI in the TST.

Dopamine is believed to play a critical role in the neurobiology of depression and in the mechanism of action of certain antidepressant drugs (Dailly et al., 2004; Dunlop and Nemeroff, 2007; Papakostas, 2006). In addition, a dysfunction of mesolimbic and mesocortical dopaminergic pathways is primarily implicated in the melancholic and cognitive features in depression, respectively (Millan, 2004). A number of reports have suggested that depression may be linked to abnormally low DA levels and that the severity of the disorder is inversely correlated with central nervous system DA metabolite levels (Hamner and Diamond, 1996; Roy et al., 1985). In this study, the anti-immobility effect of 2-DMPI was prevented by the pretreatment of mice with the nonselective dopaminergic antagonist haloperidol, confirming the

participation of the dopaminergic system in its antidepressant-like activity in the TST. In agreement with this result, others have shown that dopaminergic agents present antidepressant-like activity in preclinical experiments. Dhir and Kulkarni (2007) showed that the D₂/D₃ agonist ropinirole presented antidepressant-like activity in both the TST and the FST. Furthermore, quinpirole (a D₂-like receptor agonist) produced a significant decrease in immobility time in the rat FST, which was blocked by haloperidol (Basso et al., 2005).

As evidence showing that antidepressants with actions on multiple neurotransmitters have therapeutic advantages over selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) increases, new antidepressant agents are likely to have this property (Nash and Nutt, 2007). Based on the pivotal role proposed for DA in depression, it has been hypothesized that a broad-spectrum antidepressant will produce a more rapid onset and/or higher efficacy than agents inhibiting the reuptake of 5-HT and/or NE (Skolnick et al., 2003). Furthermore, it is quite possible that the treatment of major depressive disorders with agents having pro-dopaminergic activity, such as MAOIs, may result in the greater resolution of certain symptoms of depression, such as fatigue, lethargy and hypersomnia, versus treatments with predominantly serotonergic or noradrenergic activity, such as the SSRIs and tricyclic antidepressants (Papakostas, 2006). Therefore, 2-DMPI could be a promising compound, as it inhibited brain MAO-A activity and presented antidepressant-like activity by a mechanism dependent of both serotonergic and dopaminergic systems.

5. Conclusion

Taken together, our results demonstrate that 2-DMPI is a new, reversible and preferential MAO-A inhibitor that exerts its antidepressant-like activity by decreasing 5-HT and DA turnover without disrupting motor performance, even at high doses. Therefore, this compound may be a prototype for the development of novel agents with potential therapeutic value for the management of depression.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), the Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil). We also acknowledge fellowships from CNPq.

References

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973;21:205–35.

Bach AWJ, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembek ME, Kwan S-W, et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:4934–8.

Basso AM, Gallagher KB, Bratcher NA, Brioni JD, Moreland RB, Hsieh GC, et al. Antidepressant-like effect of D(2/3) receptor-, but not D(4) receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1257–68.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:137–51.

Blier P, Ward NM. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* 2003;53:193–203.

Burkard WP, Bonetti EP, Da Prada M, Martin JR, Polc P, Schaffner R, et al. Pharmacological profile of moclobemide, a short-acting and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:391–9.

Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099–108.

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.

Da Prada M, Kettler R, Keller HH, Burkard WP, Muggli-Maniglio D, Haefely WE. Neurochemical profile of moclobemide, a short-acting and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:400–14.

Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:601–7.

Dhir A, Kulkarni SK. Involvement of dopamine (DA)/serotonin (5-HT)/sigma (sigma) receptor modulation in mediating the antidepressant action of ropinirole hydrochloride, a D₂/D₃ dopamine receptor agonist. *Brain Res Bull* 2007;74:58–65.

Duarte FS, Lach G, Martins PRC, Romeiro 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 Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:368–74.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 1957;46:208–9.

Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:327–37.

Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:435–51.

Feiger AD. A double-blind comparison of gepirone extended release, imipramine, and placebo in the treatment of outpatient major depression. *Psychopharmacol Bull* 1996;32:659–65.

Feiger AD, Heiser JF, Shrivastava RK, Weiss KJ, Smith WT, Sitsen JM, et al. Gepirone extended-release: new evidence for efficacy in the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 2003;64:243–9.

Ferraz AC, Anselmo-Franci JA, Perosa SR, Castro-Neto EF, Bellissimo MI, Oliveira BH, et al. Aminoacid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinolein-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:779–86.

Godoy MC, Fighera 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.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi Jr H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:237–46.

Griebel G, Perrault G, Sanger DJ. Behavioural profiles of the reversible monoamine-oxidase-A inhibitors befloxetine and moclobemide in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs. *Psychopharmacology* 1997;131:180–6.

Griebel G, Curet O, Perrault G, Sanger DJ. Behavioral effects of phenelzine in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs: correlation with changes in monoamine-oxidase activity and monoamine levels. *Neuropharmacology* 1998;37:927–35.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* 1998;18:10150–6.

Hammer MB, Diamond BI. Plasma dopamine and norepinephrine correlations with psychomotor retardation, anxiety, and depression in non-psychotic depressed patients: a pilot study. *Psychiatry Res* 1996;64:209–11.

Harfenist M, Heuser DJ, Joyner CT, Batchelor JF, White HL. Selective inhibitors of monoamine oxidase. 3. Structure-activity relationship of tricyclics bearing imidazole, oxadiazole, or tetrazole groups. *J Med Chem* 1996;39:1857–63.

Hascoët M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:339–44.

Holmes A, Rodgers RJ. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol* 2003;459:221–30.

Jenkins SW, Robinson DS, Fabre Jr LF, Andary JJ, Messina ME, Reich LA. Gepirone in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol* 1990;10:775–855.

Johnston JP. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 1968;17:1286–97.

Kitanaka N, Kitanaka J, Takemura M. Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by cloglyline, a monoamine oxidase-A inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytryptamine turnover in the striatum. *Neuroscience* 2005;130:295–308.

Kitanaka N, Kitanaka J, Takemura M. Modification of morphine-induced hyperlocomotion and antinociception in mice by cloglyline, a monoamine oxidase-A inhibitor. *Neurochem Res* 2006;31:829–37.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.

Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. *Psychopharmacology* 2010;207:535–45.

López-Muñoz F, Álamo C, Juckel G, Assion H-J. 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* 2007;27:555–9.

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 Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:421–8.

Matsumoto T, Suzuki O, Furuta T, Asai M, Kurokawa Y, Rimura Y, et al. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clin Biochem* 1985;18:126–9.

McGrath PJ, Stewart JW, Quitkin FM, Wager S, Jenkins SW, Archibald DG, et al. Gepirone treatment of atypical depression: preliminary evidence of serotonergic involvement. *J Clin Psychopharmacol* 1994;14:347–52.

Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, et al. Elevated monoamine oxidase A levels in the brain. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:1209–16.

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.

- Miura H, Naoi M, Nakahara D, Ohta T, Nagatsu T. Effects of moclobemide on forced-swimming stress and brain monoamine levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53:469–75.
- Naderi N, Haghparast A, Saber-Tehrani A, Rezaii 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.
- Nash J, Nutt D. Antidepressants. *Psychiatry* 2007;6:289–94.
- Papakostas GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006;16:391–402.
- Prakhie IV, Oxenkrug GF. The effect of nifedipine, Ca²⁺ antagonist, on activity of MAO inhibitors, N-acetylserotonin and melatonin in the mouse tail suspension test. *Int J Neuropsychopharmacol* 1998;1:35–40.
- Robinson DS. Monoamine oxidase inhibitors: a new generation. *Psychopharmacol Bull* 2002;36:124–38.
- Robinson DS, Rickels K, Feighner J, Fabre Jr LF, Gammans RE, Shrotriya RC, et al. Clinical effects of the 5-HT_{1A} partial agonists in depression: a composite analysis of buspirone in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol* 1990;10:675–76S.
- Rodrigues ALS, Rosa JM, Gadotti VM, Goulart EC, Santos MM, Silva AV, et al. Antidepressant-like and antinociceptive-like actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4'-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;82:156–62.
- Roy A, Pickar D, Linnoila M, Potter WZ. Plasma norepinephrine level in affective disorders. Relationship to melancholia. *Arch Gen Psychiatry* 1985;42:1181–5.
- 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.
- Skolnick P, Popik P, Janowsky A, Beer B, Lippa AS. "Broad spectrum" antidepressants: is more better for the treatment of depression? *Life Sci* 2003;73:3175–9.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985;85:367–70.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Mico JA, Lenegre A, Steru M, et al. The automated Tail Suspension Test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 1987;11:659–71.
- Thase ME, Trivedi MH, Rush AJ. MAOIs in the contemporary treatment of depression. *Neuropsychopharmacology* 1995;12:185–219.
- Tonello R, Villarinho JG, Sant'anna GS, Tamiozzo L, Machado P, Trevisan G, et al. The potential antidepressant-like effect of imidazoline I(2) ligand 2-BFI in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;37:15–21.
- Wong M-L, Licinio J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:136–51.
- Youdim MBH, Edmondson D, Tripton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:295–309.
- 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.

3.2. Manuscrito: Efeito antinociceptivo do 2-DMPI em um modelo de dor neuropática

Título:

The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model

Manuscrito submetido para publicação no periódico:


Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

ISSN:

0278-5846

Comprovante de submissão do manuscrito:

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Contact us Help ?  >> Important security enhancements! [Read more...](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: Villarinho Role: Author

Version: EES 2012.2

Submissions Being Processed for Author Jardel Gomes Villarinho

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model	Dec 03, 2012	Dec 03, 2012	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model

Jardel Gomes Villarinho^a, Kelly de Vargas Pinheiro^a, Francielle de Vargas Pinheiro^a, Sara Marchesan de Oliveira^b, Pablo Machado^c, Marcos Antônio Pinto Martins^c, Helio Gauze Bonacorso^c, Nilo Zanatta^c, Roselei Fachinetto^{a, b}, Juliano Ferreira^{a, b, *}

^aPrograma de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bPrograma 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.

^cNúcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Tel: + 55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8756

E-mail address: ferreiraj99@gmail.com

Abstract

Neuropathic pain is a debilitating condition that is often resistant to common analgesics, such as opioids, but is sensitive to some antidepressants, an effect that seems to be mediated by spinal cord 5-HT₃ receptors. Because the analgesic potential of monoamine oxidase-A (MAO-A) inhibitors is understudied, we evaluated the potential antinociceptive effect of the reversible MAO-A inhibitors moclobemide and 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazole (2-DMPI) in a mouse neuropathic pain model induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. Neuropathic mice showed a decreased mechanical paw withdrawal threshold (PWT) 7 days after lesion compared with the baseline PWT, characterizing the development of hyperalgesia. Moclobemide (100-300 µmol/kg, s.c.) and 2-DMPI (30-300 µmol/kg, s.c.) treatments were able to reverse the CCI-induced hyperalgesia, with 50% inhibitory dose (ID₅₀) values of 39 (18-84) and 11 (4-33) µmol/kg, and maximum inhibition (I_{max}) values of 88 ± 14 and 98 ± 15%, respectively, at the 300 µmol/kg dose. In addition, we observed a significant increase in the MAO-A activity in the lumbar spinal cord of CCI-submitted mice compared with sham-operated animals. Furthermore, the antihyperalgesic effects of both 2-DMPI and moclobemide were largely reversed by intrathecal injection of the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (10 µg/site). These results suggest a possible involvement of MAO-A in the mechanisms of neuropathic pain and a potential utility of the reversible inhibitors of MAO-A in the development of new therapeutic approaches to treat it.

Key words: neuropathy; nociception; 2-DMPI; moclobemide; chronic constriction injury.

1. Introduction

Neuropathic pain is a pathological condition that frequently results from a lesion or disease of the somatosensory nervous system (Treede *et al.*, 2008). Common complaints of neuropathic pain patients are spontaneous pain and painful hypersensitivity to mechanical, thermal and/or chemical noxious (hyperalgesia) or innocuous (allodynia) stimuli (Costigan *et al.*, 2009). The management of neuropathic pain is still a major challenge to clinicians because it is unresponsive to most of the currently used analgesic drugs (Dworkin *et al.*, 2007; Woolf and Mannion, 1999). In this regard, some antidepressants represent useful tools in neuropathic pain treatment (Sindrup *et al.*, 2005). In fact, tricyclic antidepressants, together with anticonvulsants, are considered to be first-line drugs for the treatment of neuropathic pain (Micó *et al.*, 2006).

Although antidepressants have been used for the treatment of chronic pain conditions for decades, the mechanism of this action is still unclear. Many believe that the increased availability of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and noradrenaline in the synaptic cleft is the main mechanism of the analgesic action of antidepressants (Micó *et al.*, 2006). Furthermore, 5-HT₃ receptor activation has been implicated in the antinociceptive effect of spinal serotonin by increasing the activity of the descending inhibitory pathways (Bardin *et al.*, 2000), which may be compromised in chronic pain conditions (Ardid *et al.*, 1995).

Similar to tricyclic antidepressants, monoamine oxidase (MAO) inhibitors also increase the availability of monoamines in the central nervous system (Youdim *et al.*, 2006). Although some authors have shown the analgesic properties of reversible MAO-A inhibitors, such as moclobemide, in the treatment of nociceptive and psychogenic pain (Coquoz *et al.*, 1993; Pirildar *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 1998), there are only a few preliminary studies evaluating the therapeutic potential of these drugs for neuropathic pain and their results are controversial (Apaydin *et al.*, 2001; Menkes *et al.*, 1995).

Because neuropathic pain is a debilitating condition of difficult treatment and antidepressants have long been used for the treatment of this type of pain (Sindrup *et al.*, 2005), the aim of this study was to evaluate the antinociceptive potential of the reversible MAO-A inhibitors moclobemide and 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DPMI), a novel reversible and preferential MAO-A inhibitor with

antidepressant properties (Villarinho *et al.*, 2012a), in a mouse neuropathic pain model.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Experiments were conducted using male Swiss mice (25-30 g) from our own colony. 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. Mice were kept and used in accordance with the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All experiments pertaining to this study were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number 64/2011). The number of animals and intensity of the noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. For behavioral tests, drugs were administered in a random order and the behavioral measure was carried out by a blinded investigator. Animals were allowed to adapt to the test environment for 2 h before testing.

2.2 Drugs

The synthesis of 2-DMPI was carried out by the previously reported method of condensation involving 3,4-dimethoxybenzaldehyde and ethylenediamine in the presence of *N*-bromosuccinimide under ultrasound irradiation (Sant'Anna *et al.*, 2009). Analysis of ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with the assigned structure. Moclobemide (Aurorix[®], Roche, Brazil) and 2-DMPI were dissolved in a vehicle solution (5% Tween 80, 20% polyethyleneglycol and 75% saline) and administered to mice by the subcutaneous (s.c.) route, while ondansetron (Nauseidron[®], Cristália, Brazil) was intrathecally (i.t.) injected in a volume of 5 μL , according to the technique described by Hylden and Wilcox (1980). Kynuramine dihydrobromide and selegiline hydrochloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) and

dissolved in incubation buffer. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

2.3 Measurement of mechanical hyperalgesia

In this study, we used mechanical hyperalgesia as a parameter of nociception, which was characterized by a significant decrease in the mechanical paw withdrawal threshold (PWT). The measurement of mechanical PWT was carried out using the up-and-down paradigm as previously described by Chaplan *et al.* (1994) for rats and adapted by Villarinho *et al.* (2012b) for mice. All measurements were carried out in the paw ipsilateral to the surgical or sham procedure, and the 50% mechanical PWT response was calculated from the resulting scores as previously described by Dixon (1980). The 50% PWT was expressed in grams (g) and was evaluated before (baseline) and several times after treatments or surgical procedures.

2.4 Neuropathic pain model

For induction of chronic mononeuropathy, mice were first anesthetized by intraperitoneal injection of 90 mg/kg of ketamine plus 3 mg/kg of xylazine hydrochloride. Neuropathy was induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve using a similar procedure to that previously described by Bennett and Xie (1988) for rats and adapted by Sommer *et al.* (1998) for mice. Three loosely constrictive ligatures were placed around the right sciatic nerve under anesthesia. In sham surgeries, animals were anesthetized and the sciatic nerve was exposed without performing constriction. Sham-operated animals were used as controls.

Seven days after the procedures (sham or CCI), the nociception test was carried out at time 0 (before drug injection). Then, mice were treated with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), or vehicle (10 mL/kg, s.c.), and mechanical sensitivity was measured 1, 2, 4, 6, and 24 h after treatment (time-course curve). For the dose-response curve, CCI-submitted animals received a single injection of 2-DMPI (3, 30, or 300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), moclobemide (30, 100, or 300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), or vehicle 2 h before the nociceptive test. To assess the involvement of the serotonergic system in the antinociceptive effect of reversible MAO-A inhibitors, mice received an intrathecal injection of the 5-HT₃ receptor antagonist

ondansetron (10 µg/site) or phosphate buffered saline (PBS; 5 µL/site), 30 min before the peak effect of the drugs (90 min after subcutaneous injection of 2-DMPI or moclobemide). The mechanical paw withdrawal threshold was measured 30 min later. The dose of ondansetron was selected based on the results of a previous study (Dogrul *et al.*, 2012).

2.5 Determination of MAO-A activity

For MAO-A activity measurement, mice submitted to surgical procedure (sham or CCI) were killed 7 days after the surgical procedure and different central nervous system structures (lumbar spinal cord, cerebral cortex, and striatum) were collected and homogenized in assay buffer (16.8 mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, and 3.6 mM KCl, pH 7.4). The MAO-A activity was measured by a fluorometric method that detects the formation of the fluorescent product 4-hydroxyquinoline (4-HQ) from kynuramine, as previously described (Matsumoto *et al.*, 1985; Villarinho *et al.*, 2012b). Briefly, assays were performed in a reaction mix containing assay buffer, brain homogenates (0.25 mg of protein), the selective MAO-B inhibitor selegiline (250 nM), and kynuramine (100 µM) and were incubated at 37 °C for 30 min. The results were expressed as nmol of 4-HQ/min/mg of protein.

2.6 Statistical analyses

The results are expressed as the means ± S.E.M., except for the ID₅₀ values (i.e., the drug dose that reduces nociceptive responses by 50% relative to the control value), which are expressed as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. ID₅₀ values were determined by non-linear regression using a sigmoidal dose–response with a variable slope equation. The percentages of maximum inhibition (I_{max}) were calculated for the maximal developed responses in comparison with vehicle-treated animals. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software. Differences among groups were evaluated with an unpaired t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test, or two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, as appropriate. Reported F values were obtained from two-way ANOVA analysis and

indicate the interaction between time and treatment factors. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of reversible MAO-A inhibitors on CCI-induced hyperalgesia

Mechanical nociceptive thresholds were stable before and after the sham procedure in both vehicle and moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.)-treated mice (Fig. 1A; $F(6,72)=0.56$, $P=0.763$). On the other hand, CCI of the sciatic nerve decreased the mean PWT of the ipsilateral hind paw by approximately 85% seven days after lesion (time 0) compared with the mean baseline PWT (1.30 ± 0.11 g before CCI and 0.20 ± 0.02 g after CCI). The hyperalgesia produced by CCI was maintained throughout the experiment in vehicle-treated mice, but it was reversed by moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) from 1 to 4 h after treatment (Fig. 1B; $F(6,72)=13.55$, $P < 0.001$). Moclobemide also presented an antinociceptive effect at 100 $\mu\text{mol/kg}$, but not at 30 $\mu\text{mol/kg}$ (Fig. 1C; $F(6,46)=4.87$, $P < 0.001$), with an ID_{50} value of 39 (18-84) $\mu\text{mol/kg}$ and an I_{max} value of $81 \pm 10\%$.

The paw withdrawal threshold of sham-operated animals treated with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) was not significantly different from vehicle-treated mice (Fig. 2A; $F(6,60)=0.16$, $P=0.987$). However, the administration of 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) in the CCI-submitted mice produced an antihyperalgesic effect from 1 to 6 h after treatment (Fig. 2B; $F(6,72)=7.36$, $P < 0.001$). An antinociceptive effect was also observed 2 h after treatment with 2-DMPI at 30 $\mu\text{mol/kg}$, but not at 3 $\mu\text{mol/kg}$ (Fig. 2C; $F(6,54)=3.87$, $P < 0.01$), with values of ID_{50} and I_{max} of 11 (4-33) $\mu\text{mol/kg}$ and $99 \pm 12\%$, respectively.

3.2 *Ex vivo* MAO-A activity in sham-operated or CCI-submitted mice

A significant increase in MAO-A activity was observed in the lumbar spinal cord of CCI-submitted mice compared with sham-operated animals (Fig. 3). However, CCI did not change the MAO-A activity in the cerebral cortex or the striatum (Fig. 3).

3.3 Effect of intrathecal administration of a 5-HT₃ receptor antagonist on the antihyperalgesic effect of reversible MAO-A inhibitors

Intrathecal administration of ondansetron (10 µg/site; 90 min after subcutaneous injection of vehicle, 2-DMPI, or moclobemide), a 5-HT₃ receptor antagonist, largely reversed the antihyperalgesic effect of the reversible MAO-A inhibitors moclobemide (300 µmol/kg, s.c.; $F(6,50)=5.82$, $P<0.001$) and 2-DMPI (300 µmol/kg, s.c.; $F(6,56)=12.39$, $P<0.001$) (Fig. 4A and 4B). Furthermore, ondansetron (10 µg/site, i.t.) did not change the mechanical paw withdrawal threshold of CCI-submitted mice treated subcutaneously with vehicle (Fig. 4A and 4B).

4. Discussion

Neuropathic pain is triggered by lesions to the somatosensory nervous system that alter its structure and function so that pain occurs spontaneously and responses to noxious and innocuous stimuli are pathologically amplified (Costigan *et al.*, 2009). The treatment of neuropathic pain is challenging, in part because of its multiple etiologies, symptoms and underlying mechanisms (Bridges *et al.*, 2001; Stacey, 2005). Antidepressants have been successfully used for the treatment of this type of chronic pain (Sindrup *et al.*, 2005).

In this study, we evaluated the potential antinociceptive action of two antidepressants, the reversible MAO-A inhibitors moclobemide and 2-DMPI, in a mouse model of neuropathic pain. Both moclobemide and 2-DMPI presented a long-lasting and efficacious antinociceptive effect in CCI-submitted mice. In accordance with previous data showing that 2-DMPI exhibited a potency five-fold higher than moclobemide at inhibiting MAO-A activity (Villarinho *et al.*, 2012a), 2-DMPI was approximately four times more potent than moclobemide at reducing the hyperalgesia induced by CCI.

Consistent with our results, there is increasing evidence supporting the analgesic potential of MAO-A inhibitors (Apaydin *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 1992; Coquoz *et al.*, 1993; Dina *et al.*, 2008; Pirildar *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 1998). The selective and irreversible MAO-A inhibitor clorgyline produced an antiallodynic

effect in a model of alcoholic neuropathy in rats (Dina *et al.*, 2008). Moreover, Apaydin *et al.* (2001) demonstrated in a preliminary report that moclobemide attenuated mechanical hyperalgesia in rats submitted to mild sciatic nerve compression. However, the authors did not investigate the mechanism underlying this antinociceptive effect or possible changes in MAO-A activity in this neuropathic pain model.

To explore whether chronic constriction of the sciatic nerve could induce any alteration of MAO-A in specific central nervous system structures (lumbar spinal cord, striatum and cerebral cortex) implicated in pain modulation (Millan, 2002), MAO-A activity was measured in sham-operated and CCI-submitted mice. The activity of MAO-A in the lumbar spinal cord was shown to be increased in mice subjected to CCI. To our knowledge, this is the first study showing changes in the MAO-A activity in the lumbar spinal cord of neuropathic mice, suggesting a possible involvement of this enzyme in the pathophysiological mechanisms of CCI neuropathic pain model.

Chronic constriction of the sciatic nerve could lead to a decrease in the availability of the neurotransmitter serotonin, which plays a critical role in descending pain modulation pathways (Millan, 2002), by increasing the MAO-A activity in the lumbar spinal cord. Previous studies have demonstrated that the serotonin level is markedly decreased in some central nervous system structures involved in pain pathways, including the cerebral cortex, the ventrobasal thalamus, the raphe magnus nucleus, and the spinal cord in various neuropathic pain models (Goettl *et al.*, 2002; Hains *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Sandrini *et al.*, 1997; Sounvoravong *et al.*, 2004). Furthermore, Vogel *et al.* (2003) showed a decrease in serotonin levels in the lumbar spinal cord of CCI-submitted mice. Because spinal levels of serotonin are important for the antinociceptive effect of many drugs (Alloui *et al.*, 2002; Arcioni *et al.*, 2002; Bilge *et al.*, 2012; Kawamata *et al.*, 2002; Kawamura *et al.*, 1998; Pelissier *et al.*, 1996), 2-DMPI and moclobemide could be exerting their analgesic effect by inhibiting MAO-A activity and consequently increasing the levels of serotonin in the spinal cord.

Although descending serotonergic pathways have been implicated in both inhibitory and facilitatory modulation of spinal neuronal activity (Millan, 2002), several studies have demonstrated that the activation of 5-HT₃ receptors in the spinal cord has an antinociceptive effect (Alhaider *et al.*, 1991; Bardin *et al.*, 2000; Giordano, 1991). In the present study, mice were intrathecally injected with the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron to evaluate if the antinociceptive effects of the reversible

MAO-A inhibitors 2-DMPI and moclobemide were mediated by the spinal serotonergic system. The antinociceptive effects of 2-DMPI and moclobemide were largely reversed by the intrathecal injection of ondansetron. In accordance with our results, Nakajima *et al.* (2012) demonstrated that the intrathecal treatment with ondansetron abolished the antihyperalgesic effect of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine in a neuropathic pain model in rats.

Furthermore, some studies have shown that the intrathecal administration of the selective 5-HT₃ receptor agonist chlorophenylbiguanide (m-CPBG) produced antiallodynic effects in neuropathic rats, which appear to be mediated by γ -amino butyric acid (GABA)ergic inhibitory synaptic transmission (Hayashida *et al.*, 2012; Okazaki *et al.*, 2008). Moreover, previous studies showed that the 5-HT_{3A} receptor subunit is present in GABAergic and enkephalinergic neurons (Huang *et al.*, 2008) and that the activation of 5-HT₃ receptors evokes GABA release (Kawamata *et al.*, 2003) in the spinal dorsal horn, suggesting that 5-HT₃ receptor activation underlies the antinociceptive effect of serotonin at the spinal cord level. Therefore, by increasing the spinal levels of serotonin, the reversible MAO-A inhibitors 2-DMPI and moclobemide could activate 5-HT₃ receptors on inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn, which can inhibit pain by increasing the release of inhibitory transmitters.

Finally, the highest tested dose (300 μ mol/kg) of 2-DMPI and moclobemide did not affect the paw withdrawal threshold in sham-operated mice at any time measured compared with the baseline withdrawal threshold (measured before surgery procedure), indicating that these reversible MAO-A inhibitors might be effective in neuropathic pain states, without affecting physiological protective pain. In a previous study (Villarinho *et al.*, 2012a), 2-DMPI presented fewer adverse effects than moclobemide because the latter caused a deficit in the motor activity of mice at the highest dose tested (1000 μ mol/kg). Thus, 2-DMPI may be a prototype for the development of new and safer reversible inhibitors of MAO-A with a potential therapeutic value for the treatment of neuropathic pain conditions.

5. Conclusion

Taken together, the results of the present study showed that 2-DMPI and moclobemide presented an antinociceptive effect in the CCI neuropathic pain model

in mice, which appears to be related to the activation of spinal serotonergic 5-HT₃ receptors. Furthermore, CCI-submitted mice presented an increase in MAO-A activity in the lumbar spinal cord, suggesting a possible involvement of this enzyme in the mechanism of neuropathic pain and a potential utility for reversible MAO-A inhibitors in the development of new therapeutic approaches.

6. Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brazil). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

7. References

- Alhaider, A.A., Lei, S.Z., Wilcox, G.L., 1991. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J. Neurosci.* 11, 1881-1888.
- Alloui, A., Chassaing, C., Schmidt, J., Ardid, D., Dubray, C., Cloarec, A., *et al.*, 2002. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 443, 71-77.
- Apaydin, S., Goldeli, E., Uyar, M., Erhan, E., Yegul, I., Tuglular, I., 2001. The antinociceptive effect of moclobemide on the vocalization threshold to paw pressure in a rat model of unilateral mononeuropathy. *Pharmacol. Res.* 44, 503-507.
- Arcioni, R., della Rocca, M., Romanò, S., Romano, R., Pietropaoli, P., Gasparetto, A., 2002. Ondansetron inhibits the analgesic effects of tramadol: a possible 5-HT₃ spinal receptor involvement in acute pain in humans. *Anesth. Analg.* 94, 1553-1557.

- Ardid, D., Jourdan, D., Mestre, C., Villanueva, L., Le Bars, D., Eschalier, A., 1995. Involvement of bulbospinal pathways in the antinociceptive effect of clomipramine in the rat. *Brain Res.* 695, 253-256.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschalier, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86, 11-18.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Bianchi, M., Mantegazza, P., Panerai, A.E., 1992. Effects of two different reversible monoamine oxidase-A inhibitors on nociceptive thresholds in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 219, 113-116.
- Bilge, S.S., Bozkurt, A., Ilkaya, F., Ciftcioğlu, E., Kesim, Y., Uzbay, T.I., 2012. The antinociceptive effects of intravenous tianeptine in colorectal distension-induced visceral pain in rats: the role of 5-HT₃ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 681, 44-49.
- Bridges, D., Thompson, S.W., Rice, A.S., 2001. Mechanisms of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* 87, 12-26.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55-63.
- Coquoz, D., Porchet, H.C., Dayer, P., 1993. Central analgesic effects of desipramine, fluvoxamine, and moclobemide after single oral dosing: a study in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 339-344.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J., 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 1-32.
- Dina, O.A., Khasar, S.G., Alessandri-Haber, N., Bogen, O., Chen, X., Green, P.G., *et al.*, 2008. Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1180-1190.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441-462.

- Dogrul, A., Seyrek, M., Akgul, E.O., Cayci, T., Kahraman, S., Bolay, H., 2012. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 677:93-101.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., *et al.*, 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237-251.
- Giordano, J., 1991. Analgesic profile of centrally administered 2-methylserotonin against acute pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 199, 233-236.
- Goettl, V.M., Huang, Y., Hackshaw, K.V., Stephens, R.L. Jr., 2002. Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. *Pain* 99, 359-366.
- Hains, B.C., Everhart, A.W., Fullwood, S.D., Hulsebosch, C.E., 2002. Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. *Exp. Neurol.* 175, 347-362.
- Hayashida, K., Kimura, M., Yoshizumi, M., Hobo, S., Obata, H., Eisenach, J.C., 2012. Ondansetron reverses antihypersensitivity from clonidine in rats after peripheral nerve injury: role of γ -aminobutyric acid in α_2 -adrenoceptor and 5-HT₃ serotonin receptor analgesia. *Anesthesiology* 117, 389-398.
- Huang, J., Wang, Y.Y., Wang, W., Li, Y.Q., Tamamaki, N., Wu, S.X., 2008. 5-HT_{3A} receptor subunit is expressed in a subpopulation of GABAergic and enkephalinergic neurons in the mouse dorsal spinal cord. *Neurosci. Lett.* 441, 1-6.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313-316.
- Kawamata, T., Omote, K., Toriyabe, M., Kawamata, M., Namiki, A., 2002. Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. *Anesthesiology* 96, 1175-1182.

- Kawamata, T., Omote, K., Toriyabe, M., Yamamoto, H., Namiki, A., 2003. The activation of 5-HT₃ receptors evokes GABA release in the spinal cord. *Brain Res.* 978, 250-255.
- Kawamura, M., Ohara, H., Go, K., Koga, Y., Ienaga, K., 1998. Neurotropin induces antinociceptive effect by enhancing descending pain inhibitory systems involving 5-HT₃ and noradrenergic alpha₂ receptors in spinal dorsal horn. *Life Sci.* 62, 2181-2190.
- Liu, F.Y., Qu, X.X., Ding, X., Cai, J., Jiang, H., Wan, Y., *et al.*, 2010. Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res.* 1330, 45-60.
- Matsumoto, T., Suzuki, O., Furuta, T., Asai, M., Kurokawa, Y., Rimura, Y., *et al.*, 1985. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clin. Biochem.* 18, 126-129.
- Menkes, D.B., Fawcett, J.P., Busch, A.F., Jones, D., 1995. Moclobemide in chronic neuropathic pain: preliminary case reports. *Clin. J. Pain* 11, 134-138.
- Micó, J.A., Ardid, D., Berrocoso, E., Eschalier, A., 2006. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 348-354.
- Millan, M. J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474.
- Nakajima, K., Obata, H., Iriuchijima, N., Saito, S., 2012. An increase in spinal cord noradrenaline is a major contributor to the antihyperalgesic effect of antidepressants after peripheral nerve injury in the rat. *Pain* 153, 990-997.
- Okazaki, R., Namba, H., Yoshida, H., Okai, H., Miura, T., Kawamura, M., 2008. The antiallodynic effect of Neurotropin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. *Anesth. Analg.* 107, 1064-1069.
- Pelissier, T., Alloui, A., Caussade, F., Dubray, C., Cloarec, A., Lavarenne, J., *et al.*, 1996. Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: in vivo and in vitro evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 8-14.

- Pirildar, S., Sezgin, U., Elbi, H., Uyar, M., Zileli, B., 2003. A preliminary open-label study of moclobemide treatment of pain disorder. *Psychopharmacol. Bull.* 37, 127-134.
- Sandrini, M., Vitale, G., Vergoni, A.V., Ottani, A., Bertolini, A., 1997. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci.* 60, 1393-1397.
- Sant'Anna, G.S., Machado, P., Sauzem, P.D., Rosa, F.A., Rubin, M.A., Ferreira, J., *et al.*, 2009. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 546-549.
- Schreiber, S., Getslev, V., Weizman, A., Pick, C.G., 1998. The antinociceptive effect of moclobemide in mice is mediated by noradrenergic pathways. *Neurosci. Lett.* 253, 183-186.
- Sindrup, S.H., Otto, M., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., *et al.*, 2005. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 399-409.
- Sommer, C., Schmidt, C., George, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp. Neurol.* 151, 138-142.
- Sounvoravong, S., Nakashima, M.N., Wada, M., Nakashima, K., 2004. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 484, 217-223.
- Stacey, B.R., 2005. Management of peripheral neuropathic pain. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 84, S4-S16.
- Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., *et al.*, 2008. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70, 1630-1635.
- Villarinho, J.G., Fachineto, R., Pinheiro, F.D., Sant'Anna, G.D., Machado, P., Dombrowski, P.A., *et al.*, 2012a. Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39, 31-39.

Villarinho, J.G., Oliveira, S.M., Silva, C.R., Cabreira, T.N., Ferreira, J., 2012b. Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 690, 107-114.

Vogel, C., Mössner, R., Gerlach, M., Heinemann, T., Murphy, D.L., Riederer, P., *et al.*, 2003. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J. Neurosci.* 23, 708-715.

Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353, 1959-1964.

Youdim, M.B.H., Edmondson, D., Tripton, K.F., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:295-309.

8. Figures

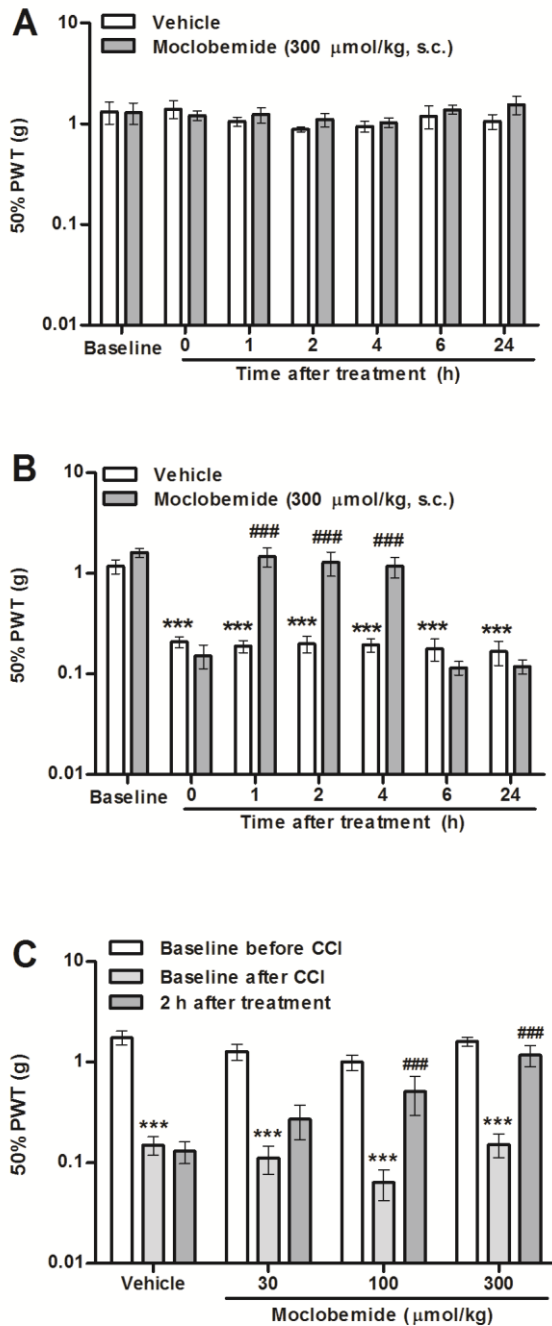


Fig. 1. Effect of moclobemide treatment on the mechanical nociceptive threshold in a mouse neuropathic pain model. (A) Time-course curve of the paw withdrawal threshold (PWT) in sham-operated mice treated with moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=7$ per group). (B) Time-course curve of the PWT in chronic constriction injury (CCI)-submitted mice treated with moclobemide (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=7$ per group). *** $P<0.001$ compared with the baseline PWT (one-way ANOVA with repeated measures followed by the Student-Newman-Keuls test); ### $P<0.001$ compared with the respective control group (two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's test). (C) Dose-response curve of PWT in CCI-submitted mice treated with moclobemide (30, 100 or 300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=6-7$ per group). *** $P<0.001$ compared with the respective PWT before CCI; ### $P<0.001$ compared with the respective PWT after CCI (two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's test). Data are expressed as the means \pm S.E.M.

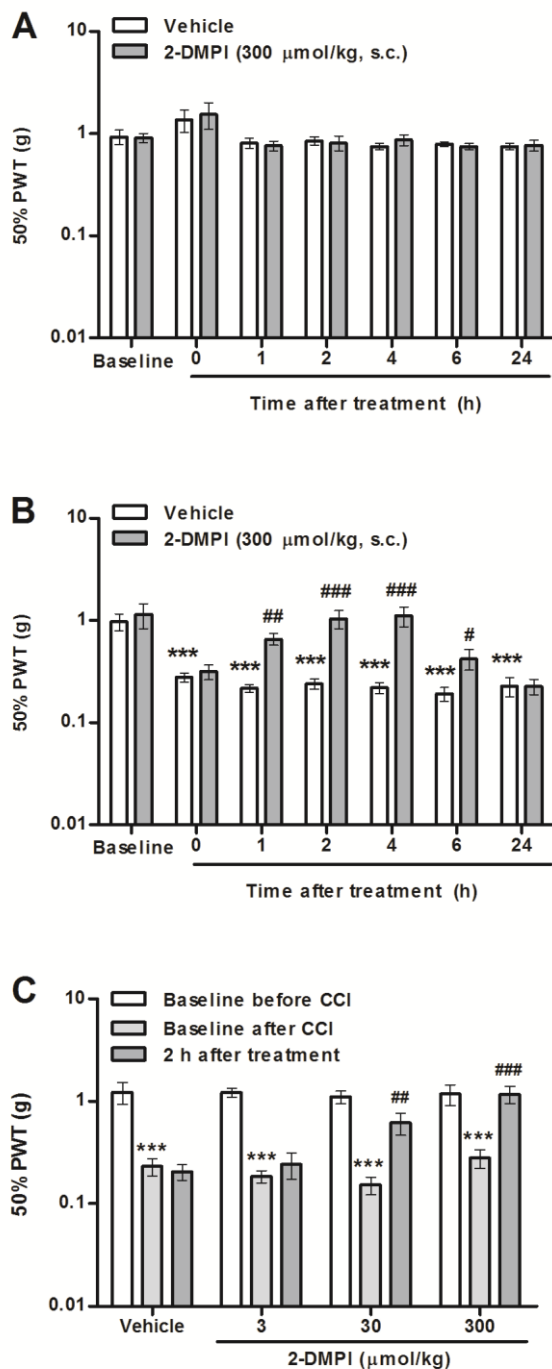


Fig. 2. Effect of 2-DMPI treatment on the mechanical nociceptive threshold in a mouse neuropathic pain model. (A) Time-course curve of the paw withdrawal threshold (PWT) in sham-operated mice treated with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=6$ per group). (B) Time-course curve of the PWT in chronic constriction injury (CCI)-submitted mice treated with 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=7$ per group). *** $P<0.001$ compared with the baseline PWT (one-way ANOVA with repeated measures followed by the Student-Newman-Keuls test); # $P<0.05$, ## $P<0.01$ or ### $P<0.001$ compared with the respective control group (two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's test). (C) Dose-response curve of the PWT in CCI-submitted mice treated with 2-DMPI (3, 30 or 300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) or vehicle ($n=7-8$ per group). *** $P<0.001$ compared with the respective PWT before CCI; ## $P<0.01$ or ### $P<0.001$ compared with the respective PWT after CCI (two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's test). Data are expressed as the means \pm S.E.M.

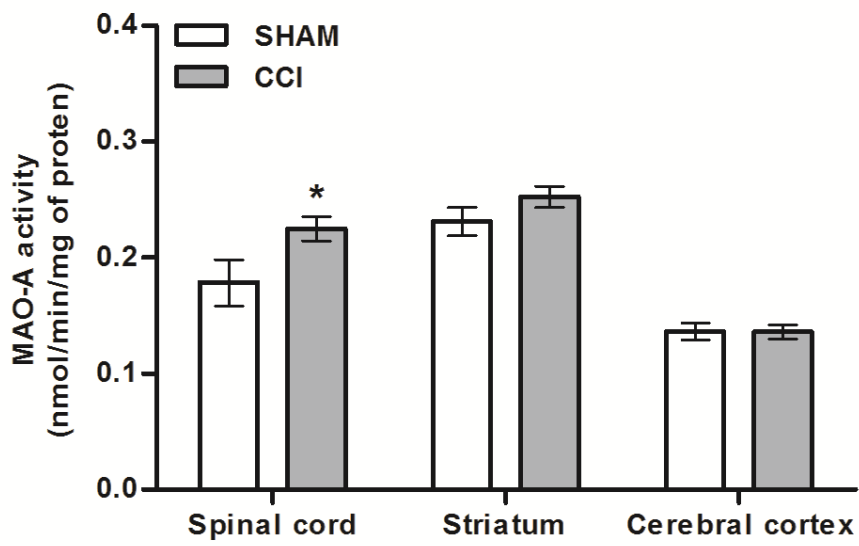


Fig. 3. Monoamine oxidase-A (MAO-A) activity in the lumbar spinal cord, striatum and cerebral cortex of sham-operated or chronic constriction injury (CCI)-submitted mice (n=6-8 per group). *P<0.05 compared with sham-operated mice (unpaired t-test). Data are expressed as the means \pm S.E.M.

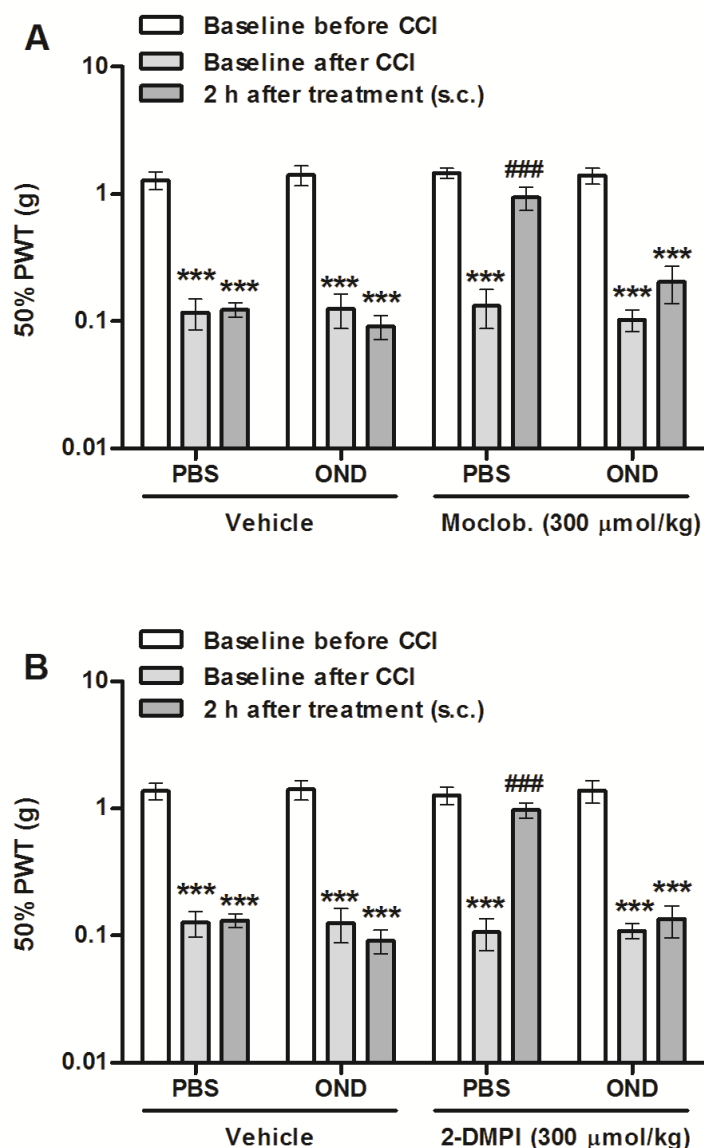


Fig. 4. Effects of intrathecal treatment with the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (10 µg/site; 90 min after s.c. treatment) or phosphate buffered saline (PBS) on the antihyperalgesic effect of the reversible MAO-A inhibitors (A) moclobemide (300 µmol/kg) and (B) 2-DMPI (300 µmol/kg), administered subcutaneously 2 h before the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) measurement, in chronic constriction injury (CCI)-submitted mice (n=7-8 per group). ***P<0.001 compared with the respective PWT before CCI; ###P<0.001 compared with the respective PWT after CCI (two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's test). Data are expressed as the means ± S.E.M.

4. DISCUSSÃO

A depressão é uma doença psiquiátrica crônica que atinge em torno de 20% da população mundial ao longo da vida (BERTON & NESTLER, 2006). A principal hipótese postulada para explicar a patofisiologia da depressão é a hipótese das monoaminas, segundo a qual há uma deficiência na neurotransmissão monoaminérgica no cérebro de pacientes depressivos (BELMAKER & AGAM, 2008). Há vários fármacos antidepressivos no mercado, sendo que quase todos exercem seus efeitos farmacológicos via modulação da neurotransmissão monoaminérgica, em particular nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (WONG & LICINIO, 2004). Dentre eles encontram-se os inibidores da MAO-A, os quais foram os primeiros antidepressivos introduzidos na clínica e continuam sendo usados com grande sucesso, especialmente em paciente refratários a outros tratamentos (BERTON & NESTLER, 2006).

A MAO é uma enzima responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (YOU DIM *et al.*, 2006). Nesse estudo nós avaliamos o efeito de um composto imidazólico, o 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1H-imidazol (2-DMPI), sobre a atividade da MAO-A e da MAO-B, *in vitro*, em encéfalo de camundongos. Foi observado que o 2-DMPI foi capaz de inibir ambas as isoformas da MAO, sendo aproximadamente trinta vezes mais seletivo em inibir a MAO-A. Esse resultado está de acordo com o estudo prévio mostrando que o 2-DMPI apresentou maior seletividade em inibir a MAO-A do que a MAO-B em encéfalo de ratos (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Após a realização de experimentos cinéticos e de reversibilidade, a inibição da MAO-A produzida pelo 2-DMPI foi caracterizada como sendo uma inibição mista e reversível. Desta maneira, o 2-DMPI através da inibição da MAO-A poderia apresentar um potencial antidepressivo.

Mimetizar a depressão em animais de laboratório é bastante difícil, devido à complexidade da doença e aos inúmeros sintomas que não podem ser reproduzidos e mensurados nesses animais, como pensamentos recorrentes em morte, suicídio e sentimentos de culpa excessiva (CRYAN *et al.*, 2005). Contudo, diversos testes que expõem os animais a situações estressantes inevitáveis têm demonstrado eficácia em predizer fármacos com potencial antidepressivo. Dentre esses testes, encontra-se o teste de suspensão da cauda (TSC), no qual o camundongo é suspenso por sua cauda de maneira que o mesmo não possa escapar. Após um período inicial em que o animal realiza movimentos tentando escapar, uma postura imóvel é

observada, sendo o tempo de imobilidade o parâmetro analisado nesse teste (STERU *et al.*, 1985). Outro teste bastante semelhante ao TSC é o teste do nado forçado (TNF), no qual o animal é colocado em um cilindro com água do qual o mesmo não possa escapar. Nesse teste o animal também apresenta períodos de imobilidade, em que permanece flutuando passivamente, intercalados com períodos de movimentos intensos tentando escapar dessa situação estressante (PORSOLT *et al.*, 1977). Em ambos os testes, quando os animais são pré-tratados com um fármaco antidepressivo, eles permanecem menos tempo imóveis, caracterizando um efeito tipo-antidepressivo. No presente trabalho, nós utilizamos o TSC, uma vez que o mesmo parece ser menos estressante e apresentar maior sensibilidade farmacológica do que o TNF (CRYAN *et al.*, 2005).

O 2-DMPI (100-1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) apresentou um efeito tipo-antidepressivo, diminuindo significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC. Além disso, o 2-DMPI (300 ou 1000 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) não causou nenhuma alteração nas atividades de locomoção espontânea e de coordenação motora, conforme avaliado nos testes do campo aberto e do cilindro giratório, respectivamente. Já o inibidor reversível e seletivo da MAO-A moclobemida, utilizado como controle positivo, também apresentou um efeito antidepressivo nas doses de 100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$, contudo causou um aumento significativo no tempo de imobilidade na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$. Esse efeito reflete uma ação inespecífica da dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ de moclobemida sobre a atividade motora dos animais, como observado no teste do cilindro giratório. Esse resultado está de acordo com um estudo prévio demonstrando que a moclobemida, em doses elevadas, pode causar prejuízo no desempenho motor dos animais (BURKARD *et al.*, 1989). Além disso, a eficácia do 2-DMPI e da moclobemida em reduzir o tempo de imobilidade no TSC foi bastante similar. Esses dados mostram que o 2-DMPI apresenta um efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem causar efeitos inespecíficos sobre a atividade motora dos animais.

A fim de verificar se o efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI realmente era devido à inibição da MAO e consequente alteração nos níveis de monoaminas no SNC, foram medidos os níveis das monoaminas serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) e seus metabólitos em diferentes regiões cerebrais (córtex, hipocampo e estriado). Foi observado que o 2-DMPI causou um aumento nos níveis de serotonina no córtex cerebral, no hipocampo e no estriado, assim como uma diminuição do metabólito dessa monoamina, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA),

no córtex cerebral e no estriado. Também foi observado um aumento nos níveis de dopamina e uma diminuição nos níveis de seu metabólito, o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), em estriado. Os níveis de noradrenalina e seu metabólito diidroxifenilglicol (DHPG) não foram alterados em nenhuma das estruturas analisadas. A razão entre o nível de metabólito e o nível da monoamina correspondente pode ser utilizado como um índice de renovação da monomina (KITANAKA *et al.*, 2005, 2006; MIURA *et al.*, 1996). Nesse estudo, o 2-DMPI diminui a razão 5-HIAA/5-HT em todas as regiões cerebrais analisadas, levando a uma redução da renovação da serotonina. O metabolismo da dopamina também foi diminuído, mas somente no estriado, como indicado pelas razões DOPAC/DA e ácido homovanílico (HVA)/DA. Contudo, o metabolismo da noradrenalina não foi alterado em nenhuma das regiões testadas. Dessa maneira, o 2-DMPI parece exercer seu efeito tipo-antidepressivo por diminuir a renovação da serotonina e da dopamina e conseqüentemente aumentar a disponibilidade desses neurotransmissores em locais cerebrais específicos.

Para confirmar a participação dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico no efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI, os animais foram pré-tratados com antagonistas de receptores serotoninérgicos ou dopaminérgicos. A metisergida, um antagonista não seletivo dos receptores serotoninérgicos, é uma ferramenta farmacológica bastante utilizada para investigar a participação do sistema serotoninérgico em respostas comportamentais (DUARTE *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2005; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004). Nesse estudo, o efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI foi prevenido pelo pré-tratamento com metisergida, confirmando o envolvimento do sistema serotoninérgico. Vários estudos têm indicado que os receptores 5-HT_{1A} estão particularmente envolvidos no efeito antidepressivo de diversos fármacos (BLIER & WARD, 2003; FEIGER, 1996; ELHWUEGI, 2004; FEIGER *et al.*, 2003; MCGRATH *et al.*, 1994; JENKINS *et al.*, 1990; ROBINSON *et al.*, 1990). No presente estudo, a diminuição do tempo de imobilidade produzido pelo 2-DMPI foi abolida pelo pré-tratamento dos camundongos com o antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} WAY100635, sugerindo que este receptor é importante para o efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI. Em concordância com os nossos resultados, Luscombe e colaboradores (1993) demonstraram que o agonista 5-HT_{1A} 8-hidroxi-2-(dipropilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) produziu um efeito tipo-antidepressivo no TNF em camundongos, o qual foi mediado por receptores 5-HT_{1A}

pós-sinápticos. Além disso, em outro estudo foi demonstrado que o efeito-tipo-antidepressivo dos agonistas 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e bupiriona no TNF em ratos foram bloqueados pelos antagonistas 5-HT_{1A} NAN 190, BMY 7378 e pindolol (DETKE *et al.*, 1995).

A dopamina também parece exercer um papel importante na patofisiologia da depressão e no mecanismo de ação de alguns fármacos antidepressivos (DAILLY *et al.*, 2004; DUNLOP & NEMEROFF, 2007; HAMNER & DIAMOND, 1996; MILLAN, 2004; PAPAKOSTAS, 2006; ROY *et al.*, 1985). Além disso, estudos de neuroimagem têm encontrado um aumento de receptores D₂/D₃ no gânglio basal (D'HAENEN & BOSSUYT, 1994) e no estriado (SHAH *et al.*, 1997) e uma diminuição de transportadores de dopamina (MEYER *et al.*, 2001) em pacientes deprimidos, quando comparados com sujeitos saudáveis. Em nosso trabalho, o antagonista não seletivo dos receptores dopaminérgicos haloperidol foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI, confirmando o envolvimento do sistema dopaminérgico.

Existem evidências crescentes que fármacos com ação em múltiplos sistemas de neurotransmissores possuem vantagens terapêuticas em relação aos que agem seletivamente sobre uma única monoamina (NASH & NUTT, 2007). Além disso, acredita-se que fármacos com ação pró-dopaminérgica, como os inibidores da MAO, possam ser mais eficazes no tratamento de certos sintomas da depressão, como fadiga, letargia, anedonia e hipersonia, do que os fármacos com ação predominantemente serotoninérgica e/ou noradrenérgica, como os SSRIs e os antidepressivos tricíclicos (PAPAKOSTAS, 2006). Em vista disso, o 2-DMPI parece ser um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos, uma vez que ele inibe a MAO-A e apresenta um efeito tipo-antidepressivo dependente dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Figura 3).

Inúmeros estudos têm mostrado que a depressão e a dor crônica coexistem em muitos pacientes e podem ser moduladas pelos mesmos sistemas de neurotransmissores (BAIR *et al.*, 2003; KALSO, 2005; MONGINI *et al.*, 2007; NICHOLSON & VERMA, 2004). A dor também é apresentada frequentemente entre os sintomas não motores de pacientes acometidos pela doença de Parkinson, a qual pode ser tratada com inibidores da MAO-B (BEISKE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2006; TINAZZI *et al.*, 2006). Além disso, as monoaminas também desempenham um papel

importante na modulação da dor devido à sua ação central nas vias descendentes inibitórias da dor (MILLAN, 2002; WOOD, 2008). Em vista disso, fármacos capazes de promover alterações nos níveis dessas monoaminas podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento de síndromes dolorosas irresponsivas a outros fármacos.

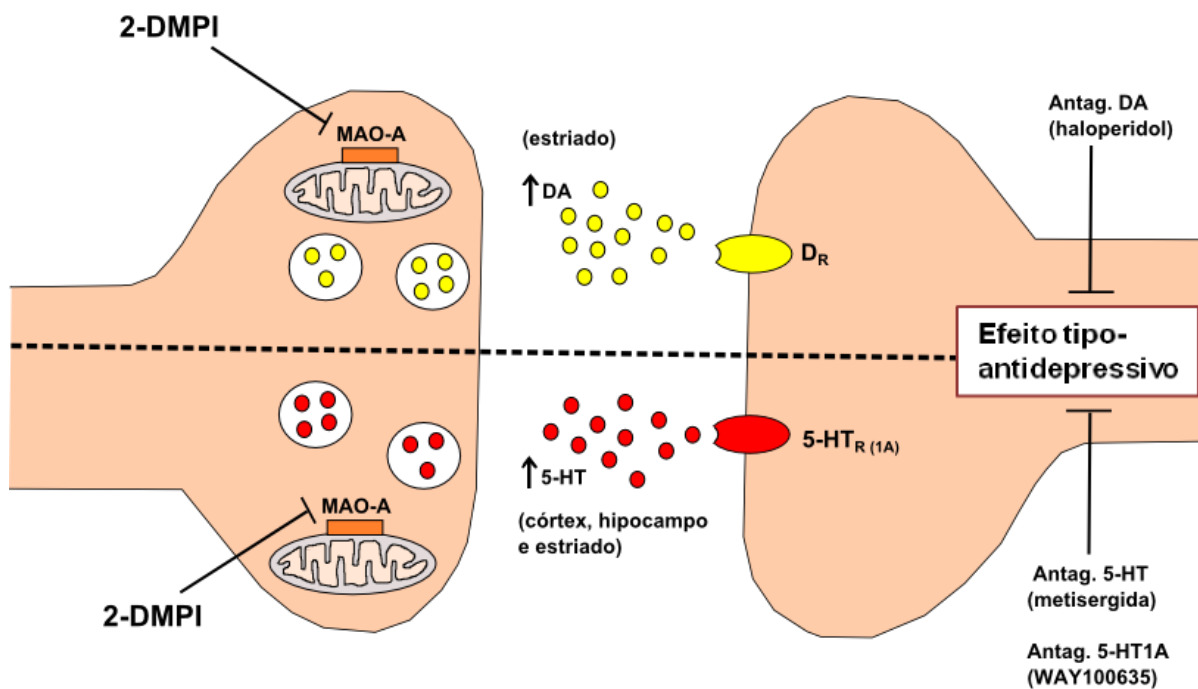


Figura 3. Mecanismo proposto para o efeito tipo-antidepressivo do 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1H-imidazol (2-DMPI) em camundongos. O 2-DMPI inibe reversivelmente a atividade da enzima monoamina oxidase A (MAO-A), induzindo um aumento na disponibilidade das monoaminas dopamina (DA) e serotonina (5-HT), em estruturas cerebrais específicas, que ao agirem em seus receptores produzem o efeito tipo-antidepressivo. Esse efeito é prevenido pelo pré-tratamento com um antagonista dopaminérgico não seletivo (haloperidol), com um antagonista serotoninérgico não seletivo (metisergida) ou com um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} (WAY100635). A linha tracejada indica que as neurotransmissões dopaminérgica (parte superior) e serotoninérgica (parte inferior) ocorrem em neurônios distintos. D_R: receptores dopaminérgicos; 5-HT_R: receptores serotoninérgicos.

Nesse contexto, os sistemas monoaminérgicos estão envolvidos no mecanismo de ação de diversos fármacos utilizados no tratamento de síndromes dolorosas, como os antidepressivos tricíclicos que são extensivamente utilizados no

tratamento da dor neuropática (FEINMANN, 1985; LYNCH, 2001; SINDRUP *et al.*, 2005). A dor neuropática pode ser causada por uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial (LOESER & TREEDE, 2008). Devido à complexidade e às diferentes etiologias das dores neuropáticas, essas constituem condições de difícil tratamento, normalmente refratárias aos analgésicos clássicos (BRIDGES *et al.*, 2001; STACEY, 2005). Outro fator que dificulta o manejo terapêutico de pacientes com dor neuropática é a presença de comorbidades clínicas, como depressão, ansiedade e distúrbios no sono (HARDEN & COHEN, 2003). Dentre as alternativas terapêuticas disponíveis, alguns antidepressivos têm sido considerados os fármacos de primeira escolha no tratamento dessas condições dolorosas (DWORKIN *et al.*, 2007).

Os antidepressivos inibidores da MAO-A, assim como os antidepressivos tricíclicos, também aumentam os níveis de monoaminas no SNC, apresentando assim um potencial analgésico a ser explorado. Contudo, poucos estudos têm sido realizados avaliando os efeitos desses fármacos no tratamento da dor neuropática. Em virtude disso, nesse estudo nós avaliamos também o potencial analgésico do 2-DMPI e da moclobemida em um modelo de dor neuropática induzido pela injúria por constrição crônica do nervo ciático (CCI, do inglês “chronic constriction injury”) em camundongos. Os camundongos submetidos à CCI apresentaram uma redução de 85% no limiar de sensibilidade mecânica sete dias após o procedimento cirúrgico, caracterizando o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. Foi observado que o tratamento com o 2-DMPI (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) produziu um efeito antinociceptivo que teve início em 1 h e durou até 6 h após o tratamento. O 2-DMPI também apresentou efeito antinociceptivo na dose de 30 $\mu\text{mol/kg}$, mostrando uma dose inibitória 50% (DI_{50}) de 11 (3,8-33,2) $\mu\text{mol/kg}$ e uma inibição máxima (I_{max}) de $98 \pm 15\%$. O tratamento com moclobemida (100 e 300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) também foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica induzida pela CCI, exibindo uma I_{max} de $88 \pm 14\%$ e uma DI_{50} de 39,2 (18,4-83,7) $\mu\text{mol/kg}$. Em concordância com nossos resultados, a moclobemida apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de mononeuropatia unilateral induzida pela constrição crônica do nervo ciático (Apaydin *et al.*, 2001) e o inibidor irreversível e seletivo da MAO-A clorgilina atenuou a nocicepção em um modelo de neuropatia alcoólica (DINA *et al.*, 2008) em ratos. Além disso, Pedersen e colaboradores (2005) demonstraram que um antidepressivo com ação dopaminérgica e serotoninérgica (bupropiona) apresentou um melhor efeito

antinociceptivo em modelos de dor neuropática em ratos do que a fluoxetina, que inibe seletivamente a recaptação de serotonina.

A fim de avaliar se os animais com dor neuropática apresentavam alguma alteração na MAO-A, foi determinada a atividade dessa enzima em diferentes estruturas do SNC (medula espinhal lombar, córtex cerebral e estriado), as quais são importantes para os processos de modulação da dor (MILLAN, 2002), em camundongos falso-operados ou submetidos à CCI. A constrição crônica do nervo ciático induziu um aumento na atividade da MAO-A na medula espinhal lombar, sugerindo um possível envolvimento dessa enzima nos mecanismos fisiopatológicos desse modelo de dor neuropática.

Dessa maneira, a constrição crônica do nervo ciático parece estar causando um aumento na atividade da MAO-A na medula espinhal lombar, que por sua vez poderia levar a uma diminuição na disponibilidade do neurotransmissor serotonina, o qual desempenha um papel importante nas vias descendentes modulatórias da dor (MILLAN, 2002). Nesse sentido, estudos prévios encontraram uma diminuição nos níveis de serotonina em algumas estruturas envolvidas na modulação da dor, como o córtex cerebral, o tálamo, o núcleo magno da rafe e a medula espinhal em diferentes modelos de dor neuropática (GOETTL *et al.*, 2002; HAINS *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2010; SANDRINI *et al.*, 1997; SOUNVORAVONG *et al.*, 2004). Além disso, foi observada uma diminuição no nível de serotonina na medula espinhal lombar de camundongos submetidos à CCI (VOGEL *et al.*, 2003). Uma vez que os níveis de serotonina no SNC estão relacionados a processos de modulação da dor (MILLAN, 2002) e que diversos estudos têm demonstrado que o efeito antinociceptivo de vários fármacos depende do sistema serotoninérgico (ALLOUI *et al.*, 2002; ARCIONI *et al.*, 2002; BILGE *et al.*, 2012; KAWAMATA *et al.*, 2002; KAWAMURA *et al.*, 1998; PELISSIER *et al.*, 1996), o 2-DMPI e a moclobemida poderiam estar exercendo seu efeito antinociceptivo via inibição da MAO-A e consequente aumento dos níveis de serotonina na medula espinhal lombar.

As vias descendentes serotoninérgicas exercem uma influência bidirecional sobre o processamento nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal, mediando ambos os processos de inibição descendente e facilitação descendente. A serotonina espinhal é liberada a partir de axônios serotoninérgicos descendentes que se originam na medula rostroventral e pode agir em diferentes receptores serotoninérgicos presentes em terminais de fibras aferentes primárias, em neurônios

de projeção ou ainda em interneurônios inibitórios ou excitatórios (MILLAN, 2002). Dentre os receptores envolvidos encontra-se o receptor ionotrópico 5-HT₃, que se caracteriza por ser um canal iônico pentamérico permeável a cátions (FAERBER *et al.*, 2007). Embora o receptor 5-HT₃ possa desempenhar tanto um papel inibitório quanto facilitatório na transmissão nociceptiva espinal, diversos estudos fornecem evidências de que a ativação dos receptores 5-HT₃ na medula espinal produz um efeito antinociceptivo, o qual parece ser mediado pelo neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) (ALHAIDER *et al.*, 1991; GIORDANO, 1991; KAWAMATA *et al.*, 2003). No presente estudo, os camundongos neuropáticos receberam uma administração intratecal do antagonista seletivo do receptor 5-HT₃ ondansetrona, a fim de avaliar se os efeitos antinociceptivos dos inibidores reversíveis da MAO-A, 2-DMPI e moclobemida, foram mediados pelo sistema serotoninérgico espinal. Os resultados mostraram que a injeção de ondansetrona (10 µg/sítio; i.t.) foi capaz de reverter o efeito antihiperalgésico de ambos os inibidores da MAO-A testados. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Nakajima e colaboradores (2012), mostrando que a administração espinal de ondansetrona também reverteu o efeito antihiperalgésico de outro fármaco antidepressivo, o SSRI paroxetina, em um modelo de dor neuropática em ratos.

Alguns estudos têm demonstrado que a administração espinal de agonistas 5-HT₃ produz um efeito antinociceptivo. Okazaki e colaboradores (2008) mostraram que a injeção intratecal do agonista 5-HT₃ 1-(m-clorofenil)-biguanida (m-CPBG) exibiu um efeito antinociceptivo em ratos submetidos à ligação do nervo espinal, o qual foi revertido por antagonistas dos receptores GABAérgicos. Em um estudo recente, a administração espinal de m-CPBG aumentou a liberação do neurotransmissor inibitório GABA, além de produzir um efeito antihiperalgésico dependente dos receptores GABAérgicos em ratos neuropáticos (HAYASHIDA *et al.* 2012). Além disso, existem estudos mostrando que a ativação do receptor 5-HT₃ promove a liberação de GABA no corno dorsal da medula espinal (KAWAMATA *et al.*, 2003) e que a subunidade 5-HT_{3A} está presente em neurônios inibitórios GABAérgicos e encefalinérgicos presentes no corno dorsal da medula espinal de camundongos (HUANG *et al.*, 2008), sugerindo que a serotonina poderia ativar esses neurônios através do receptor 5-HT₃ para exercer seu efeito antinociceptivo a nível espinal. Em vista disso, o efeito antinociceptivo do 2-DMPI e da moclobemida

parece estar relacionado à inibição da MAO-A e consequente aumento nos níveis de serotonina na medula espinhal, a qual pode aumentar o tônus das vias inibitórias espinhais ao ativar os receptores 5-HT₃ presentes em interneurônios inibitórios (Figura 4).

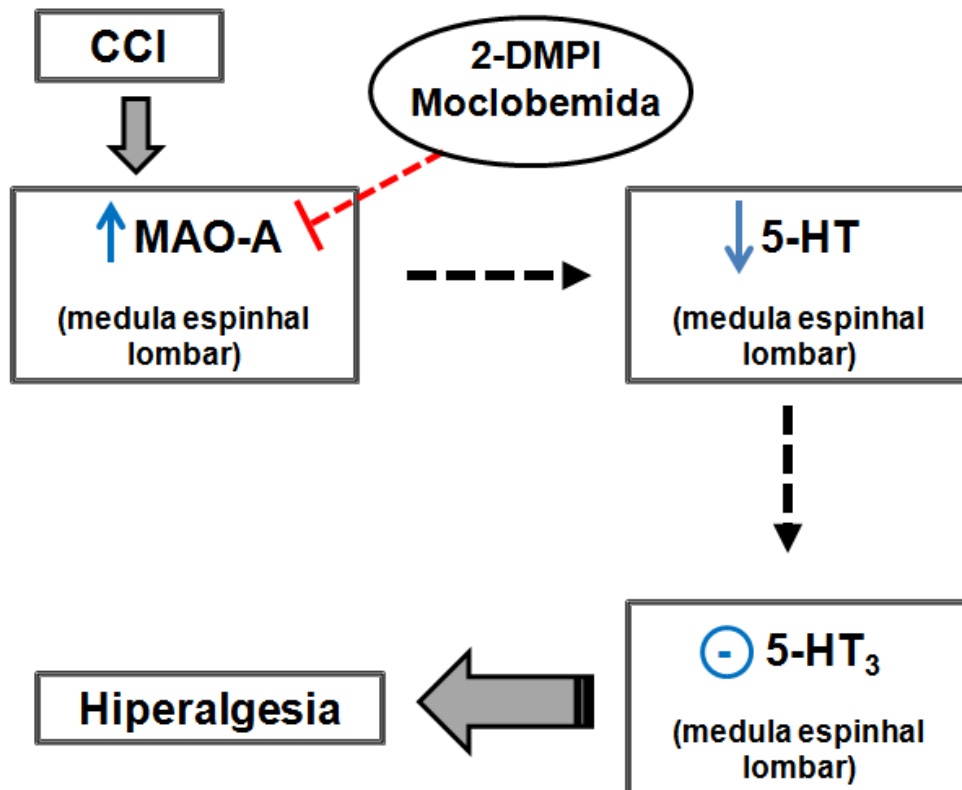


Figura 4. Mecanismo proposto para o efeito antinociceptivo do 2-(3,4-dimetoxi-fenil)-4,5-diidro-1H-imidazol (2-DMPI) e da moclobemida. A injúria por constrição crônica (CCI) do nervo ciático induziu um aumento na atividade da monoamina oxidase-A (MAO-A) na medula espinhal lombar dos camundongos, o qual poderia estar reduzindo os níveis de serotonina (5-HT) e diminuindo o tônus serotoninérgico nas vias inibitórias espinhais da dor e culminando com o desenvolvimento de hiperalgesia. O 2-DMPI e a moclobemida poderiam estar exercendo seu efeito antinociceptivo por inibir a atividade da MAO-A e, consequentemente, aumentar os níveis de serotonina (5-HT) nessa região, que por sua vez aumentaria o tônus das vias inibitórias espinhais ao ativar os receptores 5-HT₃ presentes em interneurônios inibitórios, uma vez que o efeito antinociceptivo dessas drogas foi revertido pela administração intratecal do antagonista seletivo dos receptores 5-HT₃ ondansetrona.

Assim como a serotonina, a noradrenalina também desempenha um papel fundamental nas vias descendentes inibitórias da dor. A noradrenalina é liberada por

axônios que se originam no núcleo *locus coeruleus* e suprimem a transmissão nociceptiva via receptores α_2 -adrenérgicos inibitórios presentes nas terminações sensoriais e nos neurônios de projeção e via receptores α_1 -adrenérgicos presentes nos interneurônios GABAérgicos (MILLAN, 2002). Embora os presentes resultados demonstrem que o efeito antinociceptivo dos inibidores reversíveis da MAO-A seja dependente do sistema serotoninérgico espinhal, não se pode excluir a participação de outras monoaminas, como a noradrenalina, uma vez que a inibição da MAO-A também pode alterar os níveis desse neurotransmissor. Em relação a isso, Hayashida *et al.* (2012) demonstraram que a administração espinhal de ondansetrona, por diminuir a liberação de GABA, foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo do agonista α_2 -adrenérgico clonidina em ratos neuropáticos. Dessa maneira, novos experimentos ainda são necessários para avaliar um possível envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo dos inibidores reversíveis da MAO-A em modelos de dor neuropática.

Em conjunto, os resultados do manuscrito dessa tese mostraram que os inibidores reversíveis da MAO-A, 2-DMPI e moclobemida, apresentaram efeito antinociceptivo no modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo ciático em camundongos, o qual parece ser mediado pela ativação de receptores 5-HT₃ espinhais. Também foi observado um aumento na atividade da MAO-A na medula espinhal dos camundongos neuropáticos, sugerindo um possível envolvimento dessa enzima nos mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática e um potencial para os inibidores reversíveis da MAO-A no tratamento dessa condição dolorosa.

Diversos estudos têm relatado que a depressão é uma das comorbidades clínicas mais frequentes em pacientes com síndromes dolorosas crônicas, como as dores neuropáticas (BANKS & KERNS, 1996; MONGINI *et al.*, 2007; NICHOLSON & VERMA, 2004). Além disso, esses pacientes possuem maiores riscos de apresentar recaídas e menores chances de obter a remissão completa dos sintomas depressivos do que pacientes não acometidos por dores crônicas. Em vista disso, tem sido proposto que o uso de antidepressivos com ação analgésica seria mais indicado a esses pacientes, uma vez que poderiam combater tanto a dor quanto a depressão (MICÓ *et al.*, 2006). Desta maneira, o 2-DMPI, via modulação da atividade da MAO-A e, conseqüentemente, dos sistemas monoaminérgicos, parece

ser um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial antidepressivo e analgésico.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- 5.1. O 2-DMPI é um inibidor reversível e preferencial da MAO-A em cérebro de camundongos;
- 5.2. O 2-DMPI apresentou um efeito tipo-antidepressivo no teste de suspensão da cauda;
- 5.3. O efeito tipo-antidepressivo do 2-DMPI parece não estar relacionado à alterações na atividade locomotora ou na ansiedade;
- 5.4. O aumento na taxa de renovação das monoaminas serotonina e dopamina, observado em regiões cerebrais específicas após o tratamento com 2-DMPI, sugere que essas monoaminas estejam envolvidas no efeito tipo-antidepressivo desse composto;
- 5.5. A participação dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico é necessária para o 2-DMPI produzir seu efeito tipo-antidepressivo;
- 5.6. O 2-DMPI e a moclobemida apresentaram um efeito antinociceptivo em um modelo de dor neuropática, sugerindo um potencial terapêutico para os inibidores reversíveis da MAO-A no manejo da dor neuropática;
- 5.7. A constrição crônica do nervo ciático induziu um aumento na atividade da MAO-A na medula espinhal lombar, sugerindo um possível envolvimento dessa enzima na patofisiologia da dor neuropática;
- 5.8. O efeito antinociceptivo do 2-DMPI e da moclobemida foram revertidos pela administração intratecal do antagonista do receptor 5-HT₃, ondansetrona, confirmando o envolvimento do sistema serotoninérgico espinhal.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados no segundo trabalho demonstram que o 2-DMPI e a moclobemida apresentaram um efeito antinociceptivo no modelo de dor neuropática induzida pela injúria por constrição crônica (CCI) do nervo ciático, o qual foi revertido pela administração intratecal do antagonista do receptor 5-HT₃, ondansetrona. Com o objetivo de melhor elucidar o mecanismo envolvido no efeito antinociceptivo desses inibidores reversíveis da MAO-A, têm-se como perspectivas:

- Verificar se o modelo de CCI promove uma alteração nos níveis de monoaminas (serotonina e noradrenalina) na medula espinhal lombar;
- Investigar a possível participação dos sistemas noradrenérgico e GABAérgico no efeito antinociceptivo do 2-DMPI e da moclobemida;
- Testar um antidepressivo tricíclico utilizado clinicamente no tratamento da dor neuropática (como a amitriptilina) no modelo de CCI, a fim de comparar com o efeito antinociceptivo do 2-DMPI e da moclobemida;
- Avaliar se o 2-DMPI e a moclobemida também apresentam efeito antinociceptivo nesse modelo de dor neuropática quando administrados pela via oral, e se esse efeito pode ser potencializado após tratamento crônico;
- Avaliar se os tratamentos agudo ou crônico com 2-DMPI causam alguma toxicidade aos animais, através da medida de marcadores de lesão renal e hepática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAIDER, A. A. *et al.* Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. **J. Neurosci.** 11:1881-1888, 1991.

ALLOUI, A. *et al.* Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 443:71-77, 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.** 4 ed. Washington: American Psychiatric Press, pp. 943, 1994.

APAYDIN, S. *et al.* The antinociceptive effect of moclobemide on the vocalization threshold to paw pressure in a rat model of unilateral mononeuropathy. **Pharmacol. Res.** 44:503-507, 2001.

ARCIONI, R. *et al.* Ondansetron inhibits the analgesic effects of tramadol: a possible 5-HT₃ spinal receptor involvement in acute pain in humans. **Anesth. Analg.** 94:1553-1557, 2002.

ARDID, D., *et al.* Involvement of bulbospinal pathways in the antinociceptive effect of clomipramine in the rat. **Brain Res.** 695:253-256, 1995.

ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Lancet** 353:1865-1869, 1999.

BACH, A. W. J. *et al.* cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85:4934-4938, 1988.

BAIR, M. J. *et al.* Depression and pain comorbidity: a literature review. **Arch. Intern. Med.** 163:2433-2445, 2003.

BANKS, S. M., KERNS, R. D. Explaining high rates of depression in chronic pain: a diathesis–stress framework. **Psychol. Bull.** 119:95-110, 1996.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Mechanisms of disease: major depressive disorder. **N. Engl. J. Med.** 358:55-68, 2008.

BEISKE, A. G. *et al.* Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics.

Pain 141:173-177, 2009.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain** 33:87-107, 1988.

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

BIANCHI, M.; MANTEGAZZA, P.; PANERAI, A. E. Effects of two different reversible monoamine oxidase-A inhibitors on nociceptive thresholds in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 219:113-116, 1992.

BILGE, S. S. *et al.* The antinociceptive effects of intravenous tianeptine in colorectal distension-induced visceral pain in rats: the role of 5-HT₃ receptors. **Eur. J. Pharmacol.** 681:44-49, 2012.

BLIER, P.; WARD, N. M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? **Biol. Psychiatry.** 53:193-203, 2003.

BLOCH, R. G. *et al.* The clinical effects of isoniazid and iproniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis. **Ann. Intern. Med.** 40:881-900, 1954.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W.; RICE, A. S. Mechanisms of neuropathic pain. **Br. J. Anaesth.** 87:12-26, 2001.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman.** 12 ed. Porto Alegre: AMGH, pp. 397-415, 2012.

BURKARD, W. P. *et al.* Pharmacological profile of moclobemide, a short-acting and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 248:391-399, 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.

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

COLLINS, G. G. *et al.* Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase. **Nature** 225:817-820, 1970.

COSTIGAN, M. *et al.* Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu. Rev. Neurosci.** 32:1-32, 2009.

CRAIG, A. D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Curr. Opin. Neurobiol.** 13: 500-505, 2003.

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

DAILLY, E. *et al.* Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 18:601-607, 2004.

DETKE, M. J.; WIELAND, S.; LUCKI, I. Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5-HT_{1A} receptor antagonists. **Psychopharmacology** 119:47-54, 1995.

D'HAENEN, H. A.; BOSSUYT, A. Dopamine D₂ receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. **Biol. Psychiatry** 35:128-132, 1994.

DINA, O. A. *et al.* Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. **Eur. J. Neurosci.** 28:1180-1190, 2008.

DUARTE, F. S. *et al.* 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. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** 32:368-374, 2008.

DUMAN, R. S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biol. Psychiatry** 56:140-145, 2004.

DUNLOP, B. W.; NEMEROFF, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch. Gen. Psychiatry** 64:327-337, 2007.

DWORKIN, R. H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain** 132:237-251, 2007.

EGLIN, R. M. *et al.* 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. **Trends Pharmacol. Sci.** 19:381-390, 1998.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry** 28:435-451, 2004.

FAERBER, L. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research-evolving concepts in management of pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** 560:1-8, 2007.

FEIGER, A. D. A double-blind comparison of gepirone extended release, imipramine, and placebo in the treatment of outpatient major depression. **Psychopharmacol. Bull.** 32:659-665, 1996.

FEIGER, A. D. *et al.* Gepirone extended-release: new evidence for efficacy in the treatment of major depressive disorder. **J. Clin. Psychiatry** 64:243-249, 2003.

FEINMANN, C. Pain relief by antidepressants: possible modes of action. **Pain** 23:1-8, 1985.

FINNERUP, N. B. *et al.* Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain** 118:289-305, 2005.

FORNAI, F. *et al.* Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: a brain dialysis study. **J. Neurochem.** 73:2434-2440, 1999.

GABAY, E., TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain** 110:354-360, 2004.

GIORDANO, J. Analgesic profile of centrally administered 2-methylserotonin against acute pain in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 199:233-236, 1991.

GIUFFRIDA, R. Pain in Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)** 161:407-418, 2005.

GLOVER, V. *et al.* Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. **Nature** 265:80-81, 1977.

GOETTL, V. M. *et al.* Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. **Pain** 99:359-366, 2002.

HAANPAA, M. L. *et al.* Assessment of neuropathic pain in primary care. **Am. J. Med.** 122:S13-S21, 2009.

HAINS, B. C. *et al.* Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. **Exp. Neurol.** 175:347-362, 2002.

HAMNER, M. B.; DIAMOND, B. I. Plasma dopamine and norepinephrine correlations with psychomotor retardation, anxiety, and depression in non-psychotic depressed patients: a pilot study. **Psychiatry Res.** 64:209-211, 1996.

HARDEN, N.; COHEN, M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage.** 25:S12-S17, 2003.

HAYASHIDA, K *et al.* Ondansetron reverses antihypersensitivity from clonidine in rats after peripheral nerve injury: role of γ -aminobutyric acid in α 2-adrenoceptor and 5-HT₃ serotonin receptor analgesia. **Anesthesiology** 117, 389-398, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* Hereditary variations in monoamine oxidase as a risk factor for Parkinson's disease. **Mov. Disord.** 9:305-310, 1994.

HUANG, J. *et al.* 5-HT_{3A} receptor subunit is expressed in a subpopulation of GABAergic and enkephalinergic neurons in the mouse dorsal spinal cord. **Neurosci. Lett.** 441:1-6, 2008.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.** 2:83-91, 2001.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 25:1-28, 2011.

JAHNG, J. W. *et al.* Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. **Synapse** 25:30-36, 1997.

JENKINS, S. W., *et al.* Gepirone in the treatment of major depression. **J. Clin. Psychopharmacol.** 10:77S-85S, 1990.

JOHNSTON, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochem. Pharmacol.** 17:1286-1297, 1968.

KALSO, E. Pharmacological Management of Pain: Anticonvulsants, Antidepressants, and Adjuvant Analgesics. In: Justins, D. C. (ed). **Pain 2005 – An updated review: refresher course syllabus.** Seattle: IASP Press, pp. 19-29, 2005.

KAWAMATA, T. *et al.* Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. **Anesthesiology** 96:1175-1182, 2002.

KAWAMATA, T. *et al.* The activation of 5-HT₃ receptors evokes GABA release in the spinal cord. **Brain Res.** 978:250-255, 2003.

KAWAMURA, M. *et al.* Neurotrophin induces antinociceptive effect by enhancing descending pain inhibitory systems involving 5-HT₃ and noradrenergic alpha₂ receptors in spinal dorsal horn. **Life Sci.** 62:2181-2190, 1998.

KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; TAKEMURA, M. Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytryptamine turnover in the striatum. **Neuroscience** 130:295-308, 2005.

KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; TAKEMURA, M. Modification of morphine-induced hyperlocomotion and antinociception in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor. **Neurochem. Res.** 31:829-837, 2006.

LALIES, M. D. *et al.* Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline₂ site-selective ligands. **Ann. NY. Acad. Sci.** 881:114-117, 1999.

LEE, M. A. *et al.* A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease. **J. Pain Symptom Manage** 32:462-469, 2006.

LETRO, G. H.; QUAGLIATO, E. M.; VIANA, M. A. Pain in Parkinson's disease. **Arq. Neuropsiquiatr.** 67:591-594, 2009.

LIU, F. Y. *et al.* Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. **Brain Res.** 1330:45-60, 2010.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain** 137:473-477, 2008.

LOOMER, H. P.; SAUNDERS, J. C.; KLINE, N. S. A Clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. **Psychiatr. Res. Rep. Am. Psychiatr. Assoc.** 8:129-141, 1957.

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.** 27:555-559, 2007.

LUSCOMBE, G. P. *et al.* Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **Br. J. Pharmacol.** 108:669-677, 1993.

LYNCH, M. E. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. **J. Psychiatry Neurosci.** 26:30-36, 2001.

MAGYAR, K.; KNOLL, J. Selective inhibition of the "B form" of monoamine oxidase. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.** 29:233-246, 1977.

MCDERMOTT, A. M., *et al.* The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. **Eur. J. Pain** 10:127-135, 2006.

MCGRATH, P. J. *et al.* Gepirone treatment of atypical depression: preliminary evidence of serotonergic involvement. **J. Clin. Psychopharmacol.** 14:347-352, 1994.

MENKES, D. B. *et al.* Moclobemide in chronic neuropathic pain: preliminary case reports. **Clin. J. Pain** 11:134-138, 1995.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain.** 2. ed. Seattle: IASP Press, pp. 209-214, 1994.

MEYER, J. H. *et al.* Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. **Neuroreport** 12:4121-4125, 2001.

- MEYER, J. H. *et al.* Elevated monoamine oxidase A levels in the brain. **Arch. Gen. Psychiatry** 63:1209-1216, 2006.
- MICÓ, J. A. *et al.* Antidepressants and pain. **Trends Pharmacol. Sci.** 27:348-354, 2006.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66:355-474, 2002.
- MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur. J. Pharmacol.** 500:371-384, 2004.
- MIURA, H. *et al.* Effects of moclobemide on forced-swimming stress and brain monoamine levels in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 53:469-475, 1996.
- MONGINI, F. *et al.* Muscle tenderness in different types of facial pain and its relation to anxiety and depression: A cross-sectional study on 649 patients. **Pain** 131:106-111, 2007.
- NAKAJIMA, K. *et al.* An increase in spinal cord noradrenaline is a major contributor to the antihyperalgesic effect of antidepressants after peripheral nerve injury in the rat. **Pain** 153:990-997, 2012.
- NASH, J.; NUTT, D. Antidepressants. **Psychiatry** 6:289-294, 2007.
- NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat. Neurosci.** 5 Suppl:1068-1070, 2002.
- NICHOLSON, B.; VERMA, S. Comorbidities in chronic neuropathic pain. **Pain Med.** 5:S9-S27, 2004.
- OKAZAKI, R. *et al.* The antiallodynic effect of Neurotrophin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. **Anesth. Analg.** 107, 1064-1069, 2008.
- OZAITA, A. *et al.* Inhibitors of MAO A and B activities by imidazol(ine)/guanidine receptive drugs, nature of the interaction and distinction from I2-imidazoline receptors in rat liver. **Br. J. Pharmacol.** 121:901-912, 1997.

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

PEDERSEN *et al.* Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology** 182: 551-561, 2005.

PELLISSIER, T. *et al.* Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: *in vivo* and *in vitro* evidence. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 278, 8-14, 1996.

PIRILDAR, S. *et al.* A preliminary open-label study of moclobemide treatment of pain disorder. **Psychopharmacol. Bull.** 37:127-134, 2003.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature** 266:730-732, 1977.

RAASCH, W.; MUHLE, H.; DOMINIAK, P. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. **Ann. NY. Acad. Sci.** 881:313-331, 1999.

RADDATZ, R.; LANIER, S. M. Relationship between imidazoline/guanidinium receptive sites and monoamine oxidase A and B. **Neurochem. Int.** 30:109-117, 1997.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp. 557-574, 2007.

RIEDERER, P.; JELLINGER, K. Neurochemical insights into monoamine oxidase inhibitors, with special reference to deprenyl (selegiline). **Acta Neurol. Scand. Suppl.** 95:43-55, 1983.

ROBINSON, D. S. Monoamine oxidase inhibitors: a new generation. **Psychopharmacol. Bull.** 36:124-138, 2002.

ROBINSON, D. S. *et al.* Clinical effects of the 5-HT_{1A} partial agonists in depression: a composite analysis of buspirone in the treatment of depression. **J. Clin. Psychopharmacol.** 10:67S-76S, 1990.

- RODRIGUES, A. L. S. *et al.* Antidepressant-like and antinociceptive-like actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4'-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 82:156-162, 2005.
- ROY, A. *et al.* Plasma norepinephrine level in affective disorders. Relationship to melancholia. **Arch. Gen. Psychiatry** 42:1181-1185, 1985.
- RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Mol. Psychiatry** 12:331-359, 2007.
- SANDRINI, M. *et al.* Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. **Life Sci.** 60:1393-1397, 1997.
- SANT'ANNA, G. S. *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.
- SAURA, J. *et al.* Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidase A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization. **Neuroscience** 70:755-774, 1996.
- SCHREIBER, S. *et al.* The antinociceptive effect of moclobemide in mice is mediated by noradrenergic pathways. **Neurosci. Lett.** 253:183-186, 1998.
- SEMENCHUK, M. R.; SHERMAN, S.; DAVIS, B. Double-blind, randomized trial of bupropion SR for the treatment of neuropathic pain. **Neurology** 57:1583-1588, 2001.
- SHAH, P. J. *et al.* Clinical and psychometric correlates of dopamine D₂ binding in depression. **Psychol. Med.** 27:1247-1256, 1997.
- SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. Monoamine oxidase: from genes to behavior. **Annu. Rev. Neurosci.** 22:197-217, 1999.
- SINDRUP, S. H. *et al.* Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.** 96:399-409, 2005.

- SOUNVORAVONG, S. *et al.* Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 484:217-223, 2004.
- STACEY, B. R. Management of peripheral neuropathic pain. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.** 84:S4-S16, 2005.
- STAHL, S. M. **Stahl Psicofarmacologia – Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 397-401, 2010.
- STERU, L. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology** 85:367-370, 1985.
- TESSON, F. *et al.* Localization of I2-imidazoline binding sites on monoamine oxidase. **J. Biol. Chem.** 270:9856-9861, 1995.
- TINAZZI, M. *et al.* Pain and motor complications in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 77:822-825, 2006.
- TORRANCE, N. *et al.* The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. **J. Pain** 7:281-289, 2006.
- VACCARINO, A. L. *et al.* Multiple pain complaints in patients with major depressive disorder. **Psychosom. Med.** 71:159-162, 2009.
- VOGEL, C. *et al.* Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. **J. Neurosci.** 23:708-715, 2003.
- VON KORFF, M.; SIMON, G. The relationship between pain and depression. **Br. J. Psychiatry Suppl.** 30:101-108, 1996.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol. Rev.** 82:981-1011, 2002.
- WESTLUND, K. N. *et al.* Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. **Science** 250:181-183, 1985.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron** 55:353-364, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science** 288:1765-1769, 2000.

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

WONG, M.; LICINIO, J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3:136-51, 2004.

WOOD, P. B. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert. Rev. Neurother.** 8:781-797, 2008.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TRIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat. Rev. Neurosci.** 7:295-309, 2006.

ZOMKOWSKI, A. D. E. *et al.* Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.** 1023:253-263, 2004.