

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

**EFEITO DE COMPOSTOS 2-ARIL(HETEROARIL)-4,5-DIIDRO-1H-
IMIDAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MONOAMINA
OXIDASE *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gabriela da Silva Sant´Anna

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DE 2-ARIL(HETEROARIL)- 4,5-DIIDRO-1H-
IMIDAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MONOAMINA
OXIDASE *IN VITRO***

por

Gabriela da Silva Sant'Anna

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Maribel Antonello Rubin
Co-Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

Santa Maria, RS, Brasil

2008

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

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

**EFEITO DE 2-ARIL-(HETEROARIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZÓIS
SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MONOAMINA OXIDASE *IN VITRO***

elaborada por
Gabriela da Silva Sant'Anna

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maribel Antonello Rubin, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Rui D. S. Prediger, Dr. (UFSC)

Hélio G. Bonacorso, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 5 de Agosto de 2008

*“Ando devagar porque já tive pressa,
E levo esse sorriso, porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei.
Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs.
É preciso amor para poder pulsar
É preciso paz para poder sorrir
É preciso a chuva para poder florir”*

(Almir Sater)

Agradecimentos

Agradeço inicialmente à minha família, como um todo, pelo incentivo, especialmente aos meus pais, Leonor e Glenir, que sempre me deram força e subsídios para eu seguir em frente, além de carinho e paciência.

Ao meu namorado Juliano, pelo amor, pelo apoio, pelo exemplo de determinação e superação e pela compreensão demonstrada nestes dois últimos anos.

Agradeço à professora Maribel Antonello Rubin, por permitir que eu fizesse parte do grupo LabNeuro e por aceitar me orientar no mestrado. Obrigada!

Faço um agradecimento especial ao meu co-orientador, professor Juliano Ferreira, que desde o início dedicou confiança em mim, ajudando-me de forma ímpar com seus conhecimentos, seu exemplo de dedicação pela profissão, sua compreensão, suas “brigas”, e também pelo seu companheirismo nos momentos fora do laboratório.

Agradeço também a todos os colegas do NUQUIMHE, em especial o colega Pablo Machado que foi essencial neste trabalho, sempre se disponibilizando a me ajudar, com toda paciência, seja através da síntese dos compostos ou compartilhando seus conhecimentos químicos.

Não poderia deixar de agradecer à minha colega e, acima de tudo, amiga, Patricia Dutra Sauzem. Ela que foi minha companheira nos experimentos certos e errados, na alegria das vitórias e na tristeza das derrotas, nos sorrisos e nas lágrimas. O “Bosque” ficará com saudades! Agradeço muito a ti, Patricia, por compartilhar todo o teu conhecimento comigo e por me dar o prazer de tê-la como amiga.

Agradeço a todos os colegas do laboratório, os novos e antigos, por dividirem os dias comigo, pela ajuda, pelos momentos de aprendizado e pela descontração.

Aos professores do curso pelos ensinamentos e por contribuírem com minha formação.

Aos funcionários Angélica, Márcia e Rinaldo por toda ajuda prestada.

A CAPES pela bolsa concedida

RESUMO

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

EFEITO DE 2-ARIL(HETEROARIL)-4,5-DIIDRO-1H-IMIDAZÓIS SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MONOAMINA OXIDASE *IN VITRO*

Autora: GABRIELA DA SILVA SANT'ANNA

Orientadora: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Co-Orientador: JULIANO FERREIRA

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 5 de Agosto de 2008.

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima que contém o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD) e que está presente na membrana externa da mitocôndria de células neuronais, glia e outras células. Seu papel inclui a regulação dos níveis de aminas biogênicas e xenobióticas no cérebro e em tecidos periféricos pela desaminação oxidativa. Com base na especificidade a substrato e inibidores, são descritas duas isoformas da MAO (A e B). Devido aos seus papéis no metabolismo das catecolaminas neurotransmissoras, a MAO-A e a MAO-B são consideradas farmacologicamente interessantes, e inibidores reversíveis e irreversíveis destas isoformas são usados clinicamente para tratar doenças neurológicas incluindo depressão e doença de Parkinson. Nos últimos 15 anos, desde a demonstração que sítios I_2 estão associados com frações da membrana mitocondrial, muitos estudos provem evidências de que estes sítios representam regiões da MAO. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que derivados imidazólicos são capazes de inibir a atividade da MAO. Este efeito tem sido atribuído a sítios I_2 de alta afinidade na MAO-B (I_{2B}) e a um sítio similar de baixa afinidade na MAO-A (I_{2A}). Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito *in vitro* de compostos 4,5-diidro-1H-imidazol-2-substituídos sobre a atividade da enzima monoamina oxidase através de métodos espectrofotométricos e fluorimétricos usando quinuramina como substrato. Entre os compostos estudados que inibiram preferencialmente a MAO-A (**3c-e**, **3j**) apenas o composto **3d** foi seletivo, apresentando um K_i para a MAO-A de aproximadamente 73 vezes menor do que seu K_i para MAO-B. Entre os compostos obtidos que seletivamente inibiram MAO-B (**3g-l**, **3k**, **3o**), apenas a imidazolina **3g** mostrou ser potente, com valores de K_i de 5,3 μ M. Alguns compostos que exercem ligação potente e seletiva à sítios I_2 , como o **3l** (benazolina), **3n** (2-BFI) e **3p** (BU224) mostraram boa atividade inibitória especialmente contra MAO-B. Em fígado de ratos, as imidazolininas inibiram com menos seletividade a MAO-A e MAO-B quando comparado com cérebro de ratos. Os compostos **3d** e **3g** inibiram a MAO de maneira reversível e apresentaram inibição de natureza mista (diminuindo o valor de $V_{m\acute{a}x}$ e aumentando o valor de K_m) sobre a enzima MAO. Estes resultados confirmam que drogas imidazolininas podem inibir a atividade da MAO e sugerem uma relação entre sítios I_2 e a modulação da atividade da enzima.

Palavras-chaves: imidazolininas; sítios imidazólicos I_2 ; MAO-A; MAO-B

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF 2-ARYL-HETEROARYL-4,5-DIHYDRO-1H-IMIDAZOLES ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY *IN VITRO*.

Author: GABRIELA DA SILVA SANT'ANNA

Advisor: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Co-Advisor: JULIANO FERREIRA

Date and place of the defense: Santa Maria, August, 5th, 2008.

Monoamine oxidase (MAO) is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-containing enzyme attached to the mitochondrial outer membrane of neurons, glia, and other cells. Its roles include regulation of the levels of biogenic and xenobiotic amines in the brain and peripheral tissues by catalyzing their oxidative deamination. On the basis of their substrate and inhibitor specificities, two isoforms of MAO have been described (A and B). Due to their role in the metabolism of catecholamines neurotransmitters, MAO-A and MAO-B have long been of pharmacological interest. Accordingly, and reversible and irreversible inhibitors of MAO-A and MAO-B have been used in the clinics to treat neurological disorders including depression and Parkinson's disease. Since the demonstration that I₂-imidazoline sites are associated with mitochondrial membranes 15 years ago, several studies have provided evidence that these sites represent regions on MAOs. In line with this view, it has been demonstrated that imidazoline derivatives inhibit MAO activity. This effect has been attributed to a high affinity I₂ binding site on MAO-B (I_{2B}) and to a similar lower affinity site on MAO-A (I_{2A}). This study investigated the effect of 4,5-dihydro-1H-imidazole-2-substituted compounds on MAO activity *in vitro* by spectrophotometric and fluorimetric methods using kynuramine as substrate. Among the compounds that inhibited MAO-A (**3c-e**, **3j**), compound **3d** was 73-fold more selective towards MAO-A than MAO-B. Among the compounds that selectively inhibited MAO-B (**3g-l**, **3k**, **3o**), imidazoline **3g** was shown to be potent with Ki value of 5,3 µM. Some of compounds that selectively bind to I₂-sites, such as **3l** (benazoline), **3n** (2-BFI), and **3p** (BU224) showed good inhibitory activity especially against MAO-B. Imidazolines inhibited MAO-A and MAO-B activities in liver with less selectively than in rat brain. The compounds **3d** and **3g** reversibly inhibited MAO, and kinetics studies showed that compound **3d** and **3g** inhibited MAO in a mixed manner (decreased V_{max} and increased K_m values). These results confirm that imidazolines inhibit MAO activity and suggest a relationship between I₂ binding site and modulation of central MAO activity.

Keywords: imidazolines; imidazoline binding sites I₂; MAO-A; MAO-B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado da reação catalisada pela MAO.....	2
Figura 2 - Metabolismo de monoaminas através desaminação oxidativa realizada pela MAO.	10
Figura 3 - Mecanismo de neurotoxicidade induzido por ferro e peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton.	10
Figura 4 - Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humana.	12
Figura 5 - Estruturas químicas de inibidores irreversíveis da MAO.	14
Figura 6 - Mecanismo de potencialização dos efeitos cardiovasculares causado pela tiramina: a reação do queijo.	15
Figura 7 - Estruturas químicas de inibidores reversíveis da MAO.	18
Figura 8 - Estrutura do núcleo imidazólico e da clonidina.	19
Figura 9 - Estrutura dos possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazólicos.....	22
Figura 10 - Ligantes seletivos de sítios imidazólicos I ₂	23
Figura 11 - Representação esquemática da MAO-B.	27
Figura 12 - Esquema da obtenção do protótipo das três séries de imidazolinas.	29
Figura 13 - Farmacomodulação do 2-fenil- Δ^2 -imidazolina.	29
Figura 14 – Formação de 4-hidroxiquinolina através da oxidação da quinuramina pela enzima MAO.....	35
Figura 15 - Curva de atividade total da MAO <i>versus</i> concentração de proteína (A) e curva de atividade total da MAO <i>versus</i> tempo de incubação (B), em homogenato mitocondrial de cérebro e fígado de rato.	41
Figura 16 - Curva da velocidade inicial (V _o) da MAO-A <i>versus</i> concentração de quinuramina (A) e curva da velocidade inicial V _o da MAO-B <i>versus</i> concentração de quinuramina (B), em homogenato mitocondrial de cérebro e fígado de ratos.....	42
Figura 17 - Curva % de inibição da MAO-A (A, C) e MAO-B (B, D) <i>versus</i> concentração dos compostos 3d e 3g em homogenato mitocondrial de cérebro.....	44
Figura 18 - Curva % de inibição da MAO-A (A, C) e MAO-B (B, D) <i>versus</i> concentração dos compostos 3d e 3g em homogenato mitocondrial de fígado de rato.	46
Figura 19 - Reversibilidade da MAO-A e MAO-B pelos compostos 3d (A) e 3g (B).....	48

Figura 20 - Cinética de inibição da atividade da MAO-A pelos dos compostos 3d e 3g	50
Figura 21 - Cinética de inibição da atividade da MAO-B pelos dos compostos 3d e 3g	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura dos compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazóis.....	33
Tabela 2 – Estrutura dos compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazóis.	34
Tabela 3 - Valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_M para MAO-A e MAO-B, em cérebro e fígado de ratos.	43
Tabela 4 – Efeito inibitório de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazóis sobre a atividade da MAO.	45
Tabela 5 - Efeito inibitório <i>in vitro</i> dos compostos 3d e 3g sobre a atividade da MAO hepática.	47
Tabela 6 - Efeitos dos compostos 3d e 3g sobre as constantes cinéticas para oxidação do substrato quinuramina pela MAO-A.	50
Tabela 7 - Efeitos dos compostos 3d e 3g sobre as constantes cinéticas para oxidação do substrato quinuramina por MAO-B.	51
Tabela 8 - Tabela comparativa dos valores de K_i para inibição da MAO-A e da MAO-B, e para ligação a sítios I_1 , I_2 , α_1 e α_2 apresentados por alguns dos compostos imidazolínicos estudados.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

MAO	Monoamina oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase tipo A
MAO-B	Monoamina oxidase tipo B
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
CI₅₀	Concentração que inibe 50% da resposta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
NaCl	Cloreto de sódio
SNC	Sistema nervoso central
ADH	Aldeído desidrogenase

LISTA DE ANEXO

ANEXO 1 – Artigo: Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors.	83
---	-----------

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Monoamina Oxidase	9
3.2. Desenvolvimentos de inibidores da MAO	13
3.3. Sítios Imidazolínicos	19
3.4. Sítios Imidazolínicos I₂	23
3.4.1. Relação funcional entre sítios I ₂ e MAO	25
3.4.2. Síntese de novas imidazolininas seletivas I ₂	28
3.4.3. Métodos de síntese de novos inibidores da MAO	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Animais	33
4.2. Compostos estudados	33
4.3. Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias	34
4.4. Determinação da atividade da MAO	35
4.5. Avaliação de parâmetros cinéticos da inibição da MAO	36
4.6. Reversibilidade da inibição da MAO	37
4.7. Análise Estatística	37

5. RESULTADOS.....	39
5.1. Definições das melhores condições de ensaio.....	40
5.2. Determinação do efeito inibitório <i>in vitro</i> de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1<i>H</i>-imidazóis sobre a atividade da MAO em cérebro de ratos.....	43
5.3. Determinação do efeito inibitório <i>in vitro</i> dos compostos 3d e 3g sobre a atividade da MAO em fígado de ratos.....	46
5.4. Determinação da reversibilidade da inibição <i>in vitro</i> da MAO cerebral pelos compostos 3d e 3g.	47
5.5. Estudo de alguns parâmetros cinéticos da atividade da MAO-A e MAO-B em cérebro de ratos na presença dos compostos 3d e 3g.	49
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSOES.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9. ANEXO.....	83

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima que contém um dinucleotídeo flavina-adenina (FAD), e que está localizada na membrana externa da mitocôndria. Esta enzima é responsável pela desaminação oxidativa de aminas no cérebro e nos tecidos periféricos, regulando seus níveis. A MAO metaboliza aminas primárias, e também algumas aminas secundárias e terciárias, conforme a seguinte reação:

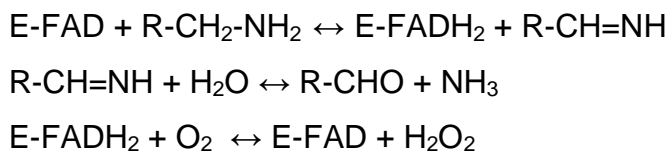


Figura 1 – Esquema simplificado da reação catalisada pela MAO. E-FAD: enzima ligada ao cofator FAD no estado oxidado; R-CH₂-NH₂: amina primária; E-FADH₂: cofator FAD reduzido; RCH=NH: aldeído; H₂O: água; R-CHO: ácido; NH₃: amônia; O₂: oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

As aminas que servem como substratos para a MAO incluem neurotransmissores monoaminérgicos importantes fisiologicamente e patologicamente, como a dopamina, a norepinefrina, a epinefrina, e a serotonina. Juntamente com outros neurotransmissores, como ácido glutâmico e ácido gama-aminobutírico (GABA), estas monoaminas regulam processos envolvidos no movimento, no humor, nas emoções, na cognição, na memória e no aprendizado. Assim, a MAO tem uma estreita relação com importantes funções cerebrais.

A enzima monoamina oxidase apresenta-se como duas isoformas, MAO-A e MAO-B, que são codificadas por dois genes diferentes. As duas isoformas são funcionalmente distintas por sua seletividade a substratos e inibidores, e distribuição nos tecidos. Além disso, a expressão das duas isoformas varia durante o desenvolvimento (onde prevalece a MAO-A), e o envelhecimento (onde ocorre aumento da expressão de MAO-B).

A MAO-A catalisa, preferencialmente, a desaminação de serotonina e norepinefrina e é sensível a inibição irreversível do inibidor seletivo clorgilina. No cérebro, a MAO-A encontra-se, preferencialmente, em neurônios catecolaminérgicos, enquanto que periféricamente esta isoforma está presente no

intestino, placenta, fígado, entre outros órgãos. Quando o gene da MAO-A é deficiente, em humanos ou camundongos, observam-se altos níveis de serotonina e norepinefrina e o fenótipo é caracterizado por um aumento no comportamento agressivo. Além disso, é comprovada a eficácia clínica dos inibidores da MAO-A no tratamento de doenças afetivas, como a depressão.

A MAO-B oxida preferencialmente β -feniletilamina e benzilamina, sendo inibida irreversivelmente pelo inibidor seletivo selegilina (*L*-Deprenil). Ela é altamente expressa em células gliais e em neurônios serotoninérgicos, embora não esteja envolvida diretamente na desaminação da serotonina. Acredita-se que a expressão da MAO-B acompanha o aumento de astrócitos, que ocorre, normalmente, durante o envelhecimento. A deficiência no gene da MAO-B em camundongos resulta em um aumento nos níveis de β -feniletilamina, norepinefrina e dopamina, mas não nos níveis de serotonina. Além disso, a MAO-B participa na biotransformação de neurotoxinas como a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) que é convertida em 1-metil-4-fenilpirinium (MPP⁺), uma neurotoxina que mimetiza a doença de Parkinson em modelos animais. Estudos mostram que a inibição seletiva desta isoforma pode conferir neuroproteção por aumentar os níveis de dopamina no estriado e também por causar efeitos antioxidantes através da redução da formação de H₂O₂. Dessa forma justifica-se a utilização destes inibidores como adjuvantes no tratamento da doença de Parkinson. Alguns outros estudos também ressaltam a importância da MAO-B no desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Nos anos 50, a primeira geração de inibidores da MAO foi introduzida na prática clínica para o tratamento da depressão. Entretanto, devido a relatos de efeitos adversos importantes como hepatotoxicidade, estes inibidores que incluem a iproniazida, a fenelzina e a tranilcipromina, foram retirados do comércio. Com a descoberta das isoformas da enzima, a segunda geração de inibidores da MAO apresentou vantagens sobre a primeira por apresentar inibição seletiva sobre MAO-A e MAO-B. Entre eles, destaca-se a rasagilina que possui grande eficácia na clínica e, diferente do inibidor *L*-Deprenil, o seu metabolismo não gera metabólitos do tipo anfetamínicos potencialmente tóxicos. No entanto, as drogas da segunda geração ainda apresentavam uma inibição irreversível o que limitava sua aplicação terapêutica, em vista das crises hipertensivas (reação do queijo) decorrentes do consumo de alimentos ricos em tiramina.

Atualmente, está em uso na clínica a terceira geração de inibidores da MAO. Estas substâncias apresentam benefícios aos inibidores originais pelo fato de agirem seletivamente e reversivelmente sobre as isoformas da enzima. Entre eles, destacam-se os inibidores moclobemida, toloxatona, befloxatona e brofaromina, que agem de maneira reversível e seletiva sobre a MAO-A, sendo utilizados no tratamento da depressão. Alguns inibidores reversíveis de MAO-B também são descritos como o lazabemida bastante estudado para o tratamento da doença de Parkinson.

Na década de 90, foi identificado um provável sítio regulatório da MAO, chamado sítio de ligação imidazolínico tipo I_2 . 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 I_2 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. Os sítios I_{2B} são insensíveis à amilorida estando presentes na MAO-B. Porém, ainda não se sabe o mecanismo de interação entre os sítios I_2 e as isoformas da MAO. Acredita-se que este sítio seja distinto do sítio catalítico da enzima, e independente do grupo prostético FAD, ou dos domínios de ligação a inibidores clássicos da MAO. De fato, estudos demonstram que a maioria dos resíduos de aminoácidos (149-222) identificados como sítios I_2 na MAO-B são encontrados na cavidade de entrada do sítio catalítico da enzima.

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-1*H*-imidazol) e BU224 (2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-quinolina) que inibem a enzima de maneira não-seletiva. Estes efeitos são atribuídos a interação com sítios I_2 de alta afinidade, localizados na MAO-B (I_{2B}) e sítios similares, de baixa afinidade, localizados na MAO-A (I_{2A}). Além disso, estudos mostram que em determinados tecidos, os sítios I_2 não apresentam relação com a MAO-B, sugerindo que exista diferentes subpopulações da MAO, uma com sítios I_2 e outra sem.

Assim, o estudo de compostos imidazolínicos, que interajam com sítios específicos I_2 e que sejam capazes de alterar a atividade da MAO em determinados tecidos, pode ser de grande interesse como novos inibidores da MAO. Além disso, o

entendimento dos mecanismos de interação que envolve essas duas proteínas (sítios I₂ e MAO) pode auxiliar o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos úteis no tratamento de neuropatologias como as doenças de Parkinson e Alzheimer, bem como em doenças afetivas, como a depressão.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Levando em consideração que substâncias que possuem núcleo imidazolínico são capazes de inibir a atividade da MAO possivelmente por interação com sítios I₂, o principal objetivo deste trabalho é:

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis sobre a atividade da enzima monoamina oxidase *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis sobre a atividade da MAO *in vitro* em cérebro e fígado de ratos;
- Avaliar a possível reversibilidade da inibição da MAO *in vitro* pelos compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis, em cérebro de ratos;
- Avaliar as possíveis alterações de alguns parâmetros cinéticos da atividade da MAO na presença de compostos 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis, em cérebro de ratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Monoamina Oxidase

A monoamina oxidase (MAO) (E.C: 1.4.3.4) é uma enzima que contém FAD e está localizada na membrana externa da mitocôndria em neurônios, glia e outras células. Ela catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras (serotonina, norepinefrina, dopamina) e neuromoduladoras (β -feniletilamina), assim como monoaminas bioativas exógenas (tiramina) (SHIH et al., 1999). Em tecidos neuronais, a MAO participa na regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e regula os estoques intracelulares de monoaminas. Em tecidos periféricos, como intestino, fígado, pulmão e placenta, a MAO protege o organismo oxidando aminas provenientes do sangue ou prevenindo sua entrada na circulação sanguínea. Em microvasos da barreira-hemato-encefálica (BHE), por exemplo, a MAO possui função protetora agindo como barreira metabólica (Youdim et al., 2006a). Além disso, esta enzima é responsável pela biotransformação de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em 1-metil-4-fenilpirinium (MPP^+), uma neurotoxina que causa Parkinson (LANGSTON et al., 1984; FRITZ et al., 1985). Estudos recentes também mostram que a MAO participa em processos apoptóticos sendo que a inibição da sua atividade pode suprimir a morte neuronal (DE ZUTTER et al., 2001).

A reação catalisada pela MAO envolve a desaminação de monoaminas em aldeído e amônia (no caso de aminas primárias) e em aminas substituídas (no caso de aminas secundárias), com geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 2). O H_2O_2 , formado quando o cofator FAD é reoxidado pelo oxigênio, geralmente é inativado por enzimas como catalase e glutathione peroxidase. Entretanto, quando há um aumento na atividade ou expressão da MAO, o H_2O_2 em alta quantidade pode ser convertido por íons Fe^{2+} em radicais hidroxilas (OH^*) altamente reativos (Figura 3). Estes radicais são capazes de provocar efeitos deletérios que podem causar dano e morte neuronal. Já o aldeído formado é rapidamente metabolizado pela enzima aldeído desidrogenase a metabólitos ácidos. Estes metabólitos ácidos (ácido 5-hidróxi-3-indol acético a partir de 5-HT, ou ácido 3,5-diidróxifenil acético a partir de

DA) podem ser utilizados para medidas da atividade da MAO *in vitro* e *in vivo* (YOUDIM et al., 2006b).

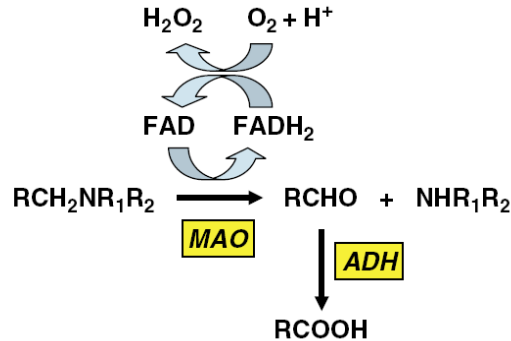


Figura 2 – Metabolismo de monoaminas através desaminação oxidativa realizada pela MAO. RCH₂NR₁R₂: amina primária; MAO: monoamina oxidase; RCHO: derivado aldeído; NHR₁R₂: amina substituída ou amônia; ADH: aldeído desidrogenase; RCOOH: derivado ácido; FAD: dinucleotídeo flavina-adenina; FADH₂: cofator FAD reduzido; O₂: oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio (YOUDIM et al., 2006).

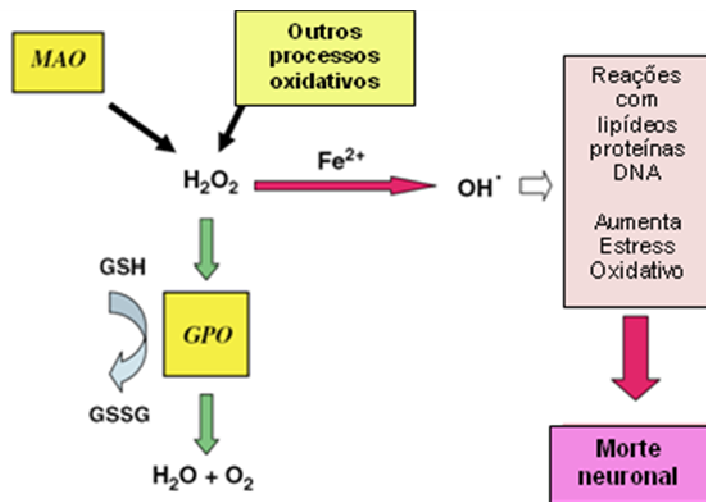


Figura 3 – Mecanismo de neurotoxicidade induzido por ferro e peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton. MAO: monoamina oxidase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; GPO: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; H₂O: água; O₂: oxigênio; Fe²⁺: íon ferro; OH[•]: radical hidroxila (Adaptado de YOUDIM et al., 2006).

Baseado nas evidências de estudos conduzidos com vários inibidores, Jonhston (1968) conclui que a MAO consiste de um sistema binário de enzimas, designadas MAO-A e MAO-B. Estas duas formas da MAO distinguem-se pela sua

seletividade a substratos e inibidores, e distribuição tecidual. MAO-A é inibida irreversivelmente por baixas concentrações de clorgilina e catalisa preferencialmente a oxidação de serotonina (FOWLER et al., 1982), enquanto MAO-B é inativada irreversivelmente por baixas concentrações de selegilina (L-Deprenil) e preferencialmente oxida β -feniletilamina e benzilamina (KNOLL & MAGYAR, 1972). A tiramina, a triptamina e a dopamina são igualmente metabolizadas por ambas as formas da enzima (YOUDIM, 2006a). Entretanto, em humanos a dopamina é oxidada preferencialmente por MAO-B (GLOVER, 1977) e em roedores é oxidada pela MAO-A (JOHNSTON 1968; NEFF & YANG 1974), mas na maioria das espécies ela pode ser metabolizada por ambas isoformas da enzima (O'CARROLL, 1983). Contudo, há numerosas exceções a essa regra pelo fato de a especificidade da MAO aos substratos depender da concentração, afinidade e renovação dos substratos, além de depender da concentração da enzima (TIPTON et al., 1987).

A distribuição da MAO no cérebro apresenta pequenas variações entre as espécies. MAO-A é, predominantemente, encontrada em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como lócus ceruleus, substância negra e regiões periventriculares do hipotálamo. Além disso, MAO-A está co-localizada com a enzima dopamina-beta-hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina (WECKER et al., 2001). Em contraste, estudos imunohistoquímicos mostram que neurônios serotoninérgicos (células do núcleo dorsal da *rafe*) e astrócitos contêm predominantemente MAO-B (WESTLUND et al., 1985; SAURA et al., 1996; JAHNG et al., 1997). Em relação a sua distribuição em tecidos periféricos, a MAO varia dentro de um mesmo organismo. Alguns tecidos como plaquetas de humanos ou rim e fígado de bovinos, apresentam maior quantidade de MAO-B (GRIMSBY et al., 1990). Já outros, como o intestino e a placenta humana e a tireóide de bovinos predomina MAO-A (SIVASUBRAMANIAM et al., 2003; NAGATSU, 2004).

As isoformas da MAO, MAO-A e MAO-B são codificadas por dois genes diferentes, localizados no cromossomo X (Xp11.23), cada um compreendendo 15 éxons com idêntica organização introns-exóns (GRIMSBY et al., 1991), sugerindo que as isoformas são derivadas a partir de uma duplicação de um mesmo gene ancestral. MAO-A e MAO-B humanas são formadas por 527 e 520 aminoácidos, respectivamente, e apresentam 70% da seqüência de aminoácidos idêntica (BACH et al., 1988). A seqüência de aminoácidos da MAO-A de humanos (BACH et al., 1988; HSU et al., 1988), bovinos (POWELL et al., 1989) e ratos (KUWAHARA et al.,

1990) é altamente conservada (>87% idênticas). A seqüência de aminoácidos da MAO-B de humanos (BACH et al., 1988) e ratos (ITO et al., 1988) também é altamente conservada (88 % idênticas).

A partir da obtenção de formas cristalizadas das isoformas da enzima (BINDA et al, 2003; MA et al., 2004; DE COLIBUS et al., 2005; SON et al., 2008) foi possível estabelecer a estrutura tridimensional das isoformas da MAO de ratos e de humanos, bem como prever resíduos importantes para a formação do sítio ativo e os responsáveis pela especificidade à substratos e inibidores. A MAO-A de rato e a MAO-B humana cristalizam como dímeros (Figura 4), com similar interação monômero-monômero. No entanto, a MAO-A humana cristaliza como um monômero (Figura 4). Isto reflete a diferença de aminoácidos na posição 151 (a MAO-A de rato possui um resíduo de ácido glutâmico, enquanto a MAO-A humana possui uma lisina). Devido a esta mudança, a MAO-A humana resulta em um estado de monômero, pois este resíduo está presente na interface do dímero em MAO-A de rato e MAO-B de humanos (ANDRÉS, 2004).

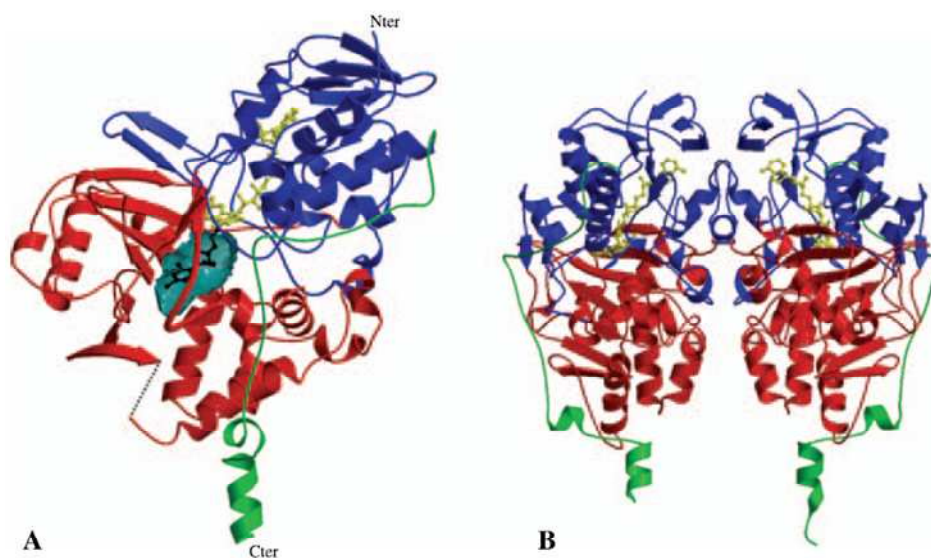


Figura 4 – Estrutura da MAO-A (A) e da MAO-B (B) humanas. Cter: porção C-terminal; Nter: porção N-terminal (EDMONDSON et al., 2007).

Como mostrado na Figura 4, a MAO possui três domínios bem definidos: o domínio do substrato (vermelho), o domínio flavina (azul) com o grupamento flavina em amarelo representando o domínio de ligação dos inibidores clássicos, e o domínio de membrana (verde) (BINDA et al., 2002). O grupamento flavina

apresenta-se covalentemente ligado a um resíduo de cisteína 406 no caso da MAO-A, ou 397 no caso da MAO-B. Além disso, as porções C-terminais são alfa-hélices transmembranas que ancoram a enzima na membrana externa da mitocôndria, com o restante da proteína exposta ao citosol. A entrada do substrato ou inibidor no sítio ativo ocorre perto da intersecção da enzima com a superfície de membrana mitocondrial (YOU DIM et al., 2006). Embora, os dados estruturais da MAO humana e MAO de rato apresentem algumas similaridades, como predito pela sua alta seqüência homóloga, algumas diferenças em relação às formas e dimensões das cavidades dos sítios de ligação a substrato/inibidor podem afetar as interações com inibidores (DE COLIBUS et al., 2005).

3.2. Desenvolvimento de Inibidores da MAO

O primeiro inibidor da MAO introduzido na clínica foi a iproniazida (Figura 5). Ela foi sintetizada em 1951 como um análogo da isoniazida, uma droga usada no tratamento da tuberculose (SELIKOFF et al., 1952). Mudanças no humor foram observadas durante o tratamento crônico de pacientes com tuberculose que recebiam a iproniazida. Estes efeitos de elevação do humor conduziram a uma triagem clínica em pacientes depressivos, que mostrou uma utilidade clínica da iproniazida como um fármaco antidepressivo (CRANE, 1956)

A partir deste achado, durante os anos 1950 passou-se a desenvolver outros derivados hidrazínicos (Figura 5) inibidores da MAO para o tratamento da depressão, como a fenelzina, e a isocarboxazida. Contudo, os relatos de toxicidade hepática, crises hipertensivas, de hemorragia e, em alguns casos, de morte, resultaram na retirada do mercado de muitos fármacos da primeira geração de inibidores da MAO. A toxicidade hepática, associada especificamente com inibidores derivados hidrazínicos, foi evitada pelo desenvolvimento de inibidores não-hidrazínicos, como trancilpromina e pargilina (Figura 5) (ROBINSON, 2002).

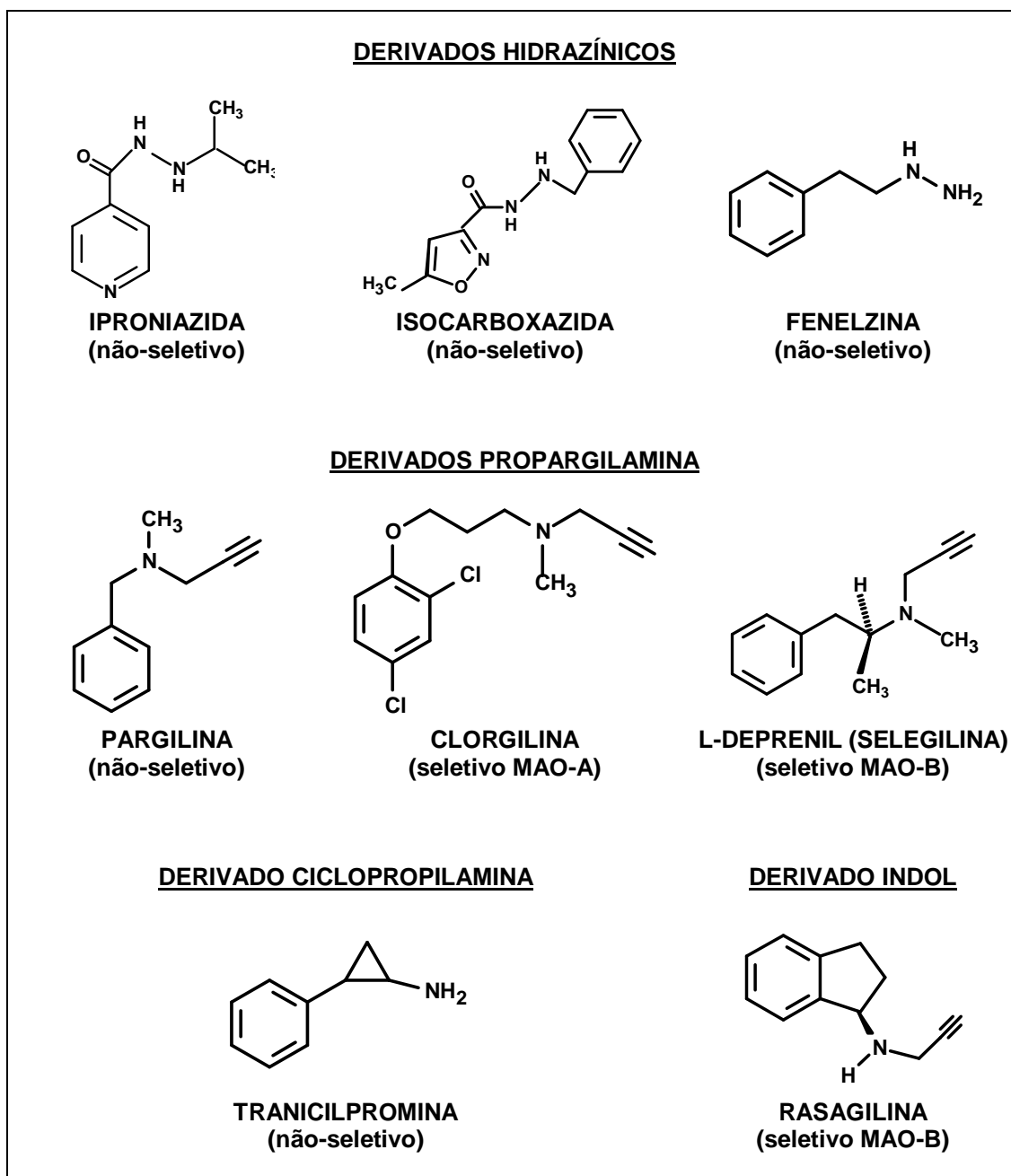


Figura 5 – Estruturas químicas de inibidores irreversíveis da MAO

Entretanto, as crises hipertensivas continuaram a ocorrer. Este efeito colateral, chamado de reação do queijo, ocorre quando a tiramina e outras aminas simpatomiméticas, que são encontradas em alimentos fermentados como queijo (DA PRADA et al., 1988), entram na circulação, e potencializam a atividade cardiovascular simpática pela liberação de noradrenalina (Figura 6). Normalmente,

estas aminas são metabolizadas pela MAO-A presente no intestino e no fígado. No entanto, com o uso de inibidores irreversíveis, a MAO-A fica constantemente inibida, inviabilizando o metabolismo destas aminas exógenas (YOUJIM & WEINSTOCK, 2004).

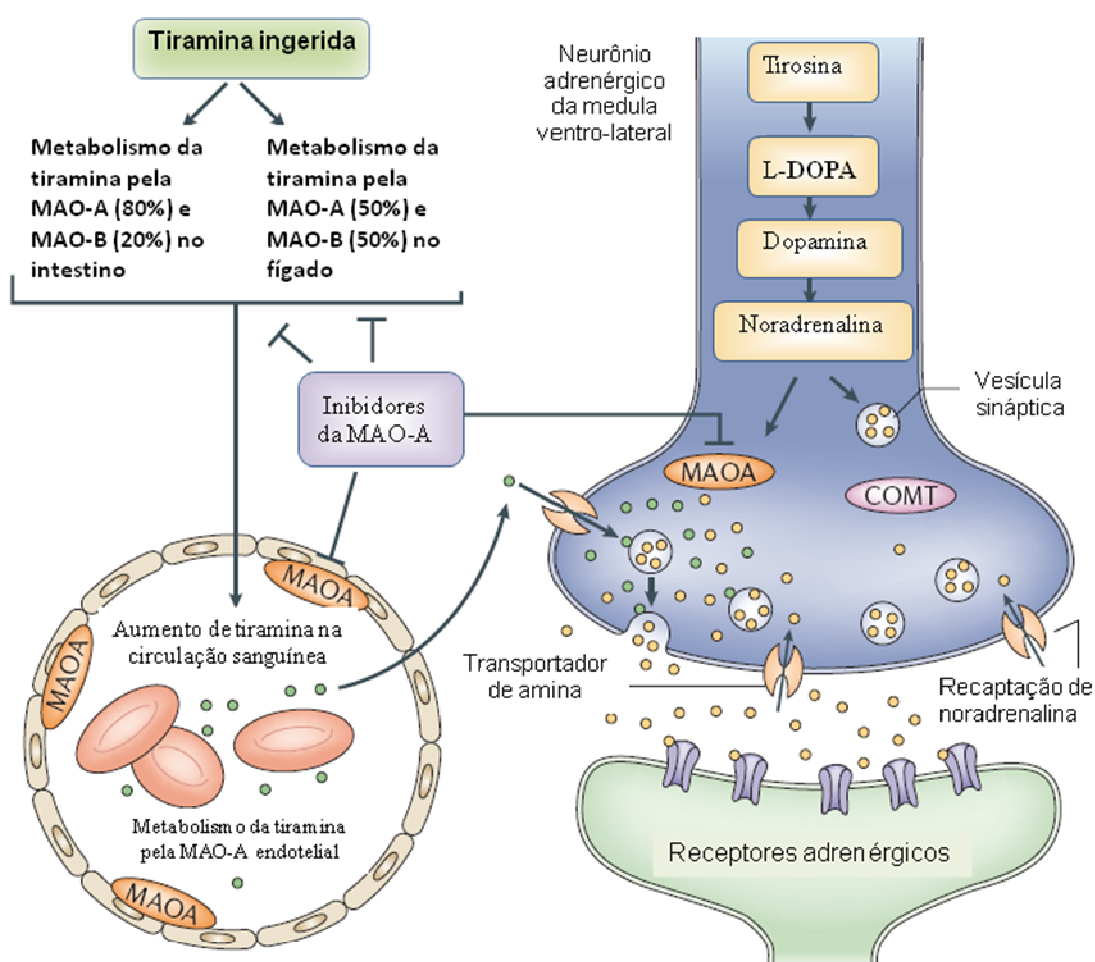


Figura 6 – Mecanismo de potencialização dos efeitos cardiovasculares causados pela tiramina: a “reação do queijo”. Inibidores da MAO inibem a MAO-A intestinal, hepática e endotelial, aumentando a captação de tiramina pelos neurônios pré-sináptico, causando um aumento na liberação de noradrenalina (adaptado de YOUJIM et al., 2006).

A segunda geração de inibidores da MAO emergiu com a descoberta de inibidores seletivos para as formas A e B da enzima. Neste momento, surgiram dois importantes inibidores que auxiliam até hoje os estudos de inibição da MAO. Estes inibidores são a clorgilina e a selegilina (Figura 5), inibidores seletivos da MAO-A (JOHNSTON, 1968) e MAO-B (KNOLL et al., 1965), respectivamente. A clorgilina foi bastante utilizada como antidepressivo e ansiolítico (ZISOOK, 1985). Já a selegilina

ainda é amplamente estudada e utilizada como adjuvante no tratamento da doença de Parkinson, em combinação com a L-DOPA (TETRUD & LANGSTON, 1989; WATERS et al., 2004; ONDO, 2006). Diferentemente dos inibidores não-seletivos da MAO, os inibidores seletivos de MAO-B não apresentam efeitos colaterais como a reação do queijo, em razão do intestino conter pouco MAO-B e a tiramina ser efetivamente metabolizada pela MAO-A intestinal. No entanto a selegilina, devido ser um análogo estrutural da anfetamina, é metabolizada *in vivo* em L-anfetamina e L-metanfetamina (REYNOLDS et al., 1978), metabólitos potencialmente tóxicos, possuindo ações simpatomiméticas semelhantes a anfetamina (SIMPSON, 1978; FINBERG et al., 1981). A rasagilina (Azilect®, Indústrias Farmacêuticas Teva, Israel) (Figura 5) é também um inibidor seletivo e irreversível da MAO-B (YODIM et al., 1995; STERLING et al., 1998), pertencente à segunda geração de inibidores e, diferente da selegilina, é um derivado aminoindol que não gera metabólitos anfetamínicos (FINBERG & YODIM, 2002). Muitos estudos têm comprovado a eficácia da rasagilina no tratamento da doença de Parkinson, sendo aprovada desde 2005, em alguns países, como monoterapia ou como terapia adjuvante com L-DOPA (FERNANDEZ et al., 2007).

Todos os inibidores da MAO originais, da primeira e segunda geração, são inibidores enzimáticos irreversíveis. Estas substâncias ligam-se a MAO formando uma ligação covalente com o sítio ativo da enzima, destruindo definitivamente a função desta enzima (KEARNEY et al., 1971; BACH et al., 1988). A atividade enzimática só é restabelecida após a síntese de novas moléculas de MAO. Algumas vezes estes inibidores são chamados "suicidas", porque, uma vez a enzima ligando-se ao inibidor, este, em essência, comete suicídio, pois não mais exercerá sua função até que nova molécula de enzima seja sintetizada pelo núcleo da célula (FINBERG et al., 1980; KYBURZ, 1990). Além disso, estes inibidores da MAO tendem a perder a seletividade inicial com doses maiores ou com administrações repetidas. Dessa forma, as ações produzidas pelo uso destes compostos podem ter limitações importantes na terapia, como efeitos nervosos centrais (insônia, irritabilidade, agitação, hipomania, supressão do sono REM), disfunções cardiovasculares (hipotensão ortostática), reações hipertensivas graves e distúrbios sexuais (CESURA et al., 1992; STROLIN-BENEDETTI et al., 1992).

Durante os anos 80, uma terceira geração de inibidores da MAO foi desenvolvida: os inibidores seletivos reversíveis. A partir de considerações teóricas,

esperou-se que estes inibidores possuíssem alta seletividade ao longo de uma vasta faixa de doses e durante o uso crônico, induzindo mínimos efeitos adversos. O desenvolvimento de inibidores seletivos e reversíveis da MAO propiciou a perda de muitos efeitos colaterais, de nível central e periférico. Alguns inibidores da MAO-B reversíveis, como lazabemida (Figura 7) foram desenvolvidos (SAURA et al., 1994). A lazabemida é um inibidor altamente seletivo da MAO-B, e diferente da selegilina, não é metabolizado em compostos ativos (CESURA et al., 1996). Além disso, os inibidores da MAO-B são alvos de grandes pesquisas para o tratamento de doenças como Parkinson. Isto é devido a MAO-B, primeiramente, corresponder a 80% da atividade da MAO total em cérebro de humanos. Ainda, a MAO-B é a principal responsável pela degradação da β -feniletilamina, uma amina endógena que estimula a liberação de dopamina e inibe sua recaptção. Assim, a inibição da MAO-B possibilita um aumento nos níveis de dopamina, melhorando a transmissão dopaminérgica, tão prejudicada na doença e Parkinson (CHEN & SWOPE, 2005).

Alguns inibidores reversíveis da MAO-A também foram desenvolvidos como a moclobemina, a toloxatona, a befloxatona, a cimoxatona e a brofaromida (Figura 7). Estes inibidores conseguem bloquear MAO-A no sistema nervoso central (SNC) suficientemente para obter efeitos antidepressivos, enquanto a tiramina provinda da dieta é capaz de deslocar o inibidor da MAO-A periférica, permitindo seu metabolismo (ANDERSON et al., 1993). No entanto, estes inibidores ainda desenvolvem outros tipos de reações adversas. No caso da moclobemida, por exemplo, estes efeitos adversos incluem: distúrbios do sono, aumento da ansiedade, agitação e dor de cabeça (YAMADA & YASUHARA, 2004).

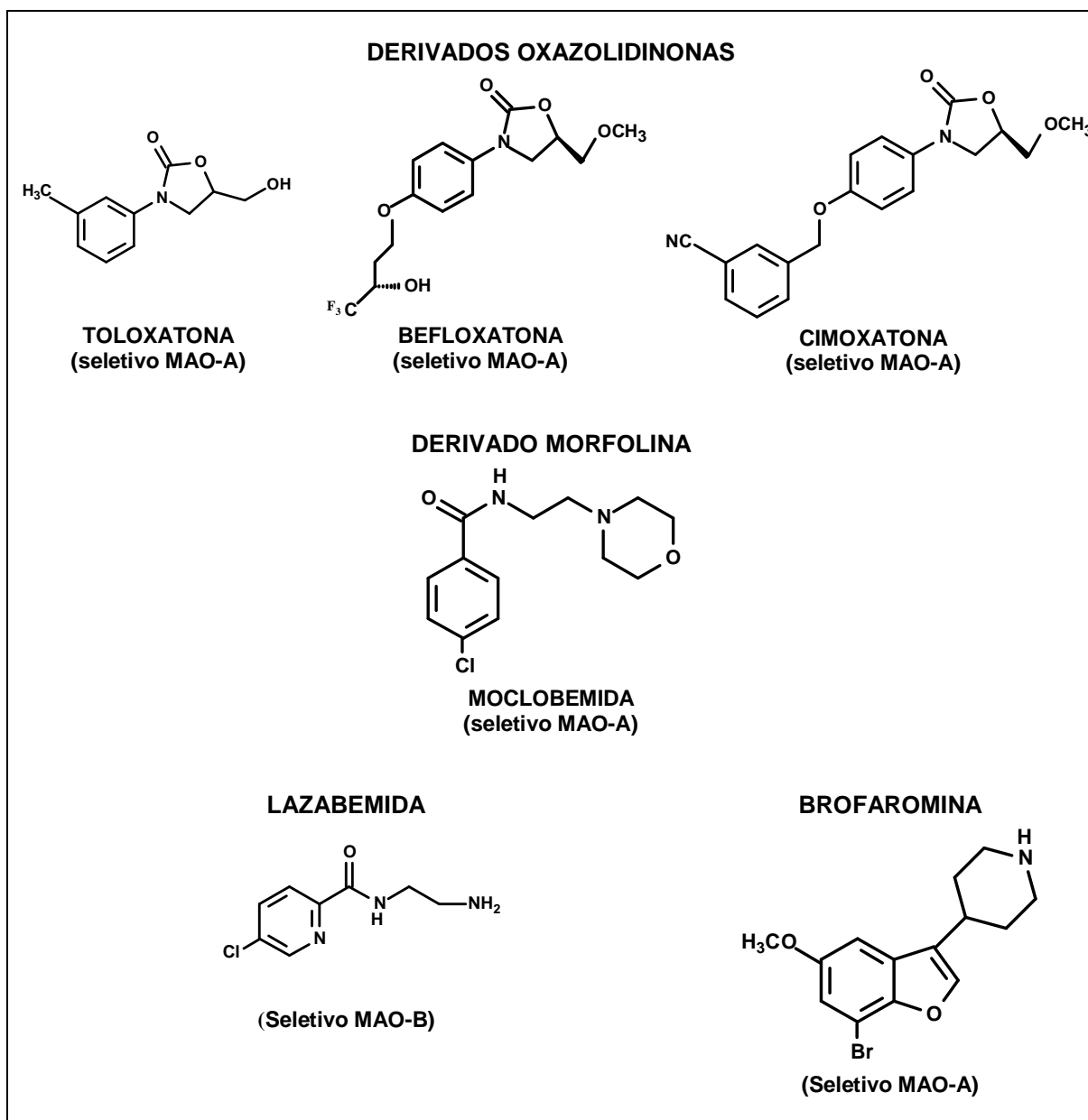


Figura 7 – Estruturas químicas de inibidores reversíveis da MAO.

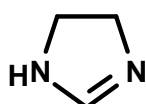
Nas duas últimas décadas, um grande número de inibidores da MAO que incluem inibidores reversíveis e irreversíveis da MAO-A e MAO-B foram desenvolvidos. Muitos já mostraram possuir valor terapêutico em diversas condições, incluindo doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer, e doenças afetivas como a depressão. Contudo, estudos continuam buscando novas moléculas, de diferentes classes químicas (SOUTHAM et al., 2005; BERG et al., 2007; GÖKHAN-KELEKÇİ et al., 2007; CHIMENTI et al.,

2006; MANNA et al., 2002; WOUTERS et al., 1997; ATOMARE et al., 1998; CARRIERI et al., 2002) capazes de inibir as isoformas da MAO de maneira seletiva, potente, reversível, e ausentes de efeitos adversos. Diante disso, muitos estudos ressaltam uma classe química de compostos como tendo um importante papel sobre a atividade da MAO. Este grupo de compostos são substâncias que apresentam, em comum, um núcleo imidazólico (Figura 8) (CARPENÉ et al., 1995; HARFENIST et al., 1996; LALIES et al., 1999; OZAITA et al., 1997; PATERSON et al., 2007; BOUR et al., 2006; GHAZALEH et al., 2007; RAASCH et al., 1999). Embora se acredite que estes compostos não interajam com a enzima da mesma forma que os inibidores clássicos, muitos estudos tratam este grupo de compostos como uma nova ferramenta de inibição da MAO.

3.3. Sítios Imidazólicos

A proposta da existência de sítios imidazólicos surgiu a partir de estudos realizados para entender as ações da clonidina (Figura 8), um agente anti-hipertensivo de ação central e quimicamente uma imidazolina. É descrito na literatura que vários compostos com núcleo imidazólico (Figura 8) ou guanidínicos podem possuir efeitos farmacológicos via interação com α -adrenoceptores e sistemas de transporte de íons (TIMMERMANS & VAN ZWIETEN, 1982; CANTIELLO & LANIER, 1989). Entretanto, dados provenientes de uma série de abordagens diferentes, indicam a existência de proteínas de ligação que reconhecem seletivamente ligantes desta classe química e que podem contribuir para alguns efeitos farmacológicos obtidos por estes compostos.

NÚCLEO IMIDAZOLÍNICO



ESTRUTURA QUÍMICA DA CLONIDINA

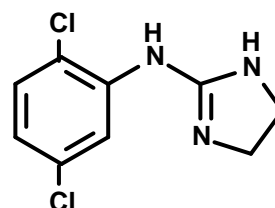


Figura 8 – Estrutura química do núcleo imidazólico e da clonidina.

Uma das primeiras demonstrações da funcionalidade de sítios imidazolínicos foi proposta por Bousquet e colaboradores em 1984 (BOUSQUET et al., 1984). Neste estudo, os pesquisadores compararam as ações hipotensivas produzidas por microinjeções de uma série de agentes, entre eles a clonidina, que diferiam na estrutura química e/ou nas ações em receptores α_2 -adrenérgicos, no cérebro de gatos anestesiados. O local da injeção, a medula rostral ventrolateral (RVL), foi importante, pois esta região é o principal sítio de ação da clonidina na pressão arterial (REIS, 1995). Através de uma cuidadosa análise de estrutura-atividade, os autores concluíram que a hipotensão induzida pelas drogas não estava relacionada às ações dos agentes como agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos, mas sim a estruturas imidazolínicas. Isto os levou a sugerir que deveria existir alguma forma de relação estrutura-atividade que indicaria a existência, nesta região da medula oblongata, de sítios com preferência por estruturas imidazolínicas (BOUSQUET, et al., 1984).

Nos anos subseqüentes, a caracterização farmacológica, através de ensaios de ligação específica, veio corroborar o proposto por Bousquet. Em 1987, Ernsberger e colaboradores (ERNSBERGER et al., 1987) usando o radioligante [3 H]-*para*-aminoclonidina ([3 H]-PAC) revelou sítios, em cérebro de bovinos, que são operacionalmente diferentes de α_2 -adrenoceptores. No mesmo ano, Boyajian e colaboradores (BOYAJIAN et al., 1987), em um estudo auto-radiográfico, reportaram que sítios marcados, no cérebro, por [3 H]-idazoxan, um antagonista imidazolínico de receptores α_2 -adrenérgicos, foram mais abundantes que aqueles marcados por [3 H]-rauwolscina, um antagonista não-imidazolínico altamente seletivo α_2 -adrenérgico. Dois anos depois, em 1989, Wikberg (1989) mostrou a presença de sítios de ligação não-adrenérgicos para [3 H]-idazoxan em cérebro de porquinho-da-índia.

Entretanto, os sítios marcados por [3 H]-idazoxan ou [3 H]-PAC não reconhecem catecolaminas ou outros ligantes seletivos para receptores α_2 -adrenérgicos, possuindo propriedades farmacológicas distintas. Por exemplo, a clonidina e a fentolamina ligam com alta afinidade a sítios marcados por [3 H]-PAC (ERNSBERGER et al., 1987), mas com baixa afinidade à sítios reconhecidos por [3 H]-idazoxan (WILKBERG & UHLEN, 1990). Em contraste, cirazolina, um composto imidazolínico, possui um perfil oposto. Embora se acredite que sítios reconhecidos por [3 H]-clonidina ou [3 H]-PAC e [3 H]-idazoxan representem diferentes receptores, o

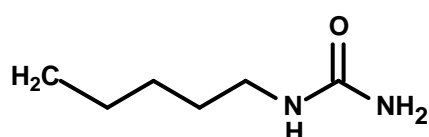
consenso geral presente é de que estes sítios de ligação não-adrenérgicos estão estreitamente relacionados e são denominados genericamente como receptores imidazolínicos (ATLAS, 1991), sítios com preferência à imidazolininas (BRICCA et al., 1989), receptores imidazóis (ERNSBERGER et al., 1987) ou sítios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

Um exame cuidadoso destes sítios sugere que eles são formados por pelo menos três populações, denominadas sítios imidazolínicos I₁, I₂ e I₃ (MICHEL & ERNSBERGER, 1992; MORGAN et al., 1995.). Cada família difere nas propriedades de reconhecimento de seus ligantes, na distribuição tecidual, e possivelmente na sua localização dentro da célula. Os sítios I₁, classicamente reconhecidos por clonidina, foram primariamente localizados no cérebro, em membranas plasmáticas celulares, e parecem estar associados com a regulação da pressão sanguínea (BOUSQUET, 2001). Os sítios I₂ apresentam uma maior distribuição, e estão associados com diversos papéis funcionais. Algumas evidências suportam uma associação com a enzima monoamina oxidase, creatina quinase e enzimas amina oxidases sensíveis a semicarbazida solúveis (TESSON et al., 1995; KIMURA et al., 2003; HOLT et al., 2004). Já a terceira família destes sítios, os sítios imidazolínicos I₃, estão localizados nas células beta do pâncreas e estudos mostram que estes sítios parecem modular a secreção de insulina dependente de glicose (CHAN et al., 1991), provavelmente via uma interação com canais de potássio sensíveis à ATP.

A identificação das três famílias de sítios imidazolínicos levanta questões sobre a existência de ligantes endógenos para estes novos sítios. Em 1984, Atlas e Burstein purificaram parcialmente uma substância do cérebro que deslocava [³H]-clonidina competitivamente, com alta afinidade. O material de estrutura desconhecida foi chamado de substância deslocadora de clonidina (CDS). Meeley e colaboradores (1986) confirmaram a presença de material semelhante a clonidina em cérebro de bovinos e foram os primeiros a demonstrar que o material pode ligar-se com alta afinidade não apenas à α_2 -adrenoceptores, mas também em sítios imidazolínicos, agindo dessa forma como a “clonidina própria do cérebro”. Em 1994, uma molécula de estrutura conhecida com propriedades de ligação semelhantes a

uma CDS foi isolada a partir de cérebro de bovinos. Esta molécula foi identificada sendo a agmatina (Figura 9) (LI et al., 1994).

No entanto, a agmatina é apenas uma das várias moléculas nativas que podem interagir com sítios imidazolínicos e que são tratadas como possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazolínicos. Estudos mostraram que certas substâncias chamadas β -carbolinas (Figura 9) exibem alta afinidade para sítios de ligação imidazolínicos I₁ e I₂ (HUDSON et al., 1999a; HUBBANDS et al., 2001). Estes achados aliam-se ao fato de que algumas β -carbolinas que apresentam alta afinidade também são encontradas endogenamente em tecidos de mamíferos (AIRAKSINEN & KARI, 1981), criando a possibilidade que elas possam representar ligantes endógenos para estes sítios.



AGMATINA

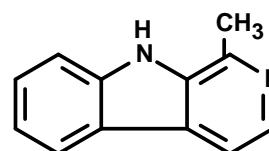
HARMANA (β -CARBOLINA)

Figura 9 – Estrutura dos possíveis ligantes endógenos dos sítios imidazolínicos.

Além disso, nos últimos anos, muitos estudos vêm mostrando ações funcionais das β -carbolinas e sua relação com sítios imidazolínicos. Entre estes estudos, destacam-se suas ações sobre a modulação da temperatura corporal (ROBINSON et al., 2003), capacidade de induzir respostas hipotensivas (GLENNON et al., 2000), modulação dos níveis de monoaminas em regiões cerebrais específicas (ADELL et al., 1996; HUDSON et al., 1999b), capacidade de reduzir parâmetros associados com síndrome de retirada da morfina (HUDSON et al., 1999b; CAPPENDIKJ et al., 1994), modulação da secreção de insulina (JACKSON & NUTT, 1996) e consumo de comida (EDWARDS, 2003; ROMMELSPACHER et al., 1977).

3.4. Sítios Imidazolínicos I₂

O avanço na descoberta de novos ligantes seletivos para sítios imidazolínicos I₂, proporcionou maior entendimento sobre a função, localização e distribuição destas proteínas. Um destes ligantes é o 2-BFI (Figura 10), que possui alta afinidade para sítios I₂ e tem sido usado para caracterizá-los em várias espécies incluindo humanos (HUDSON et al., 1995; LIONE et al., 1996; HOSSEINI et al., 1997). O BU224, o BU239, o LSL60101 e o RS45041 (4-cloro-2-(imidazolina-2-il)isoindolina) (Figura 10) também são ligantes seletivos com alta afinidade de sítios I₂ (MACKINNON, et al., 1995; HUDSON et al., 1999) e exibem dados comparáveis aos observados para o composto 2-BFI em estudos auto-radiográficos. Em contraste, os agentes com alta seletividade para sítios I₁, como clonidina, *para*-aminoclonidina, fentolamina, rilmenidina, moxonidina e cimetidina, possuem uma baixa afinidade (K_i=1-100 μM), e catecolaminas e histamina não se ligam a estes sítios.

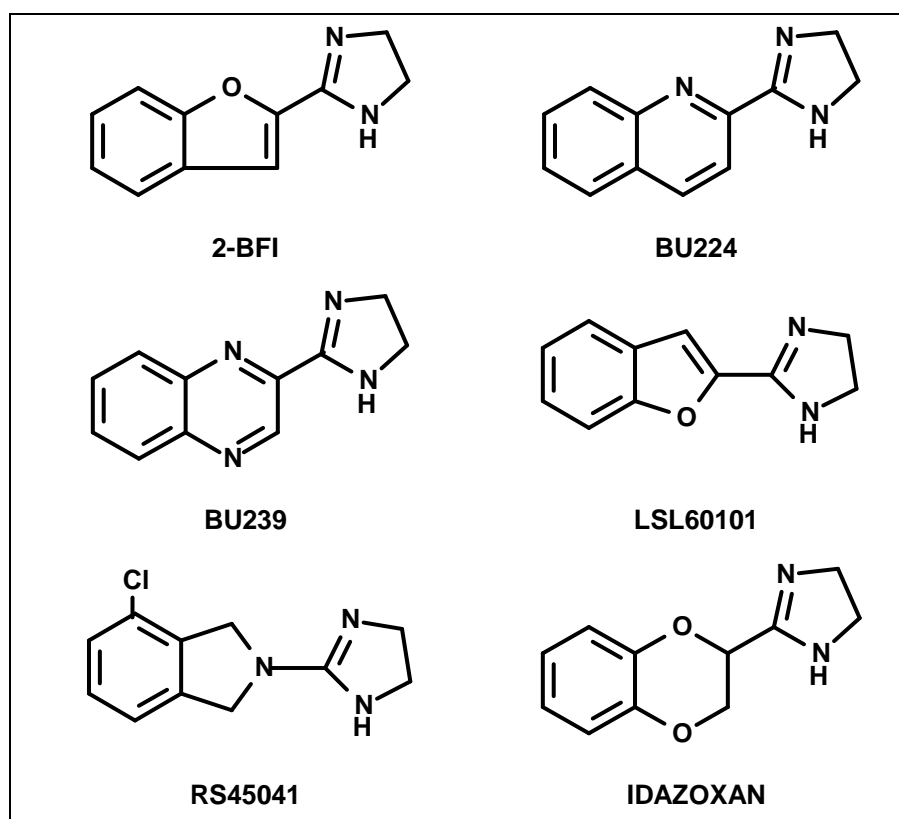


Figura 10 – Estrutura química de ligantes seletivos de sítios I₂

Os sítios I₂ foram identificados em muitos órgãos, tecidos e tipos celulares, como córtex cerebral (WIKBERG et al., 1990), astrócitos (REGUNATHAN et al., 1993a), rim (COUPRY et al., 1990), fígado (ZONNENCHEIN et al., 1990), medula adrenal (REGUNATHAN et al., 1993b), plaquetas (MICHEL et al., 1989), adipócitos (MACKINNON et al., 1989), células pancreáticas (CHAN et al., 1995), próstata (REGUNATHAN et al., 1995), placenta (DIAMANTE et al., 1992), uretra (YABLONSKY et al., 1991), células vasculares (REGUNATHAN et al., 1995). Além disso, estudos realizados com compostos guanidínicos, amilorida e guanabenz, demonstram que há dois subtipos de sítios I₂: I_{2A}, sensível à amilorida; I_{2B}, insensível a amilorida (DIAMANT et al., 1992; MIRALLES et al., 1993; REGUNATHAN et al., 1993; OLMOS et al., 1999)

A nível subcelular, os sítios imidazolínicos I₂ estão associados à membrana da mitocôndria (TESSON et al., 1991a; LIMON-BOULEZ et al., 1992). Esta localização não é comum, sendo compartilhada apenas por receptores benzodiazepínicos do tipo periférico. Entretanto, sítios I₂ e receptores benzodiazepínicos diferem, pois o composto PK11195, ligante com alta afinidade pelo último, não se liga a sítios I₂ (TESSON et al., 1991a). Embora muito bem distribuído, tanto no cérebro como em tecidos periféricos, os sítios I₂ não são expressos em todos os tecidos (TESSON et al., 1992), mesmo aqueles ricos em mitocôndrias. Assim, nem todas as mitocôndrias dos tecidos expressam sítios I₂, indicando a variabilidade de alguns órgãos com respeito à localização subcelular.

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos de transdução de sinal acoplados aos sítios I₂. O fato de que a ligação aos sítios não é modificada por GTP ou seus análogos (DE VOS et al., 1994; BRICCA et al., 1993), que os sítios estão na mitocôndria, e que a exposição de tecidos a ligantes dos sítios falha em aumentar a acumulação de segundos mensageiros como nucleotídeos cíclicos ou fosfatos de inositol (REGUNATHAN et al., 1991) indicam que este sítio não está acoplado à proteína G. Estudos mostram que o tratamento de células adrenais cromafins com ligantes dos sítios produz um lento aumento dose-dependente do influxo de cálcio (REGUNATHAN et al., 1991), associado à liberação de catecolaminas, sugerindo que sítios I₂ possam regular cálcio intracelular, possivelmente por influenciar os estoques mitocondriais. Acredita-se também que outros íons possam estar envolvidos. Estudos com células tubulares proximais renais indicam que o idazoxan e a cirazolina inibem a reabsorção de sódio por mecanismos não-adrenérgicos

(BIDET et al., 1990). Além disso, a ligação a sítios I_2 é sensível ao íon potássio ou a drogas que agem em canais de potássio (ATLAS, 1991) sugerindo alguma associação com canais de potássio. Corroborando esta hipótese, estudos mostram que compostos imidazolínicos são capazes de regular canais de potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) em células pancreáticas (DUNNE, 1991; IBBOTSON et al., 1993).

Embora não esteja clara a função fisiológica destes sítios, alguns efeitos dos ligantes seletivos I_2 são relatados. Entre estes, destacam-se: indução de hiperplasia astrocítica em cérebro de ratos adultos (ALEMANY et al., 1995b), redução da penumbra após isquemia cerebral global ou focal (GUSTAFSON et al., 1989; MAIESE et al., 1992); atenuação da tolerância a antinocicepção induzida por opióides (BORONAT et al., 1998); papel neuroprotetor (BORONAT et al., 1998), aumento do consumo de alimento (BROWN et al., 1995); entre outros.

3.4.1. Relação Funcional entre Sítios I_2 e MAO

A partir da demonstração que sítios de ligação imidazolínicos I_2 estão presentes na membrana mitocondrial externa (TESSON et al., 1991b), muitos estudos geraram evidências de que estes sítios estão relacionados com a enzima monoamina oxidase. Entre as evidências destacam-se as seguintes: 1) o peso molecular aparente dos dois subtipos de sítios I_2 (60-61 e 55 kDa) correspondem aos observados para MAO-A e MAO-B (LANIER et al., 1993); 2) as duas entidades são co-purificadas usando diferentes procedimentos cromatográficos (TESSON et al., 1991a); 3) a purificação parcial da seqüência de aminoácidos dos sítios I_2 indica homologia com a MAO (TESSON et al., 1995); 4) a expressão da MAO em cultura resulta na geração de sítios I_2 (TESSON et al., 1995); 5) proteínas de ligação imidazolínica I_2 foto-marcadas podem ser imunoprecipitadas com anticorpo monoclonal para MAO-A e MAO-B (RADDATZ et al., 1995); 6) o inibidor irreversível da MAO, clorgilina, desloca com alta afinidade e irreversivelmente os sítios I_{2B} mas não o subtipo I_{2A} (OLMOS et al., 1993; 1996); 7) tratamento crônico com vários inibidores irreversíveis da MAO causam uma diminuição na densidade (*down-regulation*) de sítios I_2 em cérebro de ratos (OLMOS et al., 1993; ALEMANY et al., 1995a); 8) a distribuição regional de sítios I_2 , em cérebro de ratos e humanos,

correlaciona-se com a de MAO-B, mas não com a de MAO-A, e a densidade de sítios I_2 e MAO-B, mas não MAO-A, aumenta em cérebro humano durante o processo de envelhecimento (SASTRE & GARCIA-SEVILLA, 1993; 1997).

Outro fato que mostra a relação importante entre sítios I_2 e MAO, é a capacidade de ligantes I_2 inibirem reversivelmente a enzima (CARPENÉ et al., 1995; OZAITA et al., 1997; LALIES et al., 1999; RAASCH et al., 1999.). Entretanto, concentrações relativamente altas de ligantes imidazolínicos são necessárias para provocar efeitos na atividade da enzima. Certos compostos imidazolínicos inibem de maneira não-competitiva a enzima, em concentrações de 100 a 1000 vezes mais alta que os valores de K_i determinados em estudos de radioligação para sítios imidazolínicos. (TESSON et al., 1995; CARPENÉ et al., 1995).

Embora esteja estabelecida uma importante associação dos sítios I_2 com MAO-A e MAO-B, a natureza exata desta interação ainda não está bem esclarecida (TESSON & PARINI, 1991; TESSON et al., 1991, 1995; RADDATZ et al., 1995; RADDATZ & LANIER, 1997a). No entanto, a conclusão comum destes estudos propõe que cada subtipo de sítios I_2 encontra-se em determinada isoforma da MAO. Dessa forma, os sítios I_{2B} representariam sítios de alta afinidade encontrados na MAO-B, entre os aminoácidos K149 e M222; enquanto, sítios de baixa afinidade, sítios I_{2A} , estariam presentes na MAO-A (Figura 11) (RADDATZ et al., 1995, 2000; REMAURY et al., 1999; 2000).

Além disso, estudos mostram que os compostos imidazolínicos não agem como substratos da enzima e não competem com inibidores radio-marcados pela ligação na enzima (SASTRE & GARCÍA-SEVILLA, 1993). Por esta razão, os autores sugerem que o domínio de ligação I_2 na MAO não está localizado no sítio ativo da enzima, no grupo prostético FAD, ou no domínio de ligação de inibidores clássicos da MAO (RADDATZ et al., 1995; LIMON-BOULEZ et al., 1996; RADDATZ & LANIER, 1997). Acredita-se que os sítios I_2 na enzima representam sítios regulatórios ainda desconhecidos capazes de modular a atividade enzimática através de mecanismos inibitórios alostéricos (PARINI et al., 1996). Mais recentemente, foi relatado, que a maioria dos resíduos de aminoácidos identificados como I_2 na MAO-B foram obtidos na entrada da cavidade do sítio ativo da enzima, concordando com estudos cristalográficos (BINDA et al., 2002; MA et al., 2004).

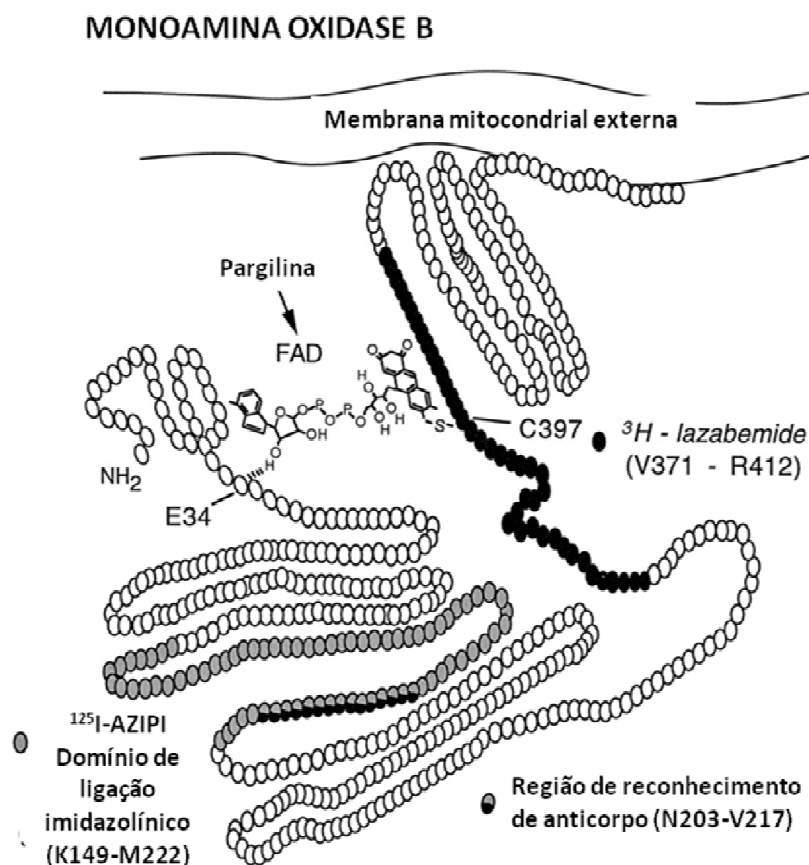


FIGURA 11 – Representação esquemática da MAO-B humana consistindo de 520 aminoácidos (cada círculo). O sítio de reconhecimento do dinucleotídeo é localizado perto da porção amino terminal da proteína e o FAD é covalentemente atacado pelo C397. Associação da membrana envolve a terminação carboxil da MAO-B. Os *círculos sombreados* representam o domínio de ligação imidazolinico interagindo com [¹²⁵I]AZIPI (K149-M222); os *círculos metade preenchidos* indicam o segmento da proteína (resíduos 203-217) usados para gerar anticorpos anti-peptídeo. O inibidor irreversível da enzima, a pargilina, interage covalentemente com o cofator FAD. Inibidores reversíveis, estruturalmente relacionados ao Ro-6327, interagem com o domínio da enzima aos arredores do sítio de incorporação de FAD (V371-R412, *círculos preenchidos*). (RADDATZ et al., 1997).

As isoformas da MAO são identificadas em uma grande variedade de tecidos pelo uso de ensaios enzimáticos, de imunoreatividade e por inibidores radio-marcados (BERRY et al., 1994). Em contraste, a distribuição tecidual de sítios I₂ é mais restrita. Também, há discrepâncias em relação aos níveis de enzima comparados a quantidade de proteínas de ligação I₂ em um mesmo tecido (CESURA et al., 1996; RADDATZ et al., 1995; 1997). No entanto, há várias explicações possíveis para a observação que os sítios I₂ não são detectados igualmente em todos os tecidos que expressam a enzima MAO: 1) a existência de isoformas

adicionais de monoamina oxidase, gerada por variantes de edição de RNAm (“splicing”), que diferem no domínio da enzima que reconhecem ligantes imidazolínicos; 2) modificações pós-traducionais da enzima em células específicas onde os sítios I₂ são seletivamente mascarados; 3) a existência de proteínas tecido-específicas que alostericamente influenciam a acessibilidade dos sítios I₂; e 4) a ocupação de sítios I₂ por ligantes endógenos que estão presentes em determinados tecidos (RADDATZ et al., 1995).

Assim, ainda não está claramente estabelecida a relação entre a MAO e os sítios imidazolínicos. Contudo, acredita-se que de fato os sítios I₂ estão presentes em determinadas subpopulações da enzima (CESURA et al., 1996; RADDATAZ et al., 1995, 1997). Portanto, sabendo que a localização dos sítios I₂ parece ser uma região crítica para a atividade da enzima, a manipulação específica da MAO, através destes sítios, representa um novo alvo terapêutico, dado o papel da enzima em várias doenças neurodegenerativas, do humor e comportamentais (FOLEY et al., 2000).

3.4.2. Síntese de Novas Imidazolinias Seletivas I₂.

Devido ao importante papel funcional dos sítios imidazolínicos e a carência de ligantes seletivos para estes, especialmente para sítios I₂, a síntese e a descoberta de novas moléculas seletivas tornou-se um grande interesse para os pesquisadores. Anastassiadou e colaboradores (2001) sintetizaram três séries de imidazolinias substituídas e avaliaram a seletividade destes compostos para sítios I₁ e I₂, e receptores α_1 - e α_2 -adrenérgicos.

O protótipo da primeira série destes compostos foi obtido a partir do composto tolazolina (Figura 12), através da retirada do grupo metileno entre os anéis imidazolínicos e aromático.

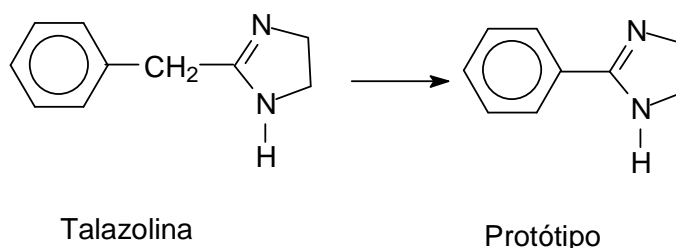


Figura 12 – Esquema da obtenção do protótipo das três séries de imidazolininas

Esta modificação estrutural resultou em um aumento da afinidade por sítios imidazolinínicos e na eliminação da potência por receptores α -adrenérgicos. A fim de aperfeiçoar este resultado, três diferentes séries de imidazolininas foram preparadas conforme descritos na Figura 13.

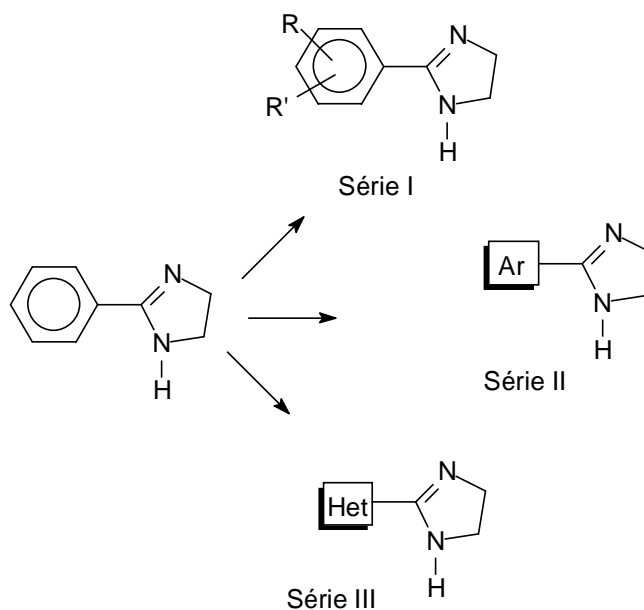


Figura 13 – Farmacomodulação do 2-fenil- Δ^2 -imidazolinina. (Anastassiadou et al., 1996).

Com base nos resultados do estudo de Anastassiadou (2001), compostos das três séries mostraram ser potentes e seletivos para sítios I_2 . Da série I, o composto com grupo metil na posição *para* do anel fenil apresentou um aumento marcante na seletividade para I_2 quando comparado com análogos *orto* e *meta*. A presença de

um grupo fenil na posição *para* também se destacou com alta potência e seletividade para ligação a sítios I₂.

A fim de estabelecer se a presença do anel fenil é necessária para a seletividade dos compostos por sítios I₂, este foi substituído por outros grupos aromáticos e heterocíclicos (Série II e III). O composto benazolina que apresenta o grupamento aromático naftil já foi descrito como altamente potente para sítios imidazolínicos. Das séries II e III, os melhores resultados foram obtidos por análogos quinolinas, como o composto BU224, e indól, e também para o composto 2-BFI, que possui um grupamento benzofurano e já foi descrito como altamente seletivo para sítios I₂. Porém não se sabe se estes ligantes seletivos I₂ alteram a atividade da MAO.

Assim, o trabalho citado acima é apenas um dos vários estudos de síntese direcionada de ligantes I₂. Dessa forma, levando em conta a comprovada interação entre sítios I₂ e MAO, e que muitos ligantes seletivos são capazes de modificar a atividade da enzima, alterada em muitas doenças, surge um grande interesse em estudar os efeitos de novos compostos imidazolínicos sobre a atividade da MAO. Estudos com novas moléculas proverão mais evidências a respeito da verdadeira interação entre os sítios I₂ e a enzima MAO.

3.4.3 Métodos de Síntese de Novos Inibidores da MAO.

Na última década, cada vez mais, pesquisadores têm buscado obter compostos por uma via sintética mais limpa, rápida e com bom rendimento. A utilização de ultrassom como fonte de energia para acelerar reações sinteticamente úteis mostrou-se uma boa alternativa (MANSON, 1997; CELLA et al., 2006; GUZEN et al., 2007). Comparada com métodos tradicionais de síntese, esta técnica é mais apropriada considerando-se os conceitos químicos ambientais (CINTAS et al., 1999).

Recentemente, avaliou-se novamente o uso de água como solvente em reações orgânicas (DALLINGER et al., 2007; LINDSTRÖM, 2002). Água é um solvente não-tóxico facilmente disponível e de baixo custo. Ela também não é inflamável e não agride o meio ambiente. Além disso, em razão das reações orgânicas exibirem, freqüentemente, extraordinária reatividade e seletividade,

quando elas são realizadas em meio aquoso e ligeiramente acima da temperatura ambiente, há maior interesse em explorar, por exemplo, seus efeitos hidrofóbicos (DALLINGER et al., 2007).

Nos últimos anos, o Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da UFSM desenvolveu a síntese de muitas substâncias com diversas ações farmacológicas (SAUZEM et al., 2008; MILANO et al., 2008). Recentemente, eles demonstraram o uso da energia provinda de ultrassom na preparação de compostos heterociclos com uma notável redução no tempo de reação (MARTINS et al., 2006). Além disso, sintetizaram por uma via mais prática e limpa (SANT'ANNA et al., 2008) alguns compostos imidazólicos já descritos por Anastassiadou e colaboradores (2001).

A síntese destes compostos envolveu o uso de irradiação por ultrassom e água como solvente. Este método de síntese apresentou diversas vantagens incluindo alta velocidade de reação, boa pureza e alto rendimento. Em comparação com o método convencional, a aplicação de ultrassom diminuiu significativamente o tempo de reação. Enquanto os métodos tradicionais precisavam de agitação por 12 horas, sob irradiação ultrasônica obteve-se o produto em 12-18 minutos. Além disso, o método utilizado não necessitou o uso de qualquer solvente halogenado ou um método adicional para purificação do produto. Em contraste a outras técnicas, a síntese de 2-imidazolininas substituídas (2-aryl(heteroaryl)-4,5-dihidro-1H-imidazóis) não exigiu o uso de nenhum catalisador (MIRKHANI et al., 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

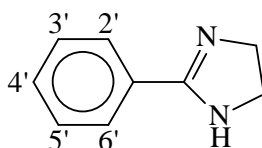
4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 270-300 g (número total de animais: 140) fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7 e 19h), em temperatura de 22°C, com alimento e água “*ad libitum*”. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar de Animais de Laboratório da UFSM (23081.018371/2006-94).

4.2. Compostos imidazólicos estudados:

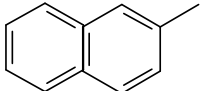
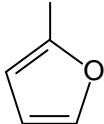
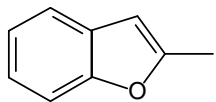
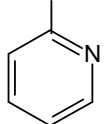
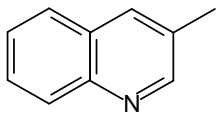
Os 16 2-aryl(heteroaryl)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), conforme ANEXO 1. Os compostos testados são listados abaixo nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Estrutura dos 2-aryl(heteroaryl)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis.



Compostos	2'	3'	4'	5'	6'
3a	H	H	H	H	H
3b	H	H	Me	H	H
3c	H	H	MeO	H	H
3d	H	MeO	MeO	H	H
3e	H	MeO	MeO	MeO	H
3f	H	H	CO ₂ -Ph	H	H
3g	H	H	Cl	H	H
3h	Cl	H	H	H	H
3i	Cl	H	Cl	H	H
3j	H	H	NO ₂	H	H
3k	H	NO ₂	H	H	H

Tabela 2 - Estrutura dos aril(heteroaril)-4,5-diidro-1H-imidazóis.

Compostos	Ar / Het
3l (Benazolina)	
3m	
3n (2-BFI)	
3o	
3p (BU224)	

4.3. Preparação da fração enriquecida em mitocôndrias

Os animais foram sacrificados por decapitação e o cérebro e o fígado foram rapidamente removidos e lavados com tampão de homogeneização (Na_2PO_4 0,0168 M, KH_2PO_4 0,0106 M, sacarose 0,32 M; pH 7,4; 4°C). Os tecidos foram homogeneizados em 4 volumes (massa/volume) de tampão de homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado a temperatura de 4 °C, a 900 x g por 5 minutos e o sobrenadante obtido centrifugado a 12.500 x g por 15 minutos. O *pellet* mitocondrial foi lavado mais uma vez com tampão de homogeneização e recentrifugado sob as mesmas condições. Finalmente, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de tampão de incubação (pH 7,4; Na_2PO_4 0,0168 M, KH_2PO_4 0,0106 M, KCl 0,0036 M, 4°C) e

estocado em alíquotas à -20°C (Soto-Otero et al., 2001). O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. Esta preparação foi utilizada para a determinação da atividade da monoamina oxidase.

4.4. Determinação da atividade da MAO

Para a determinação da atividade da MAO, foram realizados inicialmente experimentos a fim de estabelecer as melhores condições para os ensaios, como concentração de enzima (proteína), concentração de substrato e tempo de ensaio. Os ensaios foram realizados conforme modificações dos métodos de Soto-Otero e colaboradores (2001) e Kraml (1965). O método é baseado na oxidação de quinuramina em 4-hidróxiquinolina pela MAO com ciclização espontânea completa do intermediário aldeído, conforme descrito pela seguinte reação:

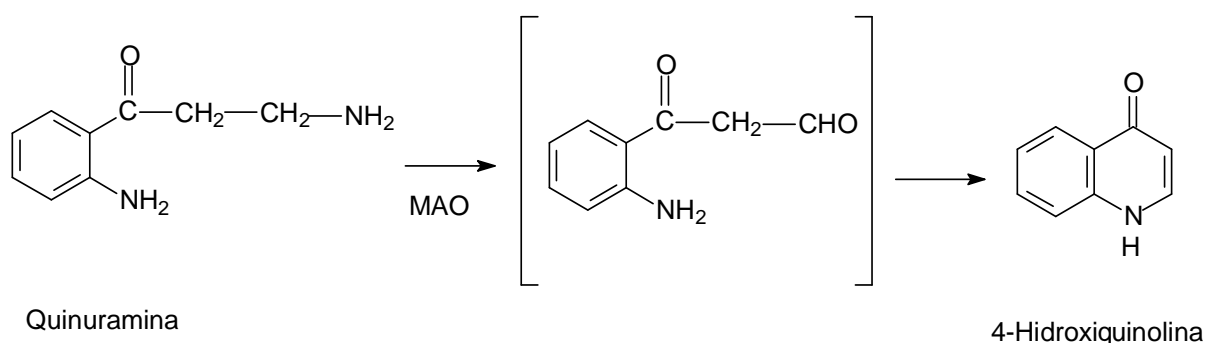


Figura 14 – Formação de 4-hidroxiquinolina através da oxidação da quinuramina pela enzima MAO.

As frações mitocondriais (usualmente 1 mg/ml para cérebro e 0,5 mg/ml para fígado) foram pré-incubadas à 37°C por 5 minutos com os inibidores irreversíveis e seletivos selegilina (250 nM) ou clorgilina (250 nM) para a avaliação da atividade da MAO-A ou MAO-B, respectivamente. As soluções estoques dos compostos estudados foram preparadas em 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Os compostos imidazolinícos foram adicionados à mistura reacional numa faixa de 0,01-1000 microM, com concentração final máxima de 0,5% de DMSO. Após 5 minutos, a quinuramina foi adicionada como substrato não-seletivo em concentrações

submáximas (usualmente 90 μM para MAO-A e 60 μM para MAO-B). A solução foi incubada por mais 30 minutos (homogenato mitocondrial de cérebro) ou 45 minutos (homogenato mitocondrial de fígado), a 37°C e, quando ao fim deste período, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 10% para findar a reação. As amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido para a realização das medidas. A concentração do produto gerado pela MAO, 4-hidroxiquinolina, presente no sobrenadante foi medido espectrofotometricamente em 314 nm utilizando o coeficiente de extinção de 12.300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Quando havia interferência dos compostos testados pelo método espectrofotométrico, o produto da reação foi analisado por método fluorimétrico (λ_{EXC} : 315 nm e λ_{EMIS} : 380 nm), utilizando uma curva padrão do produto.

4.5. Avaliação de parâmetros cinéticos da inibição da MAO

Inicialmente, calculou-se o valor de K_m (concentração de substrato para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima) e $V_{\text{máx}}$ (atividade enzimática na presença de concentrações saturantes de substrato) através da análise de uma curva de concentração de substrato realizada para MAO-A e para MAO-B, em cérebro e fígado de ratos. A partir do valor de K_m previamente calculado e dos valores de CI_{50} (concentração de substrato para que haja 50 % de inibição da atividade da enzima), obtidos a partir das curvas de concentrações dos compostos, calculou-se a constante de inibição (K_i) aparente através da equação: $K_i = CI_{50} / (1 + [S] / K_M)$ (CHENG & PROSOFF, 1973). Com os valores de K_i para cada isoforma da enzima, obteve-se o índice de seletividade (I.S.) dos compostos, conforme a equação: $I.S. = K_i \text{ MAO-A} / K_i \text{ MAO-B}$.

Para avaliar o tipo de inibição apresentada pelos compostos sobre a MAO-A e MAO-B, os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram calculados na presença ou ausência dos inibidores estudados. Neste caso, a concentração utilizada dos compostos inibidores foi próxima aos valores obtidos de K_i .

4.6. Reversibilidade da inibição da MAO

A reversibilidade da inibição da MAO pelos compostos foi avaliada através de diálise conforme modificações no método de Harfenist e colaboradores (1996). Inicialmente realizamos um pré-tratamento da membrana de diálise que consistia nos seguintes passos: 1) lavar as membranas em água destilada à 80° C por 15 minutos; 2) lavar as membranas em bicarbonato de sódio 10 mM por 30 minutos; 3) lavar as membranas em EDTA de sódio 10 mM por 30 minutos; 4) repetir o passo 3 três vezes; 5) lavar as membranas em água destilada a 80 °C por 30 minutos. As membranas de diálise eram armazenadas em solução de etanol 40% na geladeira.

No dia do experimento as membranas eram lavadas com água destilada e tampão de ensaio. A mistura de homogenato mitocondrial de cérebro de ratos, com ou sem os compostos testados (na concentração de 100 µM) foram dialisados à temperatura ambiente, com tampão externo (Na_2PO_4 0,0168 M, KH_2PO_4 0,0106 M, KCl 0,0036 M, ditiotreitól 1 mM, pH 7,4; 4°C) na proporção de 40 ml para cada 1ml de mistura dialisada. O tampão externo era trocado a cada retirada de amostra dialisada, ou seja, em 1, 2, 4, e 6 horas após início da diálise. Após cada período, amostras eram retiradas e ensaiadas para avaliação da atividade da MAO, conforme descrito anteriormente. A avaliação da reversibilidade foi definida conforme critérios estabelecidos por Harfenist e colaboradores (1996). A reversibilidade da inibição da MAO foi avaliada até 24 horas sendo interpretada da seguinte maneira: quando apenas 0-20% da atividade da enzima era restabelecida a ligação do composto com a enzima foi considerada irreversível; valores de 20-80% representam uma inibição parcialmente reversível, enquanto que valores acima de 80% indicavam que a ligação do composto à enzima era reversível (HARFENIST et al.,1996).

4.7. Análise Estatística

Os valores de K_m e CI_{50} foram calculados por uma regressão não-linear utilizando uma função exponencial do tipo hiperbólica e uma função logarítmica do tipo sigmoidal, respectivamente. A diferença significativa entre os grupos foi analisada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de *post hoc* Student-Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. Os

dados eram significativamente diferentes quando o $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prisma 4.0.

5.RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Definições das melhores condições de ensaio: concentração de enzima (proteína), tempo de incubação e concentração de substrato em cérebro e fígado de ratos.

O primeiro passo foi determinar a quantidade de enzima, diretamente relacionada à concentração de proteína, a partir de uma preparação rica em mitocôndria preparada com cérebro e fígado de ratos. Para isso, pré-incubamos o homogenato mitocondrial por 5 minutos, adicionamos o substrato quinuramina (90 μM) e incubamos por mais 5 minutos (cérebro) ou 30 minutos (fígado). Os dados obtidos foram analisados por uma regressão linear que está representada na **Figura 15A**. A análise da reta mostrou ser linear, com $R^2 = 0,98$ (cérebro) e 0,95 (fígado). Conforme os dados obtidos, decidimos realizar os próximos experimentos com a concentração de 1 e 0,5 mg/ml de proteína de homogenato mitocondrial de cérebro e fígado, respectivamente.

A fim de estabelecer o tempo necessário de incubação para que a enzima apresente sua atividade linearmente, realizamos uma curva de tempo de incubação com a concentração de 1 e 0,5 mg/ml de proteína para cérebro e fígado (**Figura 15B**), respectivamente. Novamente, pré-incubamos o homogenato por 5 minutos, adicionamos o substrato quinuramina (90 μM) e incubamos em intervalos de tempo crescente. Através da regressão linear obteve-se um valor de $R^2 = 0,95$ (cérebro) e 0,96 (fígado). Assim, escolhemos o tempo de 30 e 45 minutos de tempo de incubação para realizar os demais experimentos com homogenato de cérebro e fígado, respectivamente. Estes tempos foram escolhidos pelo fato de estarem presentes dentro da linearidade.

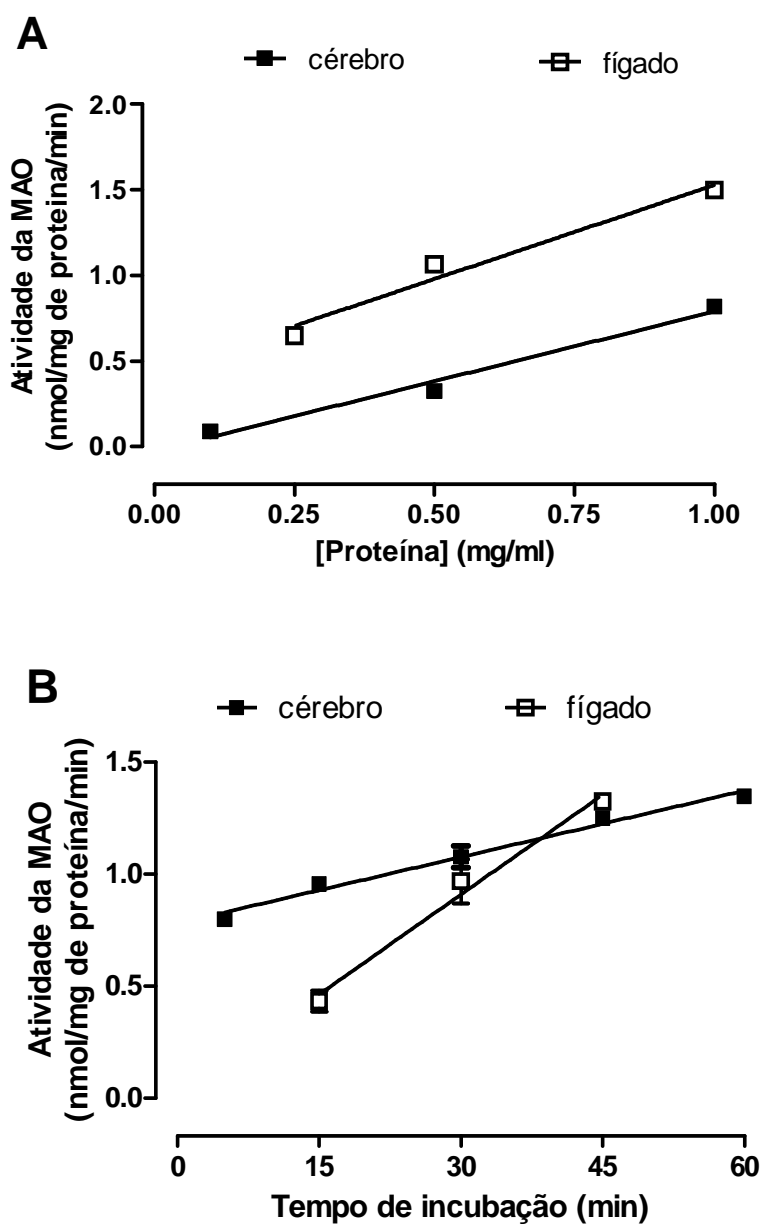


Figura 15 – Curva de atividade total da MAO *versus* concentração de proteína (**A**) e curva de atividade total da MAO *versus* tempo de incubação (**B**) em homogenato mitocondrial de cérebro e fígado de rato. Os resultados foram expressos como média \pm erro da média de três experimentos individuais, realizados em duplicata.

Com o objetivo de estabelecer a concentração de quinuramina necessária para o experimento, e analisar se de fato encontram-se nas faixas de concentrações utilizadas na literatura, realizamos um curva de atividade total da MAO, expressa por velocidade inicial V_0 (nmol/mg de proteína/mim) *versus* concentração de substrato (μM).

Para realizar a curva de concentração de substrato para a MAO-A e a MAO-B, pré-incubamos por 5 minutos o homogenato com o inibidor irreversível seletivo selegilina (250 nM) ou clorgilina (250 nM) para inibir MAO-B ou MAO-A, respectivamente. Após este tempo adicionamos quinuramina em diversas concentrações (5-320 μM). Incubamos por 15 ou 30 minutos, conforme o tecido utilizado, e procedemos de acordo com o descrito nos materiais e métodos. Os dados obtidos geraram uma curva hiperbólica que está representada na Figura 16. Conforme as curvas obtidas para MAO-A (**Figura 16A**) e MAO-B (**Figura 16B**), valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram calculados e são expressos na **Tabela 3**.

Para os experimentos seguintes, continuamos utilizando as concentrações submáximas de 90 e 60 μM de substrato quinuramina para ensaios com MAO-A e MAO-B, respectivamente, conforme referência (SOTO-OTERO et al., 2001).

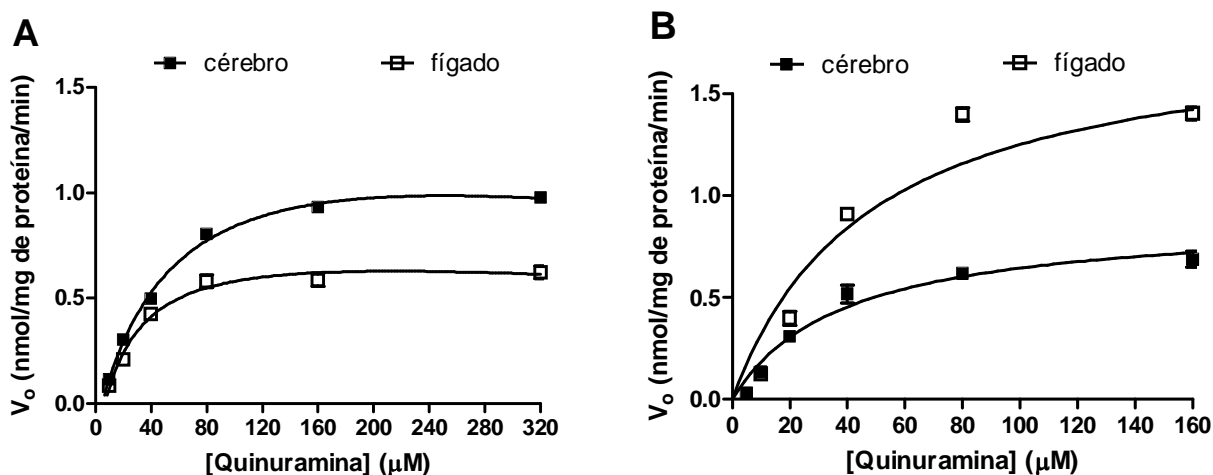


Figura 16 - Curva da velocidade inicial (V_0) da MAO-A *versus* concentração de quinuramina (**A**) e curva da velocidade inicial V_0 da MAO-B *versus* concentração de quinuramina (**B**), em homogenato mitocondrial de cérebro e fígado de ratos. Os resultados foram expressos como média \pm erro da média de quatro experimentos individuais, realizados em duplicata.

Tabela 3 – Valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m para MAO-A e MAO-B, em cérebro e fígado de ratos.

Tecido	MAO-A		MAO-B	
	$V_{m\acute{a}x}^a$	K_m^b	$V_{m\acute{a}x}^a$	K_m^b
Cérebro	1,2 ± 0,2	55,5 ± 5,0	0,9 ± 0,1	39,7 ± 4,8
Fígado	0,70 ± 0,04	38,1 ± 7,5	1,8 ± 0,1	47,9 ± 9,9

Os dados representam a média ± erro da média de quatro experimentos individuais realizados em duplicata.

^a Representa nmol/mg de proteína/min

^b representa μM

5.2. Determinação do efeito inibitório de 2-aril(heteroaril)-4,5-diidro-1H-imidazóis sobre a atividade da MAO *in vitro* em cérebro de ratos.

A atividade inibitória dos compostos, em cérebro de ratos, foi obtida através de uma curva de % de inibição da MAO *versus* concentrações crescentes dos compostos estudados. Na **Figura 17**, está representada como exemplo a curva obtida para os compostos **3d** e **3g**. Curvas semelhantes, para MAO-A e MAO-B, foram realizadas para os 16 compostos testados e os valores das CI_{50} foram calculados. A partir dos valores de CI_{50} e de K_m , anteriormente calculado, obtiveram-se os valores de K_i para os compostos **3a-3p** contra a MAO-A e MAO-B e que são apresentados na **Tabela 4**. Os compostos estudados foram considerados potentes quando os valores de K_i eram menores que 10 μM e seletivos quando seus índices de seletividade eram maiores do que 10. Estes critérios foram estabelecidos a fim de estabelecer compostos primeiramente seletivos em vista da importância de se obter inibidores com grande seletividade para cada isoforma. Entre os compostos estudados que inibiram preferencialmente MAO-A (compostos **3c-e**, **3j**) apenas o composto **3d** mostrou ser seletivo, apresentando um K_i para MAO-A de aproximadamente 73 vezes menor que seu K_i para MAO-B. O composto **3p** também mostrou um efeito inibitório potente ($K_i = 4,86 \mu\text{M}$) para esta isoforma, contudo, este composto não foi seletivo (I.S. = 0,91). Já para o grupo de compostos que inibiu seletivamente MAO-B (**3g-i**, **3k**, **3o**), apenas os compostos **3g** e **3i** demonstram ser potentes com valores de K_i de 5,35 μM e 3,98 μM , respectivamente. Dessa forma,

devido a potência e seletividade apresentadas, os compostos **3d** e **3g** foram os escolhidos para prosseguir com os estudos.

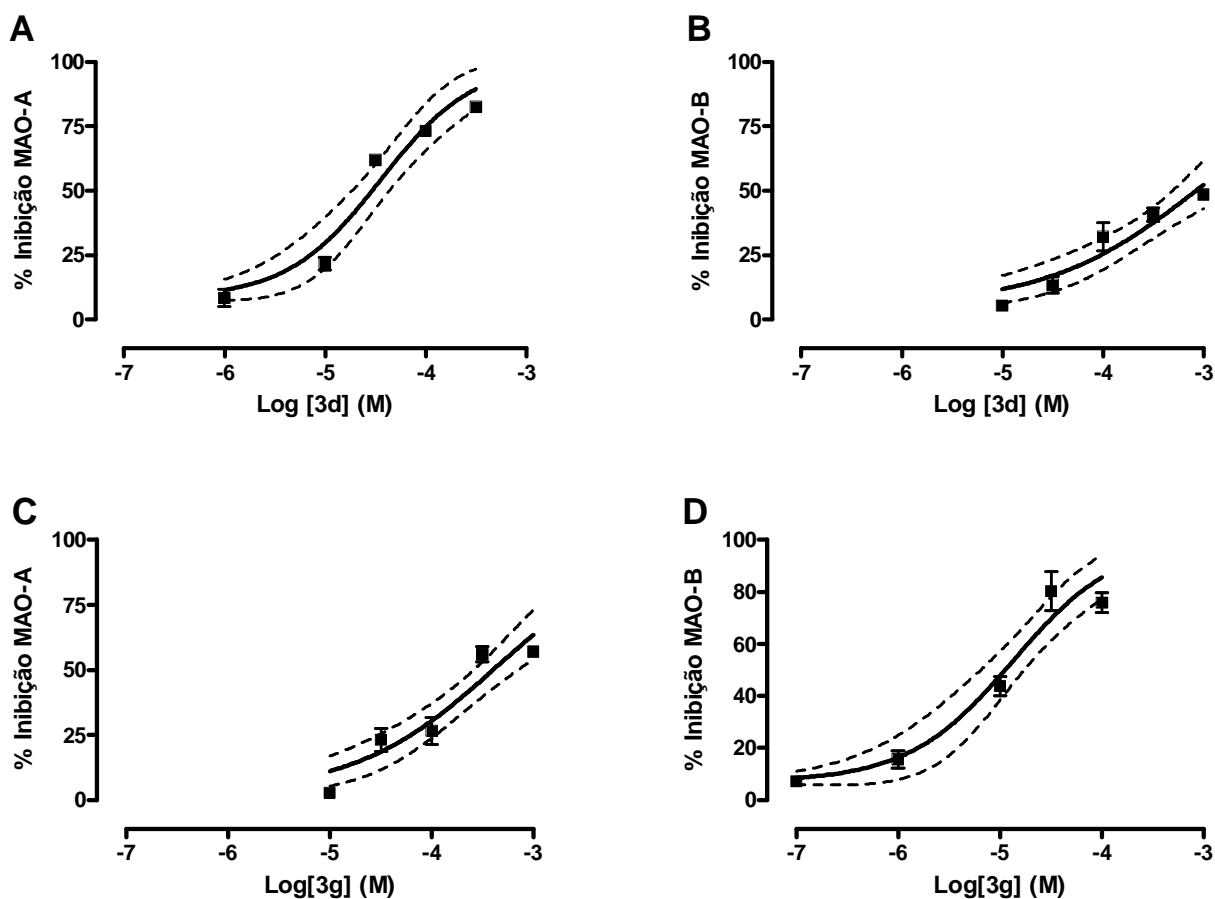


Figura 17 – Curva % de inibição da MAO-A (A, C) e MAO-B (B, D) versus concentração dos compostos **3d** e **3g** em homogenato mitocondrial de cérebro. Os resultados foram expressos como média \pm erro da média de três ou quatro experimentos individuais, realizados em duplicata. As linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança. Os valores de IC_{50} obtidos para o composto **3d** foram de 35,6 (27,0-53,0) e ~1000; para o composto **3g** foram de 463,2 (268,4-709,5) e 13,4 (8,6-20,9) para a MAO-A e MAO-B, respectivamente.

Tabela 4 – Efeito inibitório de 2-aryl(heteroaril)-4,5-diidro-1*H*-imidazóis (**3a-p**) sobre a atividade da MAO cerebral *in vitro*.

Compostos	K _i MAO-A (μM) ^a	K _i MAO-B (μM) ^a	I.S. ^b
3a	28,7 (21,0-39,4)	21,3 (14,7-30,7)	1,3
3b	102,1 (64,4-162)	13,1 (8,1-21,0)	7,7
3c	15,7 (10,2-24,2)	32,7 (20,9-51,1)	0,4
3d	13,6 (9,1-20,2)	~1000	0,01
3e	114,4 (75,0-174,4)	~1000	0,1
3f	12,8 (8,6-19,2)	1,4 (1,0-2,0)	9,2
3g	166,3 (102,3-270,5)	5,3 (3,4-8,3)	31,0
3h	> 1000	24,6 (15,2-39,8)	> 40,7
3i	28,7 (20,9-39,4)	4,0 (2,9-5,3)	10,5
3j	181,4 (115,0-286,2)	> 1000	0,1
3k	> 1000	19,3 (11,1-33,5)	> 51,8
3l	13,9 (6,0-32,0)	1,5 (0,4-5,1)	9,3
3m	> 1000	> 1000	-
3n (2-BFI)	24,9 (14,3-43,6)	3,6 (0,3-4,0)	6,8
3o	> 1000	25,3 (11,8-54,0)	> 39,5
3p (BU224)	4,9 (3,6-6,6)	5,3 (3,8-7,4)	0,9

^aCada valor representa a média (intervalo de confiança) de três ou quatro experimentos independentes.

^bÍndice de seletividade *in vitro* = K_i MAO-A / K_i MAO-B

5.3. Determinação do efeito inibitório dos compostos 3d e 3g sobre a atividade da MAO *in vitro* em fígado de ratos.

As curvas % de inibição da MAO-A e MAO-B foram também realizadas para os compostos **3d** e **3g** em homogenato de fígado e são mostradas na **Figura 18**. Os valores de K_i destes dois compostos contra as isoformas da MAO de fígado de ratos são descritos na **Tabela 5**. Em homogenato mitocondrial de fígado, o composto **3d** mostrou boa potência em inibir MAO-A com um K_i de 5,8 μM . Além disso, conforme os parâmetros estabelecidos inicialmente, este composto foi 10 vezes mais seletivo para isoforma A do que para isoforma B (I.S. = 0,1). O composto **3g** também mostrou, além de potência, seletividade para inibir MAO-B, com um K_i para esta isoforma ($K_i = 1,7 \mu\text{M}$) de aproximadamente 19 vezes menor do que o obtido para MAO-A.

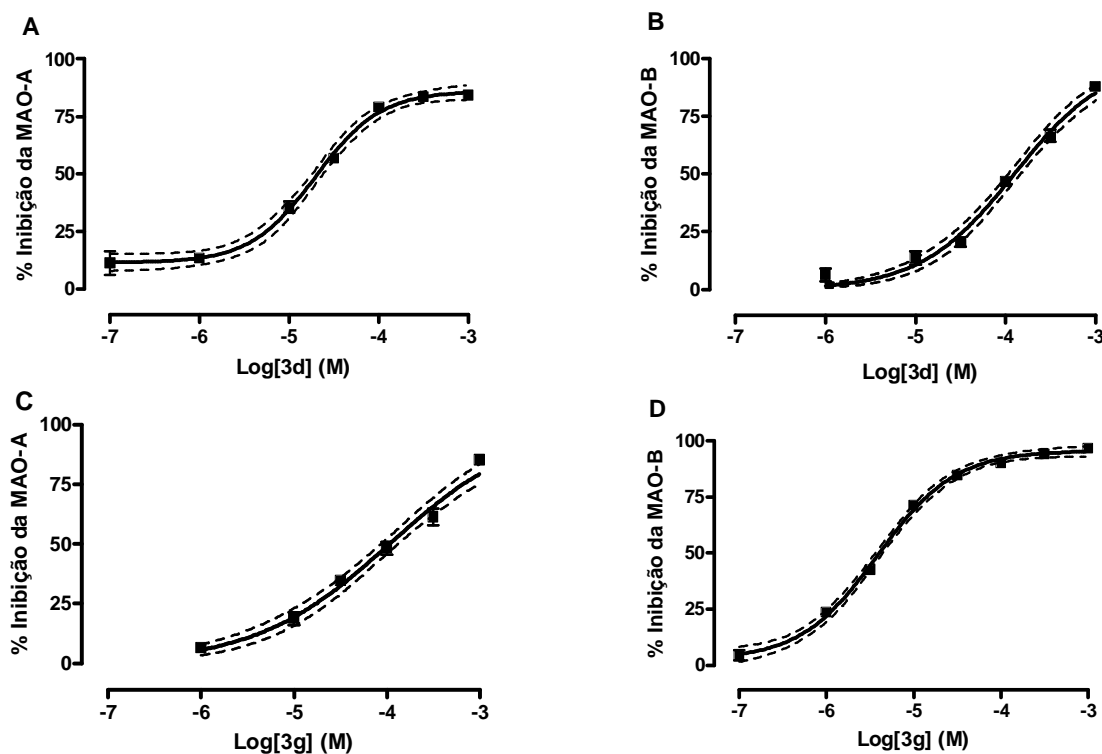


Figura 18 – Curva % de inibição da MAO-A (A, C) e MAO-B (B, D) versus concentração dos compostos **3d** e **3g** em homogenato mitocondrial de fígado de rato. Os resultados foram expressos como média \pm erro da média de três ou quatro experimentos individuais, realizados em duplicata. As linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança. Os valores de CI_{50} obtidos para o composto **3d** foram de 19,6(16,1-23,9) e 124,9(107,2-145,5); para o composto **3g** foram de 106,5(86,5-131,1) e 3,9(3,3-4,5) para a MAO-A e MAO-B, respectivamente.

Tabela 5 - Efeito inibitório *in vitro* dos compostos **3d** e **3g** sobre a atividade da MAO hepática.

Compostos	K _i MAO-A (μM) ^a	K _i MAO-B (μM) ^a	I.S. ^b
3d	5,8 (4,8-7,1)	55,5 (47,6-64,6)	0,10
3g	31,7 (25,7-38,9)	1,7 (1,5-2,0)	18,7

^aCada valor representa a média (intervalo de confiança) de três ou quatro experimentos independentes.

^bÍndice de seletividade *in vitro* = K_i MAO-A / K_i MAO-B

5.4. Determinação da reversibilidade da inibição da MAO cerebral *in vitro* pelos compostos **3d** e **3g**.

Para determinar se a inibição da MAO causada pelos compostos, **3d** e **3g**, é reversível, os compostos foram ensaiados com frações mitocondriais de cérebro de ratos e submetidos à diálise. Conforme a **Figura 19A**, o composto **3d** na concentração de 100 μM foi capaz de inibir seletivamente 80% da atividade da MAO-A. Após uma e duas horas de diálise, **3d** ainda foi capaz de inibir 72 % e 60% da atividade da MAO-A, respectivamente. Decorrido 4 horas, a inibição da MAO-A pelo composto **3d** foi reduzida para apenas 34%, sendo ainda estatisticamente diferente do controle. Contudo, esta inibição foi revertida após 6 horas de diálise, quando mais de 80% da atividade enzimática foi retomada. Dessa forma, conforme os parâmetros de reversibilidade estabelecidos anteriormente, a inibição da MAO-A pelo composto **3d** foi considerada uma inibição reversível. Assim como a imidazolina **3d**, o composto **3g** (**Figura 19B**) foi capaz de inibir mais de 80% da atividade da MAO-B, embora com menor seletividade, pois causou uma inibição de 50% na atividade da MAO-A, que foi estatisticamente diferente do controle. Entretanto, a inibição causada pelo composto **3g** sobre a MAO-A foi rapidamente revertida após duas horas de diálise, quando 80 % da atividade da enzima retomada. Diferente da inibição da MAO-A, **3g** manteve constante a inibição da MAO-B por cerca de seis horas, diminuindo para 40% esta inibição na sexta hora. A atividade da MAO-B foi reabilitada totalmente em 24 horas, quando mais de 90% de atividade da MAO-B foi restaurada. Assim, da mesma forma que o composto **3d**, o composto **3g**, também foi

considerado um inibidor reversível pois, em 24 horas, mais de 80 % da atividade da MAO-B foi retomada. Durante o período de diálise não houve perda na quantidade nem na atividade da enzima, como pode ser visto pelo perfil do grupo controle ao longo das horas após diálise.

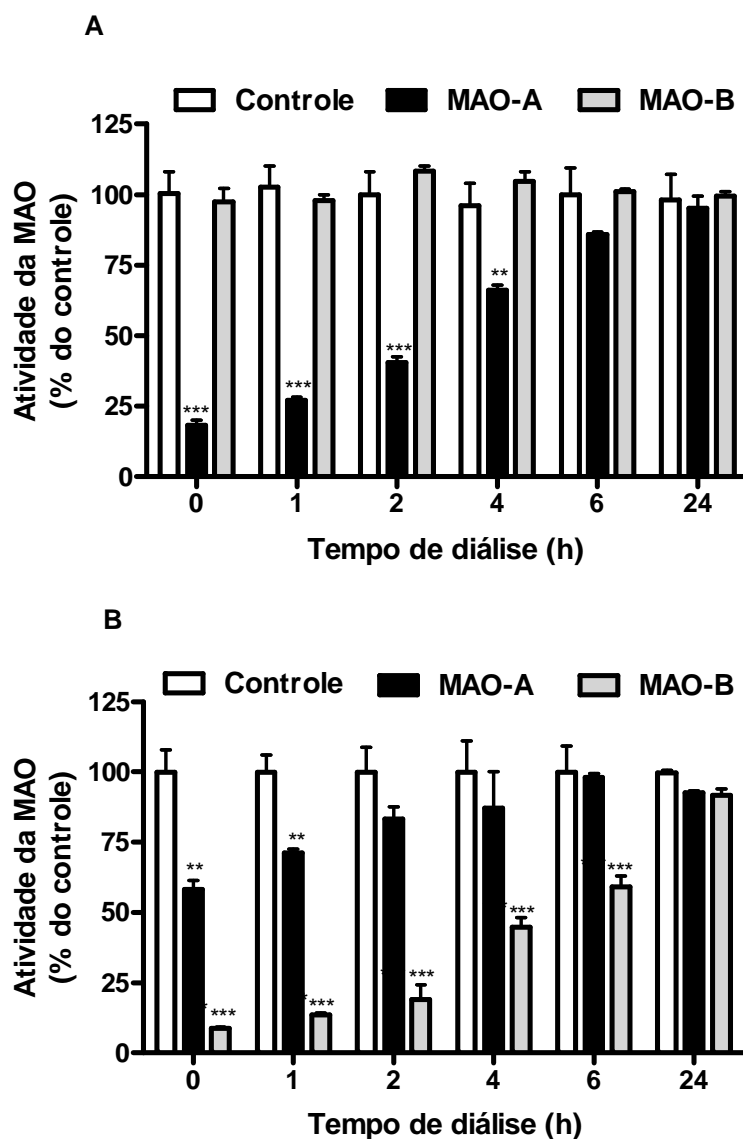


Figura 19 – Reversibilidade da inibição da MAO-A e MAO-B pelos compostos **3d** (A) e **3g** (B). Os dois compostos foram usados na concentração que produzisse cerca de 80 % de inibição (100 μ M). Os resultados foram expressos como média \pm erro da média de 3-4 experimentos individuais, realizados em duplicata. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ representam significativamente diferentes do controle (ANOVA de duas vias usando teste de Bonferroni).

5.5. Estudo de alguns parâmetros cinéticos da atividade da MAO-A e MAO-B em cérebro de ratos na presença dos compostos **3d** e **3g**.

As constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da oxidação do substrato quinuramina pela MAO-A e pela MAO-B foram determinadas a fim de estabelecer alterações mediante a presença dos inibidores imidazolínicos estudados, **3d** e **3g**. Para isso a enzima foi incubada com selegilina (250 nM) para inibir MAO-B, ou com clorgilina (250 nM) para inibir MAO-A, na presença ou ausência dos compostos (concentração de 10 μM que é próxima ao valor de K_i obtido). Os dados obtidos foram traçados por uma hipérbole de Michaelis-Menten e as constantes cinéticas, $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , determinadas por uma regressão não-linear (**Figura 19 e 20**).

As **Figuras 20 e 21** demonstram a velocidade inicial (V_o) *versus* diferentes concentrações de substrato na presença ou ausência dos compostos **3d** e **3g**, respectivamente. A ausência de inibidor é representada pelo grupo controle. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos, para a oxidação pela MAO-A, na **Figura 20**, são expressos na **Tabela 6**. De fato, o composto **3g** na concentração de 10 μM não é capaz de provocar alterações na atividade da MAO-A, não alterando os valores de K_m , nem $V_{m\acute{a}x}$. Já o composto **3d** (10 μM) é capaz de alterar a atividade da isoforma A da MAO, diminuindo significativamente o valor de $V_{m\acute{a}x}$ (controle: $3,0 \pm 0,1$ nmol/mg de proteína/min; **3d**: $1,9 \pm 0,1$ nmol/mg de proteína/min) e aumentando o valor de K_m (controle: $81,7 \pm 10,0$ μM ; **3d**: $136,8 \pm 19,9$ μM). Estes resultados sugerem um mecanismo inibitório misto do composto **3d** sobre a MAO-A.

Para a oxidação da MAO-B, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos na **Figura 21** são expressos na **Tabela 7**. O composto **3d** na concentração de 10 μM não provoca alterações na atividade da MAO-B, não alterando os valores de K_m , nem $V_{m\acute{a}x}$. Já o composto **3g** (10 μM) é capaz de alterar a atividade da MAO-B, diminuindo o $V_{m\acute{a}x}$ (controle: $2,0 \pm 0,2$ nmol/mg de proteína/minuto; **3g**: $1,0 \pm 0,1$ nmol/mg de proteína/minuto) e aumentando o valor de K_m (controle: $40,3 \pm 7,6$ μM ; **3g**: $64,6 \pm 8,0$ μM). Da mesma forma que o composto **3d**, estes resultados sugerem uma interação mista entre o composto imidazolínico **3g** e a MAO-B.

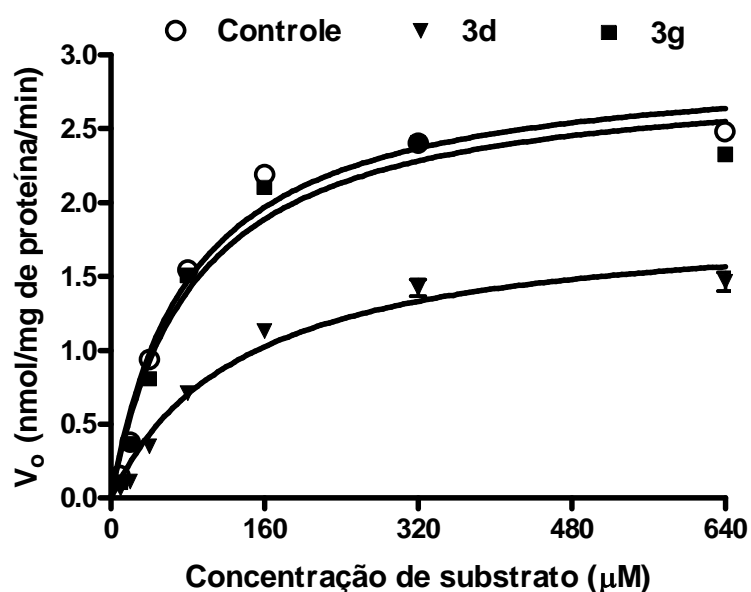


Figura 20 – Cinética de inibição da atividade da MAO-A pelos dos compostos **3d** e **3g**. Representação hiperbólica (gráfico velocidade inicial V_0 versus concentração de substrato) da atividade da enzima medida na presença de concentrações crescentes do substrato quinuramina (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 μM) na presença e ausência de **3d** e **3g** na concentração de 10 μM . Estes dois parâmetros cinéticos foram obtidos a partir de uma regressão não-linear. Os resultados são expressos como média \pm erro da média de quatro experimentos individuais, realizados em duplicata.

Tabela 6 – Efeitos dos compostos **3d** e **3g** sobre as constantes cinéticas para oxidação do substrato quinuramina pela MAO-A.

Grupos	$V_{\text{máx}}$ (nmol/mg de proteína/minuto)	K_m (μM)
Controle (sem inibidor)	$3,0 \pm 0,2$	$81,7 \pm 10,0$
3d (10 μM)	$1,9 \pm 0,2$ **	$136,8 \pm 19,9$ *
3g (10 μM)	$2,9 \pm 0,2$	$84,8 \pm 11,9$

Valores representam a média \pm erro da média de quatro experimentos em duplicata. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ (ANOVA de uma via seguida de teste SNK).

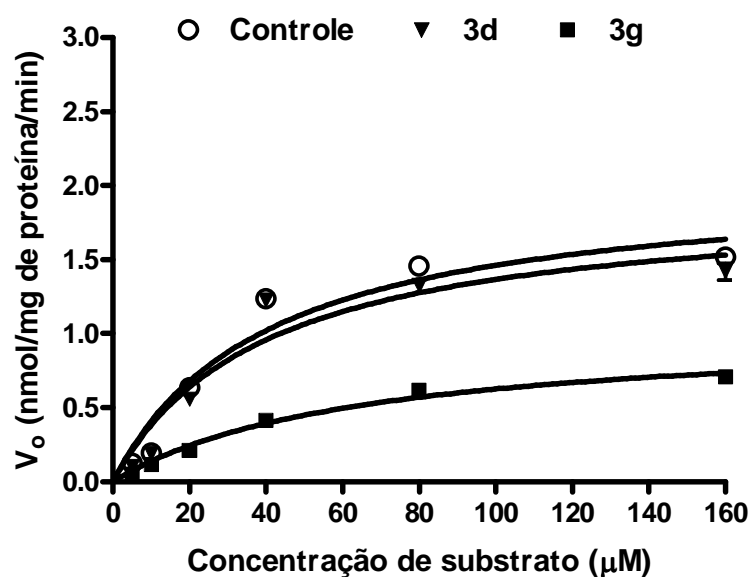


Figura 21 - Cinética de inibição da atividade da MAO-B pelos dos compostos **3d** e **3g**. Representação hiperbólica (gráfico velocidade inicial V_0 versus concentração de substrato) da atividade da enzima medida na presença de concentrações crescentes do substrato quinuramina (5, 10, 20, 40, 80, 160 μM) na presença e ausência de **3d** e **3g** na concentração de 10 μM . Estes dois parâmetros cinéticos foram obtidos a partir de uma regressão não-linear. Os resultados são expressos como média \pm erro da média de quatro experimentos individuais, realizados em duplicata.

Tabela 7 - Efeitos dos compostos **3d** e **3g** sobre as constantes cinéticas para oxidação do substrato quinuramina por MAO-B.

Grupos	$V_{\text{máx}}$ (nmol/mg de proteína/minuto)	K_m (μM)
Controle (sem inibidor)	$2,0 \pm 0,2$	$40,3 \pm 7,6$
3d (10 μM)	$1,9 \pm 0,2$	$39,7 \pm 8,0$
3g (10 μM)	$1,0 \pm 0,1^*$	$64,6 \pm 8,0^*$

Valores representam a média \pm erro da média de quatro experimentos em duplicata. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes do controle quando $*P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida de teste SNK).

6.DISSCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nos últimos 50 anos, desde que os inibidores da MAO foram desenvolvidos como antidepressivos, ocorreu um aumento progressivo nos estudos sobre a inibição da MAO na tentativa de compreender melhor a interação destes compostos com a enzima. Além disso, muitos trabalhos têm procurado estabelecer a importância fisiológica da MAO, bem como o seu papel em doenças neurológicas como a doença de Parkinson e a de Alzheimer, e a depressão. Assim, o desenvolvimento de inibidores da MAO reversíveis e seletivos é importante para o tratamento dos sintomas envolvidos nestas doenças, que podem ser obtidos através do aumento da meia vida das monoaminas neurotransmissoras. No entanto, o estudo de novos inibidores da MAO também é relevante levando em consideração os possíveis efeitos neuroprotetores destes compostos, que podem ser capazes de prevenir ou mesmo retardar a neurodegeneração que ocorre em algumas doenças, possivelmente por diminuir a formação de H_2O_2 (SAURA et al., 1996).

Nos últimos anos, sítios imidazolínicos I_2 foram identificados em ambas isoformas da MAO-A e MAO-B (RADDATZ et al., 1995; TESSON et al., 1995; PARINI et al., 1996). Além disso, foi proposto que o subtipo I_{2A} está localizado na MAO-A e que sítios I_{2B} estão localizados na MAO-B (PARINI et al., 1996). Entretanto, estes sítios parecem não estar localizados no sítio catalítico da enzima, nem no grupo prostético FAD, ou no domínio de ligação de inibidores clássicos da MAO (CARPENÉ et al., 1995; RADDATZ et al., 1995; TESSON et al., 1995; LIMONBOULEZ et al., 1996). Contudo, é comprovado que compostos ligantes de sítios I_2 são capazes de alterar a atividade da enzima (CARPENÉ et al., 1995; TESSON et al., 1995; OZAITA et al., 1997; LALIES et al., 1999; PATERSON et al., 2003; RAASCH et al., 2003; HOLT et al., 2004; JONES et al., 2007). Além disso, estudos mostram que a administração *in vivo* da imidazolina 2-BFI é capaz de aumentar os níveis extracelulares de norepinefrina em cérebro de ratos (NUTT et al., 1995). Assim, sugere-se que estes sítios representam sítios regulatórios desconhecidos na enzima e que seriam capazes de modular a atividade da MAO através de um mecanismo alostérico (PARINI et al., 1996; RADDATZ et al., 1997b).

O presente trabalho confirmou que, de fato, compostos que apresentam núcleo imidazolínico, ligantes de sítios I_2 , são capazes de inibir ambas as isoformas

da MAO. Com base nos valores de K_i e I.S. obtidos para os 16 compostos estudados, podemos sugerir que o grupamento fenil ligado a este núcleo parece ser importante para a inibição da enzima. Com isso, notamos que o deslocamento do grupamento cloro da posição *orto*, do composto **3h**, para a posição *para*, no composto **3g**, parece diminuir a seletividade para a MAO-B. Outro achado interessante é com respeito à inversão da seletividade do composto **3k** devido ao deslocamento de um grupo retirante de elétrons, NO_2 , da posição *meta* do benzeno por um grupo doador de elétrons (MeO) no composto **3d**. Enquanto o composto **3k** foi capaz de inibir seletivamente a MAO-B, o composto **3d** inibiu seletivamente a MAO-A. Isto sugere que o efeito eletrônico pode ser importante para o processo de reconhecimento das imidazolininas pela MAO-A e pela MAO-B.

Alguns compostos como benazolina, 2-BFI e BU224, conhecidos por serem ligantes potentes e seletivos de sítios imidazolinínicos I_2 , também foram estudados. De fato, estes compostos mostraram uma boa atividade inibitória, especialmente contra MAO-B. Alguns trabalhos na literatura já apresentaram valores de CI_{50} para o 2-BFI (11-16,5 μM para MAO-A e 23-43,5 μM para MAO-B) e para o BU224 (4,8-10,7 μM para MAO-A e 38-51,4 μM para MAO-B) (PATERSON et al., 2003; LALIES et al., 1999; PATERSON et al., 2007; OZAITA et al., 1997). Os valores de CI_{50} obtidos neste trabalho para 2-BFI e BU224 foram de 65,0 e 12,7 μM para MAO-A e 9,1 e 13,3 μM para MAO-B, respectivamente. Assim, em nossas condições os compostos 2-BFI e BU224 foram menos potentes em inibir MAO-A e mais potentes para inibir MAO-B, quando comparados com dados da literatura. Entretanto, valores de CI_{50} não geram informações suficientes em razão de ser um fator dependente das condições experimental tais como: métodos usados (fluorimétrico ou radioquímico), substratos mais ou menos seletivos para uma isoforma e condições ambientais importantes. Dessa forma, estes valores não poderiam ser comparados adequadamente. Nós utilizamos valores de K_i , constante de dissociação do complexo enzima-inibidor, para comparar o efeito de diferentes inibidores. Os valores de K_i são mais apropriados para comparações de potência de diferentes estudos, pois é independente das condições experimentais. Assim, quando comparamos os valores de K_i , a potência do composto 2-BFI para inibir MAO-A obtido neste trabalho (29,94 μM) foi similar com os dados da literatura (26 μM) (JONES et al., 2007).

Contudo, os compostos estudados não apresentaram a mesma ordem de potência e seletividade de ligação em sítios I_2 e de inibição da MAO (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Tabela comparativa dos valores de K_i para inibição da MAO-A e da MAO-B, e para ligação a sítios I_1 , I_2 , α_1 e α_2 apresentados por alguns dos compostos imidazolínicos estudados.

Compostos	K_i MAO-A ^a	K_i MAO-B ^a	$K_i I_1$ ^b	$K_i I_2$ ^b	$K_i \alpha_1$ ^b	$K_i \alpha_2$ ^b
3a	28,7	21,3	0,032	0,040	>10	>10
3b	102,1	13,1	1,288	0,010	>10	>10
3c	15,7	32,7	0,035	0,010	>10	>10
3l (Benazolina)	13,9	1,5	0,001	0,001	1,0	1,0
3m	> 1000	>1000	0,575	2,340	>10	>10
3n (2-BFI)	24,9	3,6	0,032	0,002	NA	NA
3o	>1000	25,3	0,251	0,676	>10	>10
3p (BU224)	4,9	5,3	0,144	0,003	>10	2,1

^a Dados obtidos (μ M) no presente estudo;

^b Dados obtidos (μ M) por Anastassiadou e colaboradores (2001);

NA: não apresentou afinidade.

De acordo com a análise de correlação realizada, obtivemos uma relação positiva apenas para MAO-A *versus* I_1 ($r = 0,932$ e $p = 0,007$), para MAO-A *versus* I_2 ($r = 0,955$ e $p = 0,003$), e para MAO-B *versus* I_1 ($r = 0,781$ e $p = 0,022$). Entretanto, não houve correlação significativa entre os parâmetros de inibição da MAO-B e os parâmetros de ligação a sítios I_2 ($r = 0,533$ e $p = 0,173$). Relatos da literatura confirmam que não há correlação significativa entre a potência/seletividade de ligação a sítios I_2 por derivados imidazolínicos e os valores de inibição da atividade MAO-B (OZAITA et al., 1997). De modo geral, estes compostos apresentam de duas a três ordens de potência menores para inibir a MAO que seus valores descritos de afinidade por sítios I_2 . Devido a isso, muitos autores sugerem que os sítios I_2 não estão diretamente relacionados com a MAO (OZAITA et al., 1997). Algumas proteínas com peso molecular aparente de 25-30 kDa, que são muito diferentes dos da MAO-A e MAO-B (BACH et al., 1988) são implicadas na ligação do radioligante [³H]-idazoxan (ESCRIBÁ et al., 1994; 1996) e são fotomarcadas por sondas imidazolínicas (LANIER et al., 1995) em fígado de ratos. Isto sugere que há uma população de sítios I_2 que não são expressos na MAO o que poderia justificar a falta de correlação entre os parâmetros de inibição da MAO e os parâmetros de ligação a

sítios I₂. Entretanto, estes estudos não podem excluir a presença de sítios de ligação adicionais na MAO que não sejam capazes de afetar a atividade da enzima.

Neste trabalho foi realizada também uma comparação do efeito inibitório das imidazolininas sobre a MAO de cérebro e fígado de ratos. Com base nos resultados obtidos, notamos que em fígado de rato, os compostos apresentaram um perfil inibitório diferente dos obtidos em cérebro. Especialmente o composto **3d**, que foi altamente seletivo em inibir MAO-A em homogenato cerebral, apresentou uma perda de aproximadamente 8 vezes na seletividade por esta isoforma em homogenato de fígado, quando comparada à seletividade em cérebro. O composto **3g** também apresentou uma perda da seletividade para MAO-B. Enquanto que no cérebro, **3g** era mais de 31 vezes mais seletivo para a MAO-B do que para a MAO-A, em fígado de rato, este composto mostrou ser apenas 19 vezes mais seletivo para essa isoforma. Dessa forma, nota-se uma diminuição de quase duas vezes na seletividade para a MAO-B em fígado de rato. Estes resultados discrepantes obtidos em diferentes tecidos já foram observados por outros grupos (CURET et al., 1996; MORÓN et al., 2000; SOUTHAM et al., 2005). Contudo, ainda não existe ainda uma explicação clara para este fato.

No entanto, a diferente inibição da MAO observada em fígado e em cérebro poderia resultar de uma diferente disponibilidade de cofatores em cada tecido que são capazes de causar mudanças na sensibilidade de resposta da enzima. Isto ocorre com a enzima prostaglandina sintetase na medula renal, que necessita de um cofator citoplasmático adicional que é capaz de estimular sua atividade de 4 a 10 vezes mais. No entanto, este cofator não influencia a atividade da sintetase de outros tecidos (PONG & LEVINE, 1976; BRUNE & ALPERMANN, 1983). Além disso, há a possibilidade da existência de isoformas adicionais de MAO, geradas por variantes de edição de RNAm (“splicing”). Estas isoformas adicionais poderiam diferir em algum domínio da enzima e dessa forma afetar o reconhecimento de substâncias inibidoras.

Além disso, estudos mostram uma diferente distribuição tecidual de sítios I₂ e a enzima MAO. A localização das isoformas da MAO não é estritamente correlacionada com a expressão dos sítios I₂. No fígado, por exemplo, apenas 5-20% da MAO-B possui domínios de ligação imidazolínicos acessíveis (CESURA et al., 1996). Entretanto, este fato é indeterminante devido à existência de sítios I₂ fora da MAO, o conflito de dados na literatura sobre a densidade da MAO, e a não-

seletividade de vários radioligantes. Ainda, estudos com preparações de plaquetas humanas, que expressão grande quantidade de MAO-B, mostram que não há reconhecimento de sítios I₂ (RADDATZ et al., 1995, 1997). Isto sugere que sítios I₂ na MAO-B não estão igualmente acessíveis em todos os tecidos, sugerindo que há distintas subpopulações da MAO.

Entretanto, o fato de estes compostos apresentarem um perfil inibitório diferente em tecidos centrais e periféricos, como cérebro e fígado, é bastante interessante e vantajoso. Muitos inibidores da MAO-A usados no tratamento da depressão possuem a desvantagem de causarem reações adversas como a conhecida reação do queijo. Isso ocorre em razão destes fármacos inibirem a MAO-A intestinal e hepática, evitando a degradação da tiramina, proveniente da alimentação. Assim compostos, como a imidazolina **3d** estudada neste trabalho, que possuem uma maior seletividade para inibir a MAO-A no cérebro, poderiam ser capazes de produzir efeitos antidepressivos sem, no entanto, causar crises hipertensivas características da inibição da MAO-A sistêmica. Porém, ensaios *in vivo* deverão ser realizados para confirmar esta idéia.

Como já descritos anteriormente, a terceira geração de inibidores da MAO, teve como principal vantagem sobre as outras gerações o fato de inibirem a MAO reversivelmente. Este fato trouxe vantagens à terapia com inibidores da MAO aumentando seu uso na clínica e possibilitando a sua introdução no tratamento de novas patologias. Assim, para o estudo de novos inibidores da MAO torna-se essencial a análise da reversibilidade desta inibição. A análise da irreversibilidade pelo método de diálise pode ser correlacionada com o aumento na pressão sanguínea em ratos que receberam um inibidor irreversível e tiramina via oral (HARFENIST et al., 1996). Assim, a avaliação deste parâmetro é de extrema importância na triagem de novas drogas como inibidoras da MAO. Assim, este método pode substituir o trabalho exigido para analisar, *in vivo*, o potencial de compostos em causar a reação do queijo.

Os dados obtidos neste trabalho sobre a reversibilidade da inibição da MAO-A e da MAO-B pelos compostos imidazolínicos foram relevantes em razão das vantagens de inibidores da MAO reversíveis. A inibição da MAO-A pelo composto **3d** foi sendo revertida ao longo das horas, sendo totalmente restaurada após 6 horas de diálise, quando a enzima apresentou mais de 80% de sua atividade enzimática. Assim, a imidazolina **3d** pode ser considerada um inibidor reversível e seletivo da

MAO-A, tendo um perfil de inibição semelhante aos inibidores da MAO de terceira geração. Este composto poderia ser um alvo para estudos futuros em modelos animais para avaliar o seu potencial antidepressivo. Estudos preliminares mostram que após duas horas da administração subcutânea do composto **3d** por via sistêmica em camundongos, os animais apresentam uma diminuição no tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda (dados não publicados). Este teste é preditivo para substâncias antidepressivas, sugerindo então que o composto **3d** apresenta ação do tipo antidepressiva. A dosagem de monoaminas mostrou que houve um aumento nos níveis de serotonina e uma diminuição nos níveis do metabólito da serotonina, o ácido 5-hidróxi-3-indol acético em algumas regiões do cérebro. Além disso, o efeito no teste de suspensão da cauda pode ser devido à inibição da MAO-A no cérebro.

Entretanto, a imidazolina **3g** apresentou uma inibição da MAO-B mais prolongada. No entanto, ainda sim, foi uma inibição reversível, pois mais de 80% da atividade enzimática foi retomada 24 horas após o início da diálise. A retomada mais rápida da atividade da MAO-A, também inibida pelo composto **3g**, parece ser dependente do efeito. Como o efeito do composto sobre a MAO-A é menor, a reversão da inibição da enzima tende a ocorrer mais rapidamente. Da mesma forma como o composto **3d**, a imidazolina **3g** parece ter o mesmo perfil de inibidores pertencentes à terceira geração de inibidores da MAO, sendo um inibidor reversível e seletivo MAO-B. Assim como muitos inibidores da MAO-B possuem uma eficácia comprovada na terapia de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, o estudo do composto **3g** em modelos animais que mimetizam esta doença, como indução de Parkinson pela neurotoxina MPTP, seria de grande valia. Além disso, visto que os atuais inibidores da MAO-B utilizados como adjuvantes no tratamento de Parkinson são inibidores irreversíveis, como a selegilina e a rasagilina, os compostos apresentados neste trabalho apresentam vantagens por serem inibidores reversíveis da MAO-B.

No presente trabalho, estudamos a natureza da inibição da MAO causada por dois compostos imidazólicos (**3d** e **3g**). O composto **3d** que apresentou uma inibição seletiva para a MAO-A parece ter um mecanismo misto, diminuindo o $V_{m\acute{a}x}$ e aumentando o valor de K_m . O composto **3g** que foi mais seletivo para a MAO-B também parece ter uma inibição de natureza mista (diminui o $V_{m\acute{a}x}$ e aumentou o K_M). Alguns autores classificam a inibição mista como um tipo de inibição não-

competitiva pelo fato do inibidor alterar a afinidade da enzima pelo substrato (Segel, 1975). Tesson e colaboradores (1995) tentaram esclarecer a natureza da inibição da MAO por compostos imidazolínicos. Naquele estudo, ligantes imidazolínicos I_2 (cirazolina e guanabenz) foram mais potentes que ligantes seletivos I_1 (clonidina e moxonidina) em inibir a atividade da MAO. Além disso, cirazolina agiu como um inibidor não-competitivo em membranas renais de coelho (diminuindo valores de $V_{m\acute{a}x}$ sem alteração nos valores de K_m) (TESSON et al., 1995). O fato que alguns derivados imidazolínicos, ditos ligantes seletivos I_2 , são capazes de inibir a atividade da MAO de maneira não-competitiva, sugere que o mecanismo inibitório das imidazolininas é diferente daqueles dos inibidores clássicos da MAO, que interagem com o grupo prostético FAD na MAO. Outros estudos, também revelaram a existência de uma natureza não-competitiva para a inibição da MAO por compostos imidazolínicos e, em particular, uma inibição do tipo mista para o composto 2-BFI (CARPENÉ et al., 1995). Assim, a inibição mista apresentada pelo composto imidazolínico 3d sugere que esta imidazolina não interage da mesma forma que inibidores clássicos da MAO e que ela é capaz de alterar a afinidade da enzima pelo substrato. Entretanto, alguns relatos propõem uma interação competitiva para vários ligantes seletivos I_2 e a MAO (OZAITA et al., 1997) sugerindo que os sítios I_2 não representam sítios regulatórios da MAO. No entanto, estudos de Jones e colaboradores (2007) propõem que os ligantes de sítios I_2 apresentam uma inibição do tipo competitiva com a MAO por interagirem com sítios na cavidade do sítio ativo da enzima, sem interagir propriamente com este. Dessa forma, a presença destes compostos imidazolínicos ligados a estes sítios seria suficiente para bloquear o acesso do substrato ao sítio ativo e então inibir a enzima. Além disso, o “docking” dos compostos 2-BFI e idazoxan com a MAO-A, mostra que o anel imidazolínico destes compostos é acomodado facilmente, juntamente com o restante da molécula, na cavidade larga do sítio catalítico da MAO-A (JONES et al., 2007).

A MAO é atualmente um alvo terapêutico para o tratamento inicial da doença de Parkinson (FERNANDEZ et al., 2007; LECHT et al., 2007). No tratamento da depressão, os inibidores da MAO-A também têm se mostrado uma boa alternativa para os pacientes que não respondem a antidepressivos clássicos (AMREIN et al., 1993, 1999; TILLER, 1993). Observações recentes também sugerem o envolvimento da MAO em outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, já que pacientes com esta doença apresentam níveis aumentados da enzima

(THOMAS, 2000; RIEDERER et al., 2004). Além disso, a atividade da MAO também está modificada em regiões específicas do cérebro de fumantes (FOWLER et al., 1996).

Visto que a MAO é uma enzima multifuncional e possivelmente relacionada com sítios imidazolínicos, acredita-se que ela pode possuir ações ainda desconhecidas ocasionadas pela ocupação dos domínios de ligação imidazolínicos. Além disso, embora os sítios I₂ e a MAO não sejam comumente colocalizados em muitos tecidos, estudos mostram que suas regulações são igualmente dependentes da idade (RENOUARD et al., 1993). Outros achados também mostram que a expressão de sítios I₂ está alterada em cérebro de pacientes com depressão e em algumas doenças neurodegenerativas (RUIZ et al., 1993; OLMOS et al., 1994; GARCÍA-SEVILLA et al., 1996, 1998; SASTRE & GARCÍA-SEVILLA, 1993, 1997; RUGGIERO et al., 1998; REYNOLDS et al., 1996).

Assim, a demonstração que sítios de ligação na MAO, que são reconhecidos por uma classe de compostos farmacologicamente ativos e que são detectáveis em células de tecidos específicos é de particular interesse dado o papel da enzima na etiologia e/ou terapêutica de várias doenças neurológicas. Dessa forma, o estudo de imidazolininas inibidoras da MAO em modelos animais que reproduzam estas doenças é de grande importância para estudos futuros.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, podemos concluir que:

- Os compostos 4,5-diidro-1*H*-imidazol-2-substituídos apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da MAO-A e/ou MAO-B, tanto em cérebro como em fígado de ratos, sendo que as imidazolininas 3d e 3g foram as mais potentes e seletivas em inibir a MAO-A e a MAO-B, respectivamente.
- Os compostos mais potentes e seletivos, 3d e 3g, inibiram reversivelmente as isoformas da MAO;
- As imidazolininas 3d e 3g apresentaram uma inibição do tipo mista sobre a MAO-A e a MAO-B, respectivamente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELL, A. et al. Action of harmane (1-methyl- β -carboline) on the brain: body temperature and in vivo efflux of 5-HT from hippocampus on the rat. **Neuropharmacology** 8:1101-1107, 1996.
- AIRAKSINEN, M. M. & KARI, I. β -carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: occurrence, origin and metabolism. **Med. Biol.** 59:21-34, 1981.
- ALEMANY, R.; OLMOS, G.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. The effects of phenelzine and other monoamine oxidase inhibitors antidepressants on brain and liver I_2 imidazoline-preferring receptors. **Brit. J. Pharmacol.** 114:837-845, 1995a.
- ALEMANY, R.; OLMOS, G.; ESCRIBÁ, P. V.; MENARGUES, A.; OBACH, R.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. LSL60101, a selective ligand for I_2 receptors, on glial fibrillary acidic protein concentration. **Eur. J. Pharmacol.** 280:205-210, 1995b.
- AMREIN, R., HETZEL, W., SATBL, M., SCHMID-BURGK, W. RIMA – a new concept in the treatment of depression with moclobemide. **Int. Clin. Psychopharmacol.** 7:123-132, 1993.
- AMREIN, R., MARTIN, J. R., CAMERON, A. M. Moclobemide in patients with dementia and depression. **Adv. Neurol.** 80:509-519, 1999.
- ANASTASSIADOU, M.; DANOUN, S.; CRANE, L.; BAZIARD-MOUYSSET, G.; PAYARD, M.; CAIGNARD, D.; RETTORI, M.; RENARD, P. Syntheses and pharmacological evaluation of imidazoline sites I_1 and I_2 selective ligands. **Bioorg. Med. Chem.** 9:585-592, 2001.
- ANDERSON, M. C.; HASAN, F.; MCCRODDEN, J. M.; TIPTON, K. F. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. **Neurochem. Res.** 18: 1145-1149, 1993.
- ANDRÉS, A. M. Positive selection in MAO-A gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage. **Hum. Genet.** 115:377-386, 2004.
- ATLAS, D. & BURSTEIN, Y. Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. **Eur. J. Biochem.** 144:187-93, 1984.
- ATLAS, D. Clonidine-displacing substance (CDS) and its putative imidazoline receptor. New leads for further divergence of alpha 2-adrenergic receptor activity. **Biochem. Pharmacol.** 41:1541-49, 1991.

- ATOMARE, C.; CALLAMARE, S. SUMMO, L.; CATTO, M.; CAROTTI, A. Inhibition of monoamine oxidase B by condensed pyridazines and pyrimidines: effects of lipophilicity and structure-activity relationships. **J. Med. Chem.** 41:3812-3820, 1998.
- BACH, A. W.; LAN, N. C.; JOHNSTON, D. L.; ABELL, C. W.; BEMBENEK, M. E. ET AL. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:4934-38, 1988.
- BERG, D.; ZOELLNER, K. R.; OGUNROMBI, M. O.; MALN, S. F.; TERRE´BLNCHÉ, G.; CASTAGNOLLI, N.; BERGH, J. J.; PETZER, P. J. Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues. **Bioorg. Med. Chem.** 15:3692-3702, 2007.
- BERRY, M. D.; JUORTO, A. V.; PATERSON, I. A. Possible mechanisms of action of (-)deprenyl and other MAO-B inhibitors in some neurologic and psychiatric disorders. **Prog, Neurobiol.** 42:375-391, 1994.
- BIDET, M.; POUJEOL, P.; PARINI, A. Effect of imidazolines on Na⁺ transport and intracellular pH in renal proximal tubule cells. **Biochem. Biophys. Acta** 1024:173-78, 1990.
- BINDA, C.; NEWTON-VINSON, P.; HUBÁLEK, F.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nat. Struct. Biol.** 9:22-6, 2002
- BINDA, C.; LI, M., HUBALEK, F., RESTELLI, N., EDMONDSON, D. E., MATTEVI, A. Insight into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100:9750-9755, 2003
- BORONAT, M. A.; OLMOS, G.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease on neurofilament protein by idazoxan and other I₂-imidiazoline ligands. **Brit. J. Pharmacol.** 125:175-185, 1998.
- BOUR, S.; IGLESIAS-OSMA, M.; MARTI, L.; DURO, P.; GACIA-BARRADO, M.; PASTOR, M.; PRÉVOT, D.; VISENTIN, V.; VALET, P.; MORATINOS, J.; CARPENÉ, C. The imidazoline I₂-sites ligands BU224 and 2-BFI inhibit MAO-A and MAO-B activities, hydrogen peroxide production, and lipolysis in rodent and

- human adipocytes. **Eur. J. Pharmacol.** 552:20-30, 2006.
- BOUSQUET, P.; FELDMAN, J.; SCHWARTZ, J. Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 230:232-36, 1984.
- BOUSQUET, P. I1 receptors, cardiovascular function, and metabolism. **Am. J. Hypertens.** 14:317S-321S,2001.
- BOYAJIAN, C.; JOUGHLIN, S. E.; LESLIE, F. M. Anatomical evidence for the alpha2-adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of ³H-rauwolscine and ³H-idazoxan in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 241:1079-91, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.
- BRICCA, G.; DONTENWILL, M.; MOLINES, A.; FELDMAN, J.; BELCOURT, A.; BOUSQUET, P. The imidazoline preferring receptor: binding studies in bovine, rat and human brainstem. **Eur. J. Pharmacol.** 162:1-9, 1989.
- BRICCA, G.; GRENEY, H.; DONTENWILL-KIEFFER, M.; ZHANG, J.; BELCOURT, A.; BOUSQUET, P. Heterogeneity of the specific imidazoline binding of [³H]idazoxan in the human cerebral cortex. **Neurochem. Int.** 22:153-63, 1993.
- BRUNE, K.; ALPERMANN, H. Non-acidic pyrazoles: Inhibition of prostaglandin production, carrageenan oedema and yeast fever. **Agents Act.** 13:359-363, 1983.
- CONTIELLO, H. F., LANIER, S. M. α_2 -adrenergic receptors and the Na⁺/H⁺ exchanger in the intestinal epithelial cell line, HT-29. **J. Biol. Chem.** 264:16000-16007, 1989.
- CAPPENDIKJ, S. L. T.; FEKKES, D.; DZOLJIC, M. R. The inhibitory effect of norharmane on morphine withdrawal syndrome in rats: comparison with ibogaine. **Behav. Brain Res.** 65:117-119, 1994.
- CARPENÉ, C. ; COLLON, p.; REMAURY, A.; CORDI, A.; HUDSON, A.; NUTT, D. J.; LAFONTAN, M. Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I₂ sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 272:681-688, 1995.
- CARRIERI, A.; CAROTTI, A.; CARRECA, M. L.; ALTOMARE, C. Binding models of reversible inhibitors to type-B monoamine oxidase. **J. Computer-Aided Mol.**

- Des.** 16:769-778, 2002.
- CELLA, R., STEFANI, H. A. Ultrasound-assisted synthesis of *Z* and *E* stilbenes by Suzuki cross-coupling reactions of organotellurides with potassium organotrifluoroborate salts **Tetrahedron** 62: 5656, 2006.
- CESURA, A. M.; PLETSCHER, A. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. **Prog. Drug. Res.** 38:171-257, 1992.
- CESURA, A. M.; GOTTOWIK, J.; LAHN, H. W.; LANG, G.; IMHOF, R.; MALHERBE, P.; RÜTHLISBERGER, U.; DAPRADA, M. Investigation on the structure of the active site of monoamine oxidase B by affinity labeling with selective inhibitor lazabemide and by site-directed mutagenesis. **Eur. J. Biochem.** 236:96-1002, 1996.
- CHAN, S. L.; DUNNE, M. J.; STILLINGS, M. R.; MORGAN, N. G. The alpha2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K^+_{ATP} channels in insulin-secreting cells. **Eur. J. Pharmacol.** 204:41-48, 1991.
- CHAN, S. L. F.; BROWN, C. A.; SCARPELLO, K. E.; MORGAN, N. G. Pancreatic β -cells express in imidazoline binding site that is distinct from I_1 and I_2 sites. **Ann. NY Acad. Sci.** 763:153-56, 1995.
- CHEN, J. J.; SWOPE, D. M. Clinical pharmacology of rasagilina: a novel, second-generation propargylamine for the treatment of Parkinson's disease. **J. Clin. Pharmacol.** 45:878-994, 2005.
- CHENG, W. C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.** 22: 3099-3108, 1973
- CHIBA, K.; TREVAR, A.; CASTAGNOLI, N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine MPTP, by brain monoamine oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 120:574-578, 1984.
- CHIMENTI, F.; BOLASCO, A.; MANNA, F.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; BEFANI, O.; TURINI, P.; ALCARO, S.; ORTUSO, F. Synthesis and molecular modeling of novel substituted-4,5-dihydro-(1*H*)-pyrazole derivatives as potent and highly selective monoamine oxidase-A inhibitors. **Chem. Biol. Drug Des.** 67:206-214, 2006.
- CINTAS, P., LUCHE, J. -L. Green chemistry . The sonochemical approach **Green Chem.** 1:115, 1999.

- COUPRY, I.; ATLAS, D.; PODEVIN, R. A.; UZIELLI, I.; PARINI, A. Imidazoline-guanidinium receptive site in renal proximal tubule: asymmetric distribution, regulation by cation and interaction with an endogenous clonidine displacing substance. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 252:293-99, 1990.
- CRANE, G. E. The psychiatric effects of iproniazid. **Am. J. Psychiatry.** 122:494-501, 1956.
- CURET, O., DAMOISEAU, G., AUBIN, N., SONATG, N., ROVEI, V., JARREAU, F. Befloxatone, a new reversible and selective monoamine oxidase-A inhibitor. **I. Biochemical Profile.** 277:253-264, 1996.
- DALLINGER, D.; KAPPE, C. O. Microwave-Assisted Synthesis in Water as Solvent **Chem. Rev.** 107:2563, 2007.
- DA PRADA, M.; ZÜRCHER, G.; WÜRTHRICH, I.; HAEFELY, W. E. On tyramine, food beverages and the reversible Mao inhibitors moclobemide. **J. Neural. Transm.** 26:33-36, 1988.
- DE COLIBUS, L., LI, M., BINDA, C., EDMONDSON, D. E., MATTEVI, A. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO-A): relation to the structures of rat MOA-A and human MAO-B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102:12684-12689, 2005.
- DE VOS, H.; BRICCA, G.; DE KEYSER, J.; DE BACKER, J. P.; BOUSQUET, P.; VAUQUELIN, G. IMidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and alpha 2adrenoceptors in the human central nervous system. **Neuroscience** 59: 589-98, 1994.
- DE ZUTTER, G. S.; DAVIS, R. J. Pro-apopatotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:6168-6173, 2001.
- DIAMANT, S.; ELDAR-GEVA, T.; ATLAS, D. Imidazoline binding sites in human placenta: evidence for heterogeneity and a search for physiological function. **Brit. J. Pharmacol.** 106:101-8, 1992.
- DUNNE, M.J. Block of ATP-regulated potassium chennels by phentolamine and others alpha-adrenoceptor antagonists. **Brit. J. Pharmacol.** 103:1847-50, 1991.
- EDMONDSON, D. E., DE COLIBUS, L., BINDA, C., LI, M., MATTEVI, A. new insights into the structures and functions of human monoamine oxidase A and B. **J. Neural. Transm.** 114:703-705, 2007.

- EDWARDS, L.; ERNSBERGER, P. The I(1)-imidazole receptor in PC12 pheochromocytoma cells reverses NGF-induced ERK activation and induces MKP-2 phosphatase. **Brain. Res.** 980:71-79, 2003.
- EDWARDS, M. M. Imidazole ligands and feeding behaviour: the role of imidazole binding sites. **Ph.D.thesis, University of Bristol, Bristol, UK**, 2003.
- EGLIN, R. M.; HUDSON, A. L.; KENDALL, D. A.; NUTT, D. J.; MORGAN, N. G.; WILSON, V. G.; DILLON, A. P. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazole sites. **TIPS** 19:381-390, 1998.
- ERNSBERGER, P.; MEELEY, M. P.; MANN, J. J.; REIS, D. J. Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla. **Eur. J. Pharmacol.** 134:1-13, 1987
- FERNANDEZ, H. H., CHEN, J. J. Monoamine oxidase inhibitors: Current and emerging agents for Parkinson disease. **Clinical. Pharmacol.** 30:150-168, 2007.
- FINBERG, J. P. M., SABBAGH, A., YODIM, M. B. H. Pharmacology of selective propargyl "suicide" inhibitors of monoamine oxidase. **Enz. Neurotransm. Mental Disease.** 107-119, 1980.
- FINBERG, J. P. M.; TENNE, M.; YODIM, M. B. H. Tyramine antagonistic properties of AGN1135, an irreversible inhibitor of monoamine oxidase type B. **Br. J. Pharmacol.** 73:65-74, 1981.
- FINBERG, J. P. M., YODIM, M. B. H. Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. **Neuropharmacol.** 43:1110-1118, 2002.
- FOLEY P., GERLACH M., YODIM M. B., RIEDERER P. MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? **Parkinsonism. Relat. Disord.** 6:25-47, 2000.
- FOWLER, C. J.; MANTLE, T. J.; TIPTON, K. F. The nature of the inhibition of the rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline. **Biochem. Pharmacol.** 31:3555-61, 1982.
- FOWLER, C. J.; VOLKOW, S. N. D., WANG, G. J., PAPPAS, N., LOGAN, J., MACCREGOR, R., ALEXOFF, D., SHEA, C., SCHLYER, D., WOLF, A. P., WARNER, D., ZEZULKOVA, I., CILENTO, R. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. **Nature** 379: 733-736, 1996.

- FRITZ, R. R.; ABELL, C. W.; PATEL, N. T.; GESSNER, W.; BROSSI, A. Metabolism of the neurotoxin in MPTP, by human liver monoamine oxidase B. **FEBS Lett.** 186:224-228, 1985.
- GARCÍA-SSEVILLA, J. A., ESCRIBÁ, P. V., SASTRE, M., WALZER, C., BUSQUETS, X., JAQUET, G., REIS, D. J., GUIMÓN, J. Immunodetection and quantitation of imidazoline receptors protein in platelets of patients with major depression and in brains of suicide victims. **Arch. Gen. Psychiatry** 53:803-810, 1996.
- GARCÍA-SSEVILLA, J. A., ESCRIBÁ, P. V., WALZER, C., BOURAZ, C., GUIMÓN, J. Imidazoline receptors protein in brains of patients with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 247:95-98, 1998.
- GHAZALEH, H. A.; LALIES, M. D.; HUSBANDS, S. M.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. The effect of 1-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) isoquinoline on monoamine release and turnover in the rat frontal cortex. **Neurosci. Lett.** 422:109-113, 2007.
- GLENNON, R. A. et al. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I₁-imidazoline receptors. **Brit. J. Pharmacol.** 129:1057-1059, 2000.
- GLOVER, V.; SANDLER, M.; OWEN, F.; RILEY, G. J. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. **Nature** 265:80-81, 1977.
- GRIMSBY, J.; LAN, N. C.; NEVE, R.; CHEN, K.; SHIH, J. C. Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. **J. Neurochem.** 55:1166-1169, 1990.
- GRIMSBY, J.; CHEN, K.; WANG, J. J.; LAN, C. N.; SHIH, J. C. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88:3637-41, 1991.
- GÖKHAN-KELEKÇİ, N.; YABANOGLU, S.; KÜPELİ, E.; SALGIN, U.; ÖSGEN, O.; UÇAR, G.; YESILADA, E.; KENDİ, E.; YESILADA, A.; BILGIN, A. A. A new therapeutic approach in Alzheimer disease: Some novel pyrazole derivatives as dual MAO-B inhibitors and anti-inflammatory analgesics. **Bioorg. Med. Chem.** 2007.
- GUSTAFOSN, L.; YOSHITOYO, M.; WIELOCH, T. W. Postischemic administration of idazoxan, an alpha₂-adrenergic receptor antagonist, decrease neuronal damage in the rat brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 9:171-174, 1989.

- GUZEN, K. P., GUARAZEMINI, A. S., ÓRFÃO, A. T. G., CELLA, R., PEREIRA, C. M. P., STEFANI, H. A. Eco-friendly synthesis of imines by ultrasound irradiation **Tetrahedron Lett.** 48: 1845, 2007.
- HARFENIST, M.; HEUSER, D. J.; JOYNER, C. T.; BATCHELOR, J. F.; WHITE, H. L. Seletive inhibitors of monoamine oxidases. 3. Structure-activity relationship of tricyclics bearing imidazoline, oxadiazole, or tetrazole groups. **J. Med.Chem.** 39:1857-1863, 1996.
- HOLT, A.; WIELAND, B.; BAKER, G. B. Allosteric modulation of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in vitro by imidazoline receptors ligands. **Brit. J. Pharmacol.** 143:495-507, 2004
- HOSSEINI, A. R.; KING, P. R.; LOUIS, W. J.; GUNDLACH, A. L. [3H]2-(2-Benzofuranyl)-2-imidazoline, a highly selective radioligand for I₂-imidazoline receptor binding sites. Studies in rabbit kidney membranes. **Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 355:131-138, 1997.
- HUDSON, A. L.; et al. Harmane, norharmane and tetrahydro- β -carboline have high affinity for rat imidazoline binding sites. **Brit. J. Pharmacol.** 126:2P, 1999a
- HUDSON, A. L. et al. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. **Ann. NY Acad. Sci.** 881:81-91, 1999b.
- HSU, Y. P.; WEYLER, W.; CHEN. S.; SIMS, K. B.; RINEHART, W. B. ET AL. Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. **J. Neurochem.** 51: 1321-24, 1998.
- HUSBANDS,S. M. β -carboline binding to imidazoline receptors. **Drug Alcohol Depend.** 64:203-208, 2001.
- IBBOTSON, T.; EDWARDS,G.; WESTON, A. H. Antagonism of levcromakalin by imidazoline- and guanidine-derivatives in rat portal vein: involvement of the delayed rectifier. **Br. J. Pharmacol.** 110:1556-64, 1993.
- ITO, A.; KUWAHARA, T.; INADOME, S.; SAGARA, Y. Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 157:970-76, 1988.
- JACKSON, H. C. & NUTT, D. J. Imidazoline receptors and ingestion. In **Drug Receptors Subtypes and Ingestive Behaviour.** Cooper, S.J. & P. G. Clifton, Eds.: 267-83. Academic Press. London.
- JAHNG, J. W.; HOUPPT, T. A.; CHEN, K.; SHIH, J. C.; et al. Localization of

- monoamine oxidase A and B mRNA in the brain by in situ hybridization. **Synapse** 25:30-36, 1997.
- JOHNSTON, J. P. Some observations up on a new inhibitors of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochem. Pharmacol.** 17:1285-98, 1968.
- JONES, T. Z. E., GIURATO, L., GUCCIONE, S., RAMSAY, R. R. Interactions of imidazoline ligands with the active site of purified monoamine oxidase A. **FEBS J.** 274:1567-1575, 2007.
- KEARNEY, F. B.; SALACH, J. I.; WALKER, W. H.; SENG, R. L.; KENNEY, W.; ZESZOLEK, E.; SINGER, T. P. The covalently bound flavin of hepatic monoamine oxidase I. isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding to the 8 α -position. **Eur. J. Biochem.** 24:321-327, 1971.
- KIMURA, A.; TYACKE, R. J.; MINCHIN, M. C.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. Identification of an I₂ binding protein from rabbit brain. **Ann. NY Acad. Sci.** 1009:364-366, 2003.
- KNOLL, J.; ECSERY, z.; KELEME, K.; NIEVEL, J.; KNOLL, B. Phenylisopropylmethyl-propinylamine (E-250), a new psychic energizer. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 155:154-164, 1965.
- KNOLL, J.; MAGYAR, K. Some puzzling pharmacologic effects of monoamine oxidase inhibitors. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 5:393-408, 1972.
- KRAML, M. A rapid microfluorometric determination of monoamine oxidase. **Biochem. Pharmacol.** 14:1684-6, 1965.
- KUWAHARA, T.; TAKAMOTO, S.; ITO, A. primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. **Agric. Biol. Chem.** 54:253-57, 1990.
- KYBURZ, E. New developments in the field of MAO inhibitors. **Drugs News Perspect.** 3:592-599, 1990.
- LALIES, M. D.; HIBELL, A.; HUDSON, A. L.; NUTT, D. J. Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline2 site-selective ligands. **Ann. NY Acad. Sci** 881:114-117, 1999.
- LANIER, S. M.; IVKOVIC, B.; SINGH, I.; NEUMEYER, J. L.; BAKTHAVACHALAM, V. Visualization of multiple imidazoline/guanidinium-receptive sites. **Biol. Chem.** 268:16047-16051, 1993.
- LECHT, S., HAROUTIUNIAN, S., HOFFMAN, A., LAZAROVICI, P. Rasagiline – a

- novel MAO-B inhibitor in Parkinson's disease therapy. **Ther. Clin. Risk Manag.** 3:467-474, 2007.
- LI, G.; REGUNATHAN, S.; BARROW, C. J.; ESHRASHI, J.; COOPER, R.; REIS, D. J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science** 263:966-69, 1994.
- LIMON-BOULEZ, I.; COUPRY, I.; LANIER, S. M.; PARINI, A. Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive site from rabbit kidney. **J. Biol. Chem.** 267:21645-21649, 1992.
- LIMON-BOULEZ, I.; TESSON, F.; GARGALIDIS-MOUDANOS, C.; PARINI, A. I₂-imidazoline binding sites: Relationship with different monoamine oxidase domains and identification of histidine residues mediating ligand binding regulation by H⁺. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 276:359-364, 1996
- LINDSTRÖM, U. M. Stereoselective Organic Reactions in Water. **Chem. Rev.** 102:2751-2772, 2002.
- LIONE, L.; NUTT, D.; HUDSON, A. [³H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline: a new selective high affinity radioligand for the study of rabbit brain imidazoline I₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.** 304:221-229, 1996.
- MA, J., YOSHIMURA, M., YAMASHITA, E., NAKAGAWA, A., ITO, A., TSUKIHARA, T. Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrate and inhibitors. **J. Mol. Biol.** 338:103-102, 2004.
- MACKINNON, A. C.; BROWN, C. M.; SPEDDING, M.; KILPATRICK, A. T. [³H]-Idazoxan binds with high affinity to two sites on hamster adipocytes: an alpha 2-adrenoceptor and a non-adrenoceptor site. **Brit. J. Pharmacol.** 98:1143-50, 1989.
- MACKINNON, A. C.; REDFERN, W. S.; BROWN, C. M. [³H]-RS-45041-190: a selective high-affinity radioligand for I₂ imidazoline receptors. **Brit. J. Pharmacol.** 116:1729-1736, 1995.
- MAIESE, K.; PEK, L.; BERGER, S. B.; REIS, D. J. Reduction in focal cerebral ischemic by agents acting at imidazole receptors. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 12:53-63, 1992.
- MANNA, F.; CHIMENTI, F.; BOLASCO, A.; SECCI, D.; BIZZARRI, B.; BEFANI, O.; TURINI, P.; MONDOVI, B.; ALCARO, S.; TAFI, A. Inhibition of amine oxidases activity by 1-acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1*H*)-pyrazole derivatives. **Bioor. Med. Chem. Lett.** 12:3629-3633, 2002.

- MANSON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chem. Soc. Rev.** 26:443, 1997.
- MARTINS, M. A. P.; PEREIRA, C. M. P.; CUNICO, W.; MOURA, S.; ROSA, F. A.; PERES, R. L.; MACHADO, P.; ZANATA, N.; BONACORSO, H. G. Ultrasound promoted synthesis of 5-hydroxy-5-trihalomethyl-4,5-dihydroisoxazoles and beta-enamino trihalomethyl ketones in water. **Ultrason. Sonochem.** 13:364, 2006.
- MEELEY, M. P.; ERNSBERGER, P.; GRANATA, A. R.; REIS, D. J. An endogenous clonidine-displacing substance from bovine brain: receptor binding and hypotensive actions in the ventrolateral medulla. **Life Sci.** 38:1119-26, 1986.
- MICHEL, M. C.; BRODDE, O. E.; SCHNEPEL, B.; BEHRENDT, J.; TSCHADA, R.; et al. [³H]-Idazoxan and some other alpha 2-adrenergic drugs also binds with high affinity to a nonadrenergic site. **Mol. Pharmacol.** 35:324-30, 1989.
- MICHEL, M. C., ERNSBERGER, P. **Trends Pharmacol. Sci.** 13:369-370, 1992.
- MILANO J., OLIVEIRA S. M., ROSSATO M. F., SAUZEM P. D., MACHADO P., BECK P., ZANATTA N., MARTINS M. A., MELLO C. F., RUBIN M. A., FERREIRA J., BONACORSO H. G. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 58:86-96, 2008.
- MIRALLES, A.; OLMOS, G.; SASTRE, M.; BARTUREN, F.; MARTIN, I.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Discrimination and pharmacologic characterization of I₂-imidazoline sites with [³H]idazoxan and alpha-2 adrenoceptors with [³H]RX821002 (2-methoxy idazoxan) in the human and rat brains. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 264:1187-1197, 1993.
- MIRKHANI, V.; MOGHADAM, M.; TANGESTANINEJAD, S.; KARGAR, H. Rapid and efficient synthesis of 2-imidazolines and bis-imidazolines under ultrasonic irradiation. **Tetrahedron Lett.** 47:2129, 2006.
- MORGAN, N. G.; CHAN, S. L. F.; BROWN, C. A.; TSOLI, E. Characterization of the imidazoline binding site involved in regulation of insulin secretion. **Ann. NY Acad. Sci.** 763:361-373, 1995.
- MORÓN, J. A., PÉREZ, V., PASTÓ, M., LIZCANO, J. M., UNZETA, M. FA-70, a novel selective and irreversible monoamine oxidase-A inhibitors: effect on monoamine metabolism in mouse cerebral cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 292:788-794, 2000.

- NAGATSU, T. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering. **Neurotoxicol.** 25:11-20, 2004.
- NEFF, N. H.; YANG, H. Y. Another look at the monoamine oxidase and the monoamine oxidase inhibitors drugs. **Life Sci.** 14:2061-74, 1974.
- NUTT, D. J., FRENCH, N., HANDLEY, S., HUDSON, A., HUSBANDS, S., JACKSON, H., JORDAN, S., LALIES, M. D., LEWIS, J., MALLARD, N., PRATT, J. Functional studies of specific imidazoline-2 receptor ligands. **Ann. NY Acad. Sci.** 763:125-140, 1995.
- O'CARROLL, A. M.; FOWLER, C. J.; PHILIPS, J. P. TOBIA, I.; TIPTON, K. F. The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. Specificity for the two enzymes forms in seven brain regions. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 322:198-202, 1983.
- OLMOS, G.; GABILOND, A. M.; MIRALLES, A.; ESCRIBÁ, P. V.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Chronic treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline down-regulates non-adrenergic [³H]-idazoxan binding sites in the rat brain. **Brit. J. Pharmacol.** 108:597-603, 1993.
- OLMOS, G., ALEMANY, R.; ESCRIBÁ, P. V.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. The effects of chronic imidazoline drug treatment on glial fibrillary acidic protein concentrations in rat brain. **Brit. J. Pharmacol.** 111:997-1002, 1994.
- OLMOS, G.; ALEMANY, R.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Pharmacological and molecular discrimination of brain I₂-imidazoline receptor subtypes. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 54:709-16. 1996.
- OLMOS, G.; ALEMANY, R.; BORONAT, M. A.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Pharmacologic and molecular discrimination of I₂-imidazoline receptors subtypes. **Ann. NY Acad. Sci.** 881: 144-160, 1999.
- ONDO, W. G. Pooled analysis of two identical phase 3 studies of a novel selegiline preparation as adjuvantive therapy for Parkinson's disease. Paper presented at: the **World Parkinson Congress**: February 2006: Washington, DC.
- OZAITA, A.; OLMOS, G.; BORONAT, A.; LIZCANO, J. M.; UNZETA, M.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. 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. **Brit. J. Pharmacol.** 121:901-912, 1997.
- PATERSON, L. M., TYACKE, R. J., NUTT, D. J., HUDSON, A. L. Relationship

- between imidazoline₂ sites and monoamine oxidase. **Ann. NY Acad. Sci.** 1009:353-356, 2003.
- PATERSON, L. M.; TYACKE, R. J.; ROBINSON, E. S. J.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. In vitro and in vivo effect of BU99006 (5-isothiocyanato-2-benzofuranyl-2-imidazoline) on I₂ binding in relation to MAO: Evidence for two distinct I₂ binding sites. **Neuropharmacol.** 52:395-404, 2007
- PARINI, A.; MOUDANOS, C. G.; PIZZINAT, N.; LANIER, S. M. The elusive family of imidazoline binding sites. **Trends Pharmacol. Sci.** 17:13-16, 1996.
- PONG, S.S.; LEVINE, L. Prostaglandins synthetase systems of rabbit tissues and theirs inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 196: 226-230, 1976.
- POWELL, J. F.; HSU. Y. P.; WEYLER, W.; CHEN, S. A.; SALACH, J.; et al. The primary structure of bovine monoamine oxidase type A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. **J. Biochem.** 259:407-13, 1989.
- 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.; PARINI A.; LANIER S. M. Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase B. **J Biol Chem.** 270:27961-8, 1995.
- RADDATZ, R. & LANIER, S. M. relationship between imidazoline/guanidinium receptive sites and monoamine oxidase A and B. **Neurochem. Int.** 30:109-117, 1997a.
- RADDATZ, R.; PARINI, A.; LANIER, S. M. Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase B. **Mol. Pharmacol.** 52:549-553, 1997b
- RADDATZ, R.; SAVIC, S. L.; BAKTHAVACHALAM, V.; LESNICK, J.; JASPER, J. R.; MEGRATH, C. R.; PARINI, A.; LANIER, S. M. Imidazoline binding domains on monoamine oxidase B and subpopulations of enzyme. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 292:1135-1145, 2000.
- REIS, D. J.; LI, G.; REGUNATHAN, S. Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine-displacing substance and agmatine. **Ann. NY Acad. Sci.** 763:295-313, 1995.

- REGUNATHAN, S.; EVINGER, M. J.; MEELEY, M. P.; REIS, D. J. Effect of clonidine and other imidazole-receptor binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. **Biochem. Pharmacol.** 42:2011-18, 1991.
- REGUNATHAN, S.; FEINSTEIN, D. L.; REIS, D. J. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in rat cerebral cortical astrocytes. **J. Neurosci. Res.** 34:681-88, 1993a.
- REGUNATHAN, S.; MEELEY, M. P.; REIS, D. J. Expression of non-adrenergic imidazoline sites in chromaffin cells and mitochondrial membranes of bovine adrenal medulla. **Biochem. Pharmacol.** 45:1667-75, 1993b.
- REGUNATHAN, S.; NASSIR, Y.; SUNDARAM, K.; VAUGHAN, E. D. Jr.; REIS, D. J.; FELSEN, D. Expression of I₂-imidazoline receptors in rat prostate and regulation by testosterone. **Biochem. Pharmacol.** 51:455-9, 1995.
- REMAURY, A.; ORDENER, C.; SHIH, J.; PARINI, A. Relationship between I₂ imidazoline binding sites and monoamine oxidase B in liver. **Ann. NY Acad. Sci.** 881:32-34, 1999.
- REMAURY, A.; RADDATZ, R.; ORDENER, C.; SAVIC, S. L.; SHIH, J.; CHEN, K.; SEIF, I.; DE MAEYER, E.; LANIER, S. M.; PARINI, A. Analysis of the pharmacological and molecular heterogeneity of I(2)-imidazoline binding proteins using monoamine oxidase-deficient mouse model. **Mol. Pharmacol.** 58:1085-1090, 2000.
- RENOUARD, A., WIDDOWSON, P. S., CORDI, A. [³H]-idazoxan binding to rabbit cerebral cortex recognizes multiple imidazoline (I₂)-type receptors. Pharmacological characterization and relationship to monoamine oxidase. **Brit. J. Pharmacol.** 109:625-631, 1993.
- REYNOLDS, G. P.; RIEDERER, P.; SANDLER, N. R.; JELLINGER, K.; SEEMALI, D. Amphetamine and 2-phenylethylamine in post mortem Parkinson brain after l-deprenyl administration. **J. Neural. Transm.** 43:271-278, 1978.
- REYNOLDS, G. P.; BOULTON, R. M., PEARSON, S. J., HUDSON, A. L., NUTT, D. J. Imidazoline binding sites in Huntington's and Parkinson's disease putamen. **Eur. J. Pharmacol.** 301:R19-R21, 1996.
- RIEDERER, P., DANIELCZYK, W., GRÜNBLANTT, E. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. **Neurotoxicol.** 25:271-277, 2004.

- ROBINSON, D. S. Monoamine oxidase inhibitors: A new generation. **Psychopharmacol. Bull.** 36:124-138, 2002.
- ROBINSON, E. S. J.; ANDERSON, N. J.; CROSBY, J.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. Endogenous β -carbolines as clonidine-displacing substances. **Ann. NY Acad. Sci.** 1009:157-166, 2003.
- ROMMELSPACHER, H. et al. Pharmacological properties of tetrahydronorharmaline (tryptoline). **Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.** 298:83-91, 1977.
- RUGGIERO, D. A., REGUNATHAN, S., WANG, H., MILNER, T. A., REIS, D. J. Immunocytochemical localization of an imidazoline receptors protein in the central nervous system. **Brain Res.** 780:270-293, 1998.
- RUIZ, J., MARTÍN, I., CALLADO, L. F., MEANA, J. J., BARTUREN, F., GARCÍA-SEVILLA, J. A. Non-adrenoceptors [^3H]-idazoxan binding sites (I_2 -imidazoline sites) are increased in postmortem brain from patients with Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 160:109-112, 1993.
- SANT'ANNA, G. DA S., MACHADO, P., SAUZEM, P. D., ROSA, F. A., RUBIN, M. A., FERREIRA, J., BONACORSO, H. G., ZANATTA, N., MARTINS, M. A. P. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** *In Press*, 2008.
- SASTRE, M. & GARCÍA-SEVILLA, J. A. Opposite age-dependent changes of α_{2A} -adrenoceptors and non-adrenoceptors [^3H]-idazoxan binding sites (I_2 -imidazoline sites) in the human brain: strong correlation of I_2 with Mao-B sites. **J. Neurochem.** 61:881-889, 1993.
- SASTRE, M. & GARCÍA-SEVILLA, J. A. Densities of I_2 -imidazoline receptors, α_2 -adrenoceptors and monoamine oxidase B in brains of suicide victims. **Neurochem. Int.** 30:63-72, 1997.
- SAURA, J.; LUKE, J. M., CESURA, A. M., DA PRADA, M., CHEN-PALAY, V., HUBER, G., LOFFTER, J., RICHARDS, J. G. Increased monoamine oxidase B activity in plaque-associated astrocytes of Alzheimer brains revealed by quantitative enzyme radioautography. **Neuroscience** 62:15-30, 1994.
- SAURA, J.; BLEUEL, Z.; ULRICH, J.; MENDELOWITSCH, A.; CHEN, K.; ET AL. Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidase A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization. **Neuroscience** 70:755-74, 1996.

- SAUZEM P. D., MACHADO P., RUBIN M. A., SANT'ANNA G DA S., FABER H. B., DE SOUZA A. H., MELLO C. F., BECK P., BURROW R. A., BONACORSO H. G., ZANATTA N., MARTINS M. A. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. **Eur J Med Chem.** 43:1237-47, 2008
- SEGEL, I. H. Enzyme kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. **Wiley-Interscience**, 1975.
- SELIKOFF, I. J.; ROBITZEK, E. H.; ORNSTEIN, G. G. Toxicity of hydrazine derivatives of isonicotinic acid in the chemotherapy of human tuberculosis. **Quart. Bull. Sea View Hosp.** 13:17-26, 1952.
- SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. Monoamine oxidase: from genes to behavior. **Ann. Rev. Neurosci.** 22:197-217, 1999.
- SIMPSON, L. L. Evidence that deprenyl, a type B monoamine oxidase inhibitor is an indirectly acting sympathomimetic amine. **Biochem. Pharmacol.** 27:1591-1595, 1978.
- SIVASUBRAMANIAM, S. D.; FINCH, C. C.; RODRIGUEZ, M. J.; NAHY, N.; BILLET, E. E. A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B and protein in non-CNS human tissues. **Cell Tissue Res.** 313:291-300, 2003.
- SOTO-OTERO, R., MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E., HERMIDA-AMEIJEIRAS, A., SÁNCHEZ-SELLERO, I., CRUZ-LANDEIRA, A., LAMAS, M.L. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals. Potential implications in relation to oxidative estress. **Life Sci.** 69:879-889, 2001.
- STERLING, J., VEINBERG, A., LERNER, D., GOLDENBERG, W., LEVY, R., YODIM, M. B. H., FINBERG, J. P. M. (R)(+)-N-Propargyl-1-aminoindan (resagiline) and derivatives: highly selective and potent inhibitors of monoamine oxidase B. **B. J. Neural. Transm.** 52: 301-305, 1998.
- STROLIN-BENEDTTI, M.; DOSTERT, P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. **Adv. Drug. Res.** 23:65-125, 1992.
- SON, S., MA, J., KONDOU, Y., YOSHIMURA, M., YAMASHITA, E., TSUKIHARA, T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrate/inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 105:5739-5744, 2007.

- SOUTHAM, R.; PEREIRA, R.; STRATTON, S.; SARGENT, R.; FORD, A. J.; BUTTERFIELD, L. J.; WHEABLE, J. D. BECKETT, S. R. G.; ROE, C.; MARSDEN, C.; HAGAN, R. M. Effect of lamotrigine on the activities of monoamine oxidase A and B in vitro and on monoamine disposition in vivo. **Eur. J. Pharmacol.** 519:237-245, 2005.
- TESSON, F.; PRIP-BUUS, C.; LEMOINE, A.; PEGORIER, J. P.; PARINI, A. Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. **J. Biol. Chem.** 266: 155-60, 1991a.
- TESSON, F. & PARINI, A. Identification of an imidazoline-guanidinium receptive sites in mitochondria from rabbit cerebral cortex. **Eur. J. Pharmacol.** 208:81-83, 1991.
- TESSON, F.; LIMON, I.; PARINI, A. Tissue-specific localization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive sites. **Eur. J. Pharmacol.** 219: 335-38, 1992.
- TESSON, F.; LIMON-BOULEZ, L.; URBAN, P.; PUYPE, M.; VANDERKERCKHOVE, J.; COUPRY, I.; POMPON, D.; PARINI, A. Localization of I₂-imidazoline binding sites on monoamine oxidase. **J. Biol. Chem.** 270:9856-9861,1995.
- TETRUD, J. W.; LANGSTON, J. W. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson´s disease. **Science** 245:519-522, 1989.
- THOMAS, T. Monoamine oxidase-B inhibitor in the treatment of Alzheimer disease. **Neurobiol. Aging** 21: 343-348, 2000.
- TILLER, J. W. Clinical overview on moclobemide. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.** 17:703-712, 1993.
- TIMMERMANS, P. B. M. W., VAN ZWIETEN, P. A. α_2 -adrenoceptors: classification, localization, mechanisms and target for drugs. **J. Med. Chem.** 25:1389-1401, 1982.
- TIPTON, K. F.; O´CARROLL, A. M.; MCCRODDEN, J. M. The catalytic behavior of monoamine oxidase. **J. Neural. Transm.** 23:25-35, 1987.
- YABLONSKY, F.; DAUSSE, J. P. Non-adrenergic binding sites for the “alpha 2-antagonist” [³H]-Idazoxan in the rabbit urethral smooth muscle. Pharmacological and biochemical characterization. **Biochem. Pharmacol.** 41:701-7, 1991.
- YAMADA, M.; YASUHARA, H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. **Neurotoxicol.** 25:215-221, 2004.

- YOUDIM, M. B. H., FINBERG, J. P. M., LEVY, R., STERLING, J., LERNER, D., BERGER-PASKIN, T., YELLIN, H. R-Enantiomers of N-propargyl-amino Indian compounds. Their preparation and pharmaceuticals containing them. **U.S. patent**. 5: 457,133, 1995.
- YOUDIM, M. B. H.; WEINSTOCK, M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. **Neurotoxicol.** 25:243-250, 2004.
- YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTOM, K. E. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Rev. Neurosc.** 7:295-309, 2006a.
- YOUDIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **Brit. J. Pharmacol.** 147:287-296, 2006b.
- WATERS, C. H.; SETHI, K. D.; HAUSER, R. A.; et al. Zydys selegiline reduces off time in Parkinson's Disease patients with motor fluctuations: a 3-month, randomized, placebo-controlled study. **Mov. Disord.** 19:426-432, 2004.
- WECKER, L.; PACHECO, M. A. A neurochemical perspective on monoamine oxidase inhibitors. **Psychiatr. Ann.** 31:354-360, 2001.
- WESTLUND, K. N.; DENNEY, R. M.; KOCHERSPERGER, L.M.; ROSE, R. M.; ABELL, C. M. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. **Science** 250:181-183, 1985.
- WIKBERG, J. E. High affinity binding of idazoxan to a non-catecholaminergic binding site in the central nervous system: description of a putative idazoxan-receptor. **Pharmacol. Toxicol.** 64:152-55, 1989.
- WIKBERG, J. E.; UHLEN, S. Further characterization of the guinea pig cerebral cortex idazoxan receptor: Solubilization, distinction from the imidazole site, and demonstration of cirazoline as an idazoxan receptor-selective drug. **J. Neurochem.** 55:192-203, 1990.
- WOUTERS, J.; OOMS, F.; JAGHAM, S.; KOENIG, J. J.; GEORGE, P.; DURANT, F. Reversible inhibition of type B monoamine oxidase. Theoretical study of model diazo heterocyclic compounds. **Eur. J. Med. Chem.** 32: 721-730, 1997
- ZISOOK, S. E. Clinical overview of monoamine oxidase inhibitors. **Psychosomatics** 26:240-251, 1985.
- ZONNENCHEIN, R.; DIAMANT, S.; ATLAS, D. Imidazoline receptors in rat liver

cells: a novel receptor or a subtype of alpha 2-adrenoceptors. **Eur. J. Pharmacol.** 190:203-15, 1990.

ANEXO 1

Accepted Manuscript

Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors

Gabriela da S. Sant'Anna, Pablo Machado, Patricia D. Sauzem, Fernanda A. Rosa, Maribel A. Rubin, Juliano Ferreira, Helio G. Bonacorso, Nilo Zanatta, Marcos A.P. Martins

PII: S0960-894X(08)00258-8
DOI: [10.1016/j.bmcl.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.001)
Reference: BMCL 12626

To appear in: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*

Received Date: 27 December 2007
Revised Date: 29 February 2008
Accepted Date: 3 March 2008

Please cite this article as: G.d. S. Sant'Anna, P. Machado, P.D. Sauzem, F.A. Rosa, M.A. Rubin, J. Ferreira, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, M.A.P. Martins, Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2008), doi: [10.1016/j.bmcl.2008.03.001](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.001)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors

Gabriela da S. Sant'Anna,^b Pablo Machado,^a Patricia D. Sauzem,^b Fernanda A. Rosa,^a Maribel A. Rubin,^b Juliano Ferreira,^b Helio G. Bonacorso,^a Nilo Zanatta^a and Marcos A.P. Martins^{a,*}

^aNúcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bLaboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Abstract— A series of sixteen 2-substituted-2-imidazolines (where the substituent R = Ph, Me-4-Ph; MeO-4-Ph; (MeO)₂-3,4-Ph; (MeO)₃-3,4,5-Ph; Ph-4-O-C(O)-Ph; Cl-4-Ph; Cl-2-Ph; Cl₂-2,4-Ph; NO₂-4-Ph; NO₂-3-Ph; Naphth-2-yl; Fur-2-yl; Benzofur-2-yl; Pyridin-2-yl; Quinolin-2-yl) has been synthesized from the reaction of the substituted-aldehydes and ethylenediamine by ultrasound irradiation with NBS in an aqueous medium in high yields (80-99%). The 2-imidazoline ability to inhibit the activity of the A and B isoforms of monoamine oxidase (MAO) was investigated and some of them showed potent and selective MAO inhibitory activity especially for the MAO-B isoform and could become promising candidates for future development. ©2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Monoamine Oxidase (MAO), localized in the outer mitochondrial membrane, is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-containing enzyme responsible for the oxidative deamination of amines in the brain and the peripheral tissues, regulating their level.¹ This reaction produces the corresponding aldehyde and free amine, with the generation of hydrogen peroxide.¹ MAO exists in two isoforms, namely, MAO-A and MAO-B, which differ according to their substrate specificity and their selectivity to the inhibitor.² MAO-A preferentially metabolizes serotonin and noradrenaline and is inhibited by low concentrations of clorgyline.³ MAO-B acts preferentially on 2-phenylethylamine and benzylamine and is inhibited by selegiline (*L*-deprenyl).⁴ Dopamine, tyramine, and tryptamine are substrates for both isoforms of MAO.⁴

Due to their role in neurotransmitter metabolism, the regulation of MAO-A and MAO-B activity has been an important target for treating psychiatric and neurodegenerative disorders. Currently, compounds able to inhibit these enzymes have been used in the therapy of Parkinson's and Alzheimer's disease, depression syndrome and panic disorders.⁵ In fact,

Parkinson's and Alzheimer's disease have been associated with oxidative stress and increasing MAO-B activity in the CNS.⁶

Over the last 15 years, since the demonstration that I₂-imidazoline sites are associated with the mitochondrial fraction of membranes,⁷ several studies have provided evidence that these sites represent regions on MAOs.⁸ In fact, I₂-binding sites have been identified on both MAO-A and MAO-B isoforms as regulatory sites able to modulate MAO activity through a not yet fully understood inhibitory mechanism.⁸ Moreover, because of the different tissue sensitivity to amiloride, a guanidine able to discriminate between I_{2A}- and I_{2B}-subtypes, it has been proposed that I_{2A}-sites are located on MAO-A and I_{2B}-sites on MAO-B.⁹ These I₂-binding sites do not appear to be located within the enzyme catalytic site, or the prosthetic group, or the binding domain of classical MAO inhibitors.^{8a-b,10} However, most recent reports have demonstrated that the majority of amino acid residues identified as I₂-sites on MAO-B (149-222) are obtained within the active site or entrance cavity of the enzyme according to crystallographic studies.¹¹ Recently it was also demonstrated that

imidazoline compounds are able to bind to the MAO-A active site.¹²

Therefore, some reports from the literature have demonstrated that imidazoline and guanidinium derivative compounds are able to inhibit MAO activities.^{10a,13} This effect has been attributed to a high affinity I₂ binding site on MAO-B (I_{2B}) and a similar lower affinity site on MAO-A (I_{2A}).¹⁴ In this context, the limited accessibility of the I₂ imidazoline binding domain on MAO-B in various tissues indicates the existence of a distinct subpopulation of the enzyme.¹⁵ Thus, the use of imidazoline derivatives such as MAO inhibitors may allow for the development of new therapeutic agents that target the enzyme in a cell-type selective manner.

We are particularly interested in the therapeutic role of MAO-B inhibitors in Parkinson's and Alzheimer's disease. In this paper, in an attempt to identify novel imidazoline derivatives endowed with MAO inhibitory activity and selectivity we have synthesized a series of 2-imidazolines combining a greener synthetic approach with assessment of their *in vitro* activities.

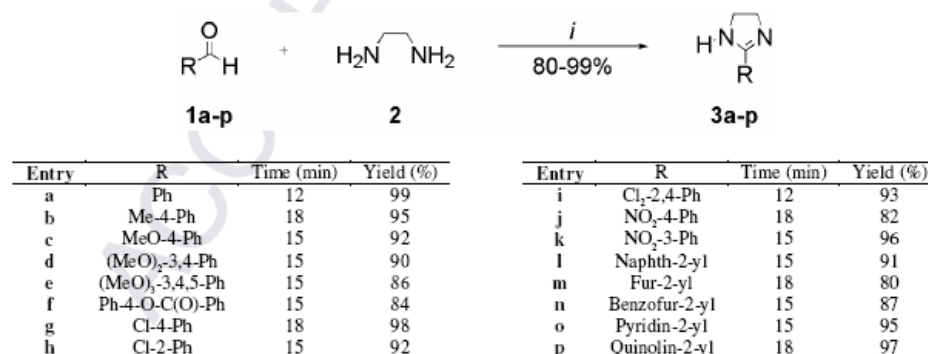
The energy provided by ultrasound has been utilized recently to accelerate a number of synthetically useful reactions.¹⁷ Its effect observed on organic reactions is due to cavitation, a physical process that creates, enlarges, and implodes gaseous and vaporous cavities in an irradiated liquid, thus enhancing the mass transfer.^{17a} Compared with traditional methods, this technique is more appropriate in the consideration of green chemistry concepts. Ultrasound application is considered a processing aid (or auxiliary) in terms of energy conservation and waste minimization.¹⁸ Recently, we have demonstrated the use of this form of energy in heterocyclic preparations providing a remarkable rate of enhancement and a dramatic reduction in reaction time.¹⁹

In recent decades, the use of water as solvent in organic reactions has been reinvestigated.²⁰ Water is a nontoxic solvent and readily available at low cost. It is also nonflammable and environmentally benign, providing opportunities for clean processing and pollution prevention. In addition, because organic reactions often display unique reactivity and selectivity, performing them in an aqueous medium at or slightly above room temperature has become of great interest in order to exploit, for example, their so-called hydrophobic effects.^{20a}

The synthesis of 2-imidazolines (**3a-p**) was carried out by the previously reported method of condensation involving aldehydes (**1a-p**) and ethylenediamine (**2**) in the presence of *N*-bromosuccinimide.¹⁶ The reaction was performed in water as solvent under ultrasonic irradiation furnishing the products (**3a-p**) in high yields and significantly shorter times (Scheme 1).

The method for forming 2-imidazolines under ultrasonic irradiation offers several advantages including faster reaction rates, higher purity, and higher yields. In comparison with conventional methods, the main goal of ultrasound application was the significant decrease of reaction time. While conventional methods require agitation overnight,¹⁶ under ultrasonic irradiation the products were obtained in 12 to 18 minutes.^{21,22} Moreover, this approach does not require the use of any halogenated solvent or an additional method for product purification. In contrast to other methods,²³ the synthesis of 2-imidazolines did not require the use of any catalyst.

All compounds **3** showed physical and spectrometric properties corresponding to the proposed structures and in accordance with the literature.^{16,25}



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) H₂O, NBS,), 65-70°C, 12-18 min

The *in vitro* inhibitory activity of compounds **3a-p** against MAOs was determined as previously described²⁴ and the results are shown in Table 1. The compounds obtained were considered potent when K_i was less than 10 μM and were particularly selective when their selectivity index (K_i MAO-A / K_i MAO-B) was greater than 10. Among the synthesized compounds that inhibited preferentially MAO-A (entries **3c-e**, **3j**) only compound **3d** was found to be selective, presenting a K_i for MAO-A of approximately 73-fold lower than its K_i for MAO-B. The imidazoline **3p** also showed a potent inhibitory effect (K_i 4.86 μM) for this MAO isoform, however, this compound was not selective (0.91).

Table 1. Monoamine oxidase inhibitory activity of 2-imidazolines **3a-p**.

Entry	K_i MAO-A (μM) ^a	K_i MAO-B (μM) ^a	S.I. ^b
3a	28.75 (21.0-39.4)	21.27 (14.7-30.7)	1.35
3b	102.10 (64.4-162)	13.09 (8.1-21.0)	7.79
3c	15.75 (10.2-24.2)	32.67 (20.9-51.1)	0.48
3d	13.57 (9.1-20.2)	~1000	0.013
3e	114.40 (75.0-174.4)	~1000	0.114
3f	12.84 (8.6-19.2)	1.38 (0.97-1.97)	9.27
3g	166.30 (102.3-270.5)	5.35 (3.4-8.3)	31.05
3h	> 1000	24.57 (15.2-39.8)	> 40.70
3i	28.75 (20.9-39.4)	3.98 (2.9-5.3)	10.52
3j	181.40 (115-286.2)	> 1000	0.181
3k	> 1000	19.27 (11.1-33.5)	> 51.89
3l	13.89 (6.02-32.04)	1.49 (0.4-5.1)	9.32
3m	> 1000	> 1000	-
3n (2-BFI)	24.94 (14.3-43.6)	3.63 (0.3-4.0)	6.86
3o	> 1000	25.28 (11.8-54.0)	> 39.55
3p (BU224)	4.86 (3.6-6.6)	5.32 (3.8-7.4)	0.91

^aEach value represents the mean (confidence interval) of three or four independent experiments.

^bIn vitro selectivity index = (K_i MAO-A / K_i MAO-B)

Among the compounds obtained that selectively inhibited MAO-B (entries **3g-i,3k,3o**), only imidazolines **3g** and **3i** were shown to be potent with K_i values of 5.35 μM and 3.98 μM , respectively. One can conclude that the replacement of chlorine at the *ortho* position in the 2-imidazoline **3h** with the *para* position on compound **2g** seemed to decrease selectivity for MAO-B and increase the inhibitory potency against this isoform. The dichloro-substituted compound **3i** lost selectivity with a slightly increasing inhibitory activity against MAO-B. An interesting finding was the inversion of selectivity of 2-imidazoline **3k** from the replacement of an electron withdrawing group (NO_2) at the *meta* position of benzene with an electron donating group (OMe) in compound **3d**. While the imidazoline **3k** was able to selectively inhibit MAO-B, compound **3d** selectively inhibited MAO-A. This suggests that electronic effects can govern the recognition process for 2-imidazolines on both MAOs.

Some of synthesized compounds were shown to exert potent and selective binding at I_2 -sites, such as **3l** (benazoline), **3n** (2-BFI), and **3p** (BU224).²⁵ In fact,

these imidazolines showed good inhibitory activity especially against MAO-B. The 2-BFI and BU224 IC_{50} values reported in literature range from 11 to 16.5 and 4.8 to 10.7 μM for MAO-A and from 23 to 27.9 and 44.8 to 51.4 μM for MAO-B, respectively^{13,29,30}. Our obtained 2-BFI and BU224 IC_{50} values were 65 and 12.7 μM for MAO-A and 9.1 and 13.3 μM , respectively. Thus, in our conditions 2-BFI and BU224 seems to be less potent to inhibit MAO-A and more potent to inhibit MAO-B when compared with literature values. However, when K_i values were compared, the 2-BFI potency on MAO-A obtained in our study (29.94 μM) are similar with the literature data (26 μM).¹² As K_i values are more appropriated for potency comparison among different studies, our results are consistent with literature data. However, none of the compounds endowed with high affinity for the I_2 -site were able to inhibit MAO with significant selectivity. Reports from the literature have affirmed that there are no significant correlations between the potencies of imidazoline derivatives at I_2 -sites and their values for inhibition of MAO-A or MAO-B activities. In general, these compounds show two to three times less activity for MAO inhibition than their reported values of I_2 -site affinity.¹³ Thus, it has been suggested that I_2 -sites are not directly related to the site of action of these drugs against MAO activity.

The nature of the interaction of imidazolines with MAO has been described as either noncompetitive^{8b} and mixed,^{10a} or competitive for MAO-A inhibition and mixed for MAO-B inhibition.¹³ Our preliminary kinetics studies showed that compound **3g**, obtained as a lead-like compound, inhibited MAO-B in a competitive manner. However, additional studies are necessary to clarify this point.

In summary, we have reported the preparation of 2-imidazolines using a highly efficient and environmentally benign synthetic protocol to obtain novel compounds endowed with MAO inhibitory activity. The simplicity, the use of water instead of organic solvents as reaction medium, the high yields (80-99%), and the short reaction times (12-18 min) make this reaction highly attractive. In addition, the existence of a distinct subpopulation of MAO-B with different accessibility to the I_2 -site may allow access to inhibitors of this isoform in a tissue-specific manner, avoiding numerous side effects attributed to these classes of compounds. Our contribution toward this understanding was to obtain novel 2-imidazoline derivatives as active MAO inhibitors in the μM range with good selectivity. Studies on the use of 2-imidazoline compounds in models of Parkinson's and Alzheimer's disease are in progress and these data will be communicated hereafter.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PRONEX) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support. The fellowships from CNPq, CAPES and FAPERGS are also acknowledged.

References and notes

1. Youdim, B. H.; Bakhle, Y. S. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 287.
2. Shih, J. C.; Chen, K.; Ridd, M. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 197.
3. Weyler, W.; Hsu, Y. P.; Breakefield, X. O. *Pharmacol. Ther.* **1990**, *47*, 391.
4. Kalgutkar, A. S.; Dalvie, D. K.; Castagnoli, N., Jr.; Taylor, T. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1139.
5. Youdim, B.H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295.
6. (a) Volz, H. P.; Gleiter, C. H. *Drugs Aging* **1998**, *13*, 341. (b) Good, P. F.; Werner, P.; Hsu, A.; Olanow, C. W.; Perl, D. P. *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 21. (c) Drukarch, B.; Muiswinkel, F. L. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1023.
7. Tesson, F.; Parini, A. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *208*, 81.
8. (a) Raddatz, R.; Parini, A.; Lanier, S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27961. (b) Tesson, F.; Limon-Boulez, I.; Urban, P.; Puype, M.; Vardekerckhove, J.; Couprie, I.; Pompon, D.; Parini, A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9856. (c) Raddatz, R.; Parini, A.; Lanier, S. M. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 549. (d) Raddatz, R.; Savic, S. L.; Bakthavachalam, V.; Lesnick, J.; Jasper, J. R.; Mcgrath, C. R.; Parini, A.; Lanier, S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 1135.
9. Parini, A.; Moudanos, C. G.; Pizzinat, N.; Lanier, S. *M. Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 13.
10. (a) Carpéné, C.; Collon, P.; Remaury, A. Cordi, A.; Hudson, A.; Nutt, D.; Lafontan, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *272*, 681. (b) Limon-Boulez, I.; Tesson, F.; Gargalidis-Moudanos, C.; Parini, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *276*, 359.
11. (a) Binda, C.; Newton-Vinson, P.; Hubalek, F.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 22. (b) Ma, J.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Nakagawa, A.; Ito, A.; Tsukihara, T. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 103.
12. Jones, T. Z. E.; Giurato, L.; Guccione, S.; Ramsay, R. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1567.
13. Ozaita, A.; Olmos, G.; Boronat, M. A.; Lizcano, J. M.; Unzeta, M.; García-Sevilla, J. A. *Brit. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 901.
14. Paterson, L. M.; Tyacke, R. J.; Robinson, E. S.J.; Nutt, D. J.; Hudson, A. L. *Neuropharmacol.* **2007**, *52*, 395; and references therein
15. Raddatz, R.; Parini, A.; Lanier, S.M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27961.
16. (a) Fujioka, H.; Murai, K.; Ohba, Y.; Hiramatsu, A.; Kita, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2197. (b) Fujioka, H.; Murai, K.; Kubo, O.; Ohba, Y.; Kita, Y. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 638.
17. (a) Manson, T. J. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 443. (b) Cella, R.; Stefani, H. A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5656. (c) Guzen, K. P.; Guarezemini, A. S.; Órfão, A. T. G.; Cella, R.; Pereira, C. M. P.; Stefani, H. A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1845.
18. Cintas, P.; Luche, J.-L. *Green Chem.* **1999**, *1*, 115.
19. Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Cunico, W.; Moura, S.; Rosa, F. A.; Peres, R. L.; Machado, P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G. *Ultrason. Sonochem.* **2006**, *13*, 364.
20. (a) Dallinger, D.; Kappe, C. O. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2563. (b) Lindström, U. M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2751.
21. Synthesis of 2-imidazolines **3a-p** (*General Procedure*): A mixture of aldehyde **1** (1 mmol) and ethylenediamine **2** (0.072g, 1.2 mmol) in water (12 mL) was added to a glass tube of 15 mL. With aid of adapter, a titanium microtip (Ø 6 mm) was attached to the reaction glass container and the mixture was sonicated by 2 min (Vibra Cell VC50, *Sonics & Material Inc*). After this time, NBS (0.213g, 1.2 mmol) was added to the mixture and the resulting solution was sonicated for the appropriate time (Scheme 1). The reaction temperature was raised to 65–70°C after sonication for 8–10 min. After cooling to room temperature NaOH (20%) aq was added to the reaction mixture. Finally, the solution was extracted with ethyl acetate (3 × 15 mL); after combined, the organics layers were washed with water (2 × 10 mL) and dried with Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford the 2-imidazolines **3** with excellent purity.
22. ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired on a Bruker DPX 200 or Bruker DPX 400 spectrometer (¹H at 200.13 MHz or 400.13 MHz and ¹³C at 50.32 MHz or 100.63 MHz, respectively) at 300 K, in 5 mm sample tubes, and with a digital resolution of ±0.01 ppm. CDCl₃ was used as solvents containing TMS as internal standard. Mass spectra were registered in a HP 5973 MSD connected to a HP 6890 GC and interfaced by a Pentium PC. The GC was equipped with a split-splitless injector, autosampler cross-linked HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm of internal diameter), and helium was used as the carrier gas. Select data for compound **3f**: mp 116–118°C; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.80 (s, 4H, 2CH₂), 3.98 (br, 1H, NH), 7.25–7.69 (m, 5H, Ph), 7.84–8.22 (m, 4H, Ph); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 49.8 (2CH₂), 121.7, 127.5, 128.5, 128.6, 129.0, 130.0, 133.7, 152.8 (Ph), 164.1 (C2), 164.7 (C=O); MS EI (70 ev) *m/z*(%): 266.1 (M⁺, 48), 237.1 (4), 132.1 (4), 105.1 (100), 77.1 (62), 51.0 (11); anal. calcd. for C₁₆H₁₄N₂O₂: C 72.16%, H 5.30%, N 10.52%; found: C 72.03%, H 5.17%, N 10.47%.
23. Mirkhani, V.; Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.;

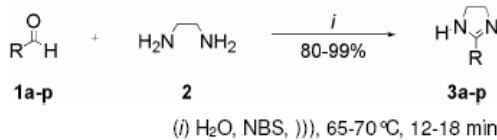
- Kargar, H. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2129.
24. MAO inhibitions assay: The synthesized compounds were tested for their inhibitory activity on MAO-A and B in rat brain mitochondrial homogenates.²⁶ The protein concentration was determined according to Bradford.²⁷ The mitochondrial fractions were preincubated at 37°C for 5 min with the irreversible and selective inhibitor selegiline (250 nM) or clorgyline (250 nM) to assay MAO-A or MAO-B activity, respectively. The imidazoline compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the reaction mixture from 0 to 10³ μM. After 5 min, kynuramine was added as a non selective substrate at concentrations equal to the corresponding K_M value (90 μM for MAO-A and 60 μM for MAO-B). The solutions were incubated at 37°C for 30 min. Addition of three chloroacetic acid ended the reaction and the samples were centrifuged at 16 000 g×for 5 min. The supernatant fractions were removed and the concentrations of the MAO generated product, 4-hydroxyquinoline (4-OHQ), was measured spectrophotometrically at 314 nm. When there was interference of the compounds tested on the spectrophotometric methods, the fluorescent product of the reaction was measured by fluorimetric method, using 315 nm (excitation) and 380nm (emission). Apparent K_i values were calculated using the equation for competitive inhibitors.²⁸
25. Anastassiadou, M.; Danoun, S.; Crane, L.; Baziard-Mouysset, G.; Payard, M.; Caignard, D.-H.; Rettori, M.-C.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 585.
26. Soto-Otero, R.; Méndez-Alvarez, E.; Hermida-Ameijeiras, A.; Sánchez-Sellero, I.; Cruz-Landeira, A.; Lamas, M L. *Life Sci.* **2001**, *69*, 879.
27. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
28. Cheng, W. C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
29. Tesson, F., Prippbus, C., Lemoine, A., Pegorier, J. P., Parini, A. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 155.
30. Lales, M. D., Hibell, A., Hudson, A. L., Nutt, D. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 114.

Graphical Abstract

Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors

Gabriela da S. Sant'Anna, Pablo Machado, Patricia D. Sauzem, Fernanda A. Rosa, Maribel A. Rubin, Juliano Ferreira, Helio G. Bonacorso, Nilo Zanatta, and Marcos A. P. Martins*

A series of sixteen 2-imidazolines (**3**) has been synthesized from the reaction of **1** and **2** by ultrasound irradiation with NBS in an aqueous medium in high yields (80-99%). The compound **3** ability to inhibit the activity of the A and B isoforms of monoamine oxidase (MAO) was investigated.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)