

UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(FARMACOLOGIA)

CARLOS ALBERTO DA SILVA RIBEIRO

**Investigação do envolvimento de subtipos de adrenocetores α_1 no efeito
anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda**

Botucatu, SP

2015

UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CARLOS ALBERTO DA SILVA RIBEIRO

Investigação do envolvimento de subtipos de adrenocetores α_1 no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Farmacologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Botucatu, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

da Silva Ribeiro, Carlos Alberto. Investigação
do envolvimento de subtipos de adrenocetores
α1 no efeito anti-imobilidade da imipramina no
teste de suspensão pela cauda / Carlos Alberto da
Silva Ribeiro. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo

Capes: 21001006

1. Receptores adrenérgicos. 2. Antidepressivos. 3.
Imipramina. 4. Testes.

Palavras-chave: Adrenocetores alfa-1; Antidepressivos
tricíclicos; Imipramina; Teste da suspensão pela cauda.

AGRADECIMENTOS

Obviamente, que não se faz nada sozinho... Quem o faz, perde a oportunidade de crescer, o processo de aprendizagem é mais lento etc. Muita gente, de alguma maneira, contribuiu para que esta tese pudesse ser concluída, entretanto vou destacar algumas:

Meus pais, por sempre me apoiarem e confiarem em mim.

Meu orientador André S. Pupo, pela oportunidade de me “abrigar” em seu laboratório, mesmo sabendo que provavelmente meu doutorado seguiria um tema um pouco diferente do qual o laboratório costuma trabalhar. Me identifico muito com o professor em relação ao tipo de aula, entusiasmo e dedicação com o ensino. Pela paciência e disponibilidade de orientação sempre pertinente.

A minha noiva/esposa/namorada Raquel, pela paciência enorme que deve ter, apesar de não parecer, pois aguentar minhas “paranoias” todos os dias não deve ser uma tarefa fácil; pelo cuidado com o qual sempre posso contar.

A ex-orientadora Márcia Gallacci, pelos vários “puxões de orelha”. A quem também me identifico muito por ser perfeccionista, detalhista. Sempre motivando a não me conformar com o médio. Pelo comprometimento com o que é certo, com o que é ético.

Meu amigo e colega de laboratório Luiz Ricardo Kiguti pelas conversas intelectualmente enriquecedoras... E não enriquecedoras também. Por ser sempre solícito em todos os aspectos.

A Larissa Périco e a Katiússia Pinho Alves da Silva pela disponibilidade e amizade que sempre posso contar.

RESUMO

A imipramina é antidepressivo tricíclico cujo principal mecanismo é a inibição da captura neuronal de noradrenalina e/ou serotonina, aumentando os níveis sinápticos dessas monoaminas. Além disso, a imipramina, bem como outros antidepressivos tricíclicos, antagonizam os adrenocetores α_1 na mesma faixa de concentração em que inibem o transportador de noradrenalina. Por outro lado, estudos recentes mostraram que a imipramina tem afinidades distintas para os três subtipos de adrenocetores α_1 , (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}), ou seja, aproximadamente 25 vezes mais seletiva para α_{1A} em relação aos adrenocetores α_{1B} e 10 vezes para adrenocetores α_{1D} em relação aos adrenocetores α_{1B} . Isso sugere que seu mecanismo de ação possa estar relacionado com essa característica, uma vez que, ao aumentar os níveis sinápticos de noradrenalina, antagoniza α_{1A} e α_{1D} , mas deixa relativamente livre α_{1B} . Então, o objetivo desta tese foi investigar a participação dos adrenocetores α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda em camundongos. Para isso, camundongos foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda, com a administração de diversos antagonistas seletivos e não-seletivos para subtipos α_1 . Os testes foram realizados utilizando a imipramina associada ao prazosin, antagonista não-seletivo para adrenocetores α_1 , RS-100329, antagonista seletivo para α_{1A} , L-765314, seletivo para α_{1B} e BMY-7378, seletivo para α_{1D} . Os animais também foram avaliados com administrações únicas dos antagonistas. Esta tese mostrou que a administração concomitante de prazosin ou o L-765314 reverteram o efeito anti-imobilidade da imipramina. Por outro lado, nem o RS-100329 ou BMY-7378 modificaram o efeito anti-imobilidade da imipramina. Além disso, a administração de apenas o RS-100329 ou BMY-7378 apresentou efeito anti-imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Isso indica que o efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda depende da ativação de adrenocetores α_{1B} , uma vez que o antagonismo de α_{1B} reverteu seu efeito anti-imobilidade. Além disso, parte do mecanismo de ação da imipramina pode ser devido a seu antagonismo de α_{1A} e de α_{1D} .

Palavras-chave: adrenocetores α_1 , adrenocetores α_{1B} , antidepressivos tricíclicos, imipramina, teste de suspensão pela cauda.

ABSTRACT

Imipramine is a tricyclic antidepressant inhibitor of norepinephrine and serotonin neuronal reuptake. In addition, the imipramine antagonizes α_1 -adrenoceptors in the same concentration range that inhibited norepinephrine transporter. However, the imipramine has different affinity to α_1 -adrenoceptor subtypes presenting higher affinity (10-25-fold) towards α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors compared to α_{1B} -adrenoceptors. This study investigates the α_1 -adrenoceptor subtypes involved in the anti-immobility effect of imipramine in the tail suspension test in mice. The anti-immobility effect of imipramine was significantly antagonized by the non-subtype-selective α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin. Neither the selective α_{1A} adrenoceptor antagonist RS-100329 nor the selective α_{1D} -adrenoceptor antagonist BMY-7378 changed the anti-immobility effect of imipramine. However, the selective α_{1B} -adrenoceptor antagonist L-765314 antagonized the anti-immobility effect of imipramine. In addition, mice treated only with RS-100329 or BMY-7378 showed reduced immobility time in comparison to mice treated with vehicle, whereas L-765314 increased the immobility time. These results suggest that the α_{1B} -subtype is the main target for the increased levels of norepinephrine caused by imipramine, and that the selective antagonism of α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors results in anti-immobility effects.

Keywords: α_1 -adrenoceptors, α_{1B} -adrenoceptor, tricyclic antidepressants, imipramine, tail suspension test.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	8
1.1. ADRENOCEPTORES α_1	8
1.2. ADRENOCEPTORES α_1 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	10
1.3. ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS E ADRENOCEPTORES α_1	16
1.4. JUSTIFICATIVA	21
2. OBJETIVO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. ANIMAIS.....	23
3.2. DROGAS E TRATAMENTOS	24
3.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	25
3.3.1. Teste da suspensão pela cauda	26
3.3.2. Teste da barra giratória	27
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. ADRENOCEPTORES α_1

Os adrenoceptores, ou receptores adrenérgicos, são receptores para o neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico (simpático), noradrenalina, e o hormônio da medula da glândula adrenal, adrenalina. Os adrenoceptores pertencem à superfamília de receptores de membrana com 7 domínios transmembranares e são acoplados às proteínas G. Os adrenoceptores são divididos em três subfamílias (α_1 , α_2 e β , figura 1), cada uma delas contendo três subtipos, denominados α_{1A} , α_{1B} , e α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} , e α_{2C} ; β_1 , β_2 e β_3 . Os nove

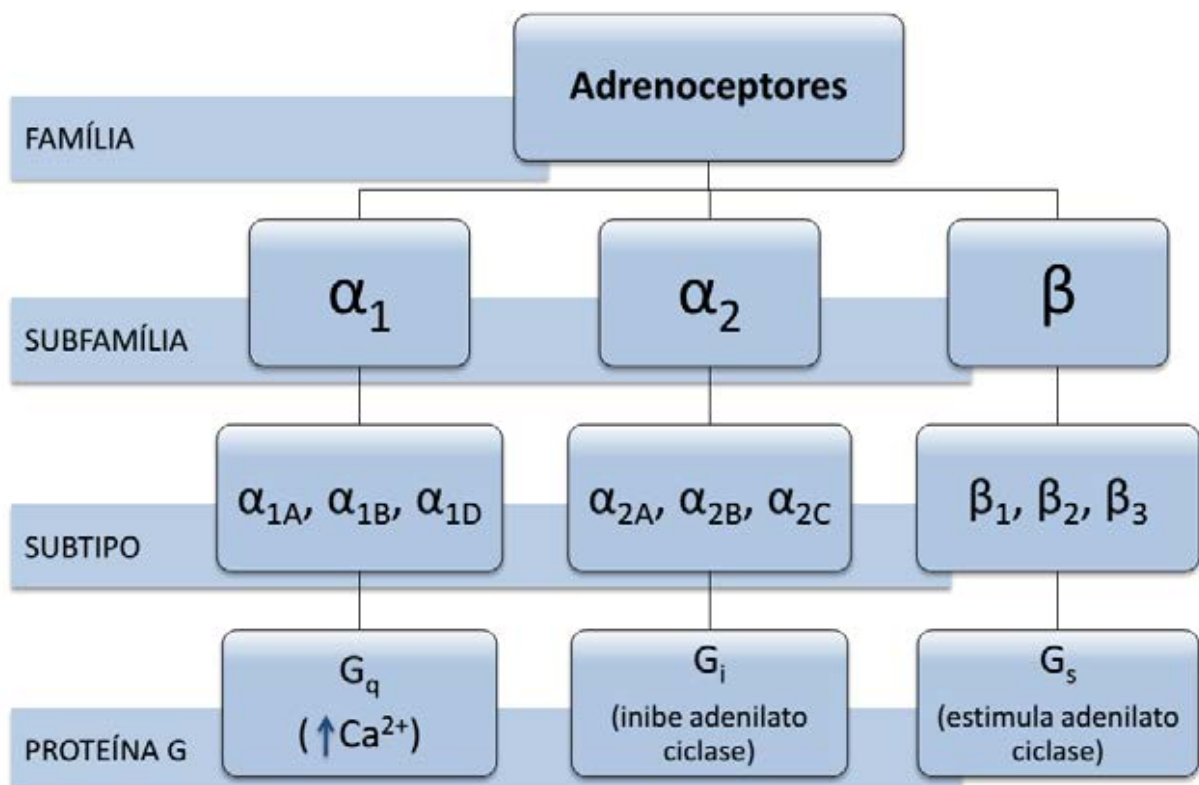


Figura 1. Família de adrenoceptores e a proteína G. com a qual cada subtipo é preferencialmente acoplado.

subtipos de adrenoreceptores são codificados por genes diferentes e apresentam características farmacológicas distintas (Zhong e Minneman, 1999).

Os adrenoreceptores α_1 , objetos de estudo desta tese, acoplam-se preferencialmente à proteína $G_{q/11}$, cuja sinalização intracelular resulta na ativação da fosfolipase C, aumento de trifosfato de inositol, diacilglicerol e dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (figura 2). Além da interação clássica com a proteína $G_{q/11}$, tem sido relatado que os adrenoreceptores α_1 também interagem com várias outras proteínas como a sintase neuronal de óxido nítrico (Pupo e Minneman, 2002), o receptor para a porção globular do fator de complemento C1q (Pupo e Minneman, 2003), as serinas/treoninas cinases de receptores acoplados à proteína G e β -arrestinas (Akinaga *et al.*, 2013), sintrofinas, a qual está relacionada à

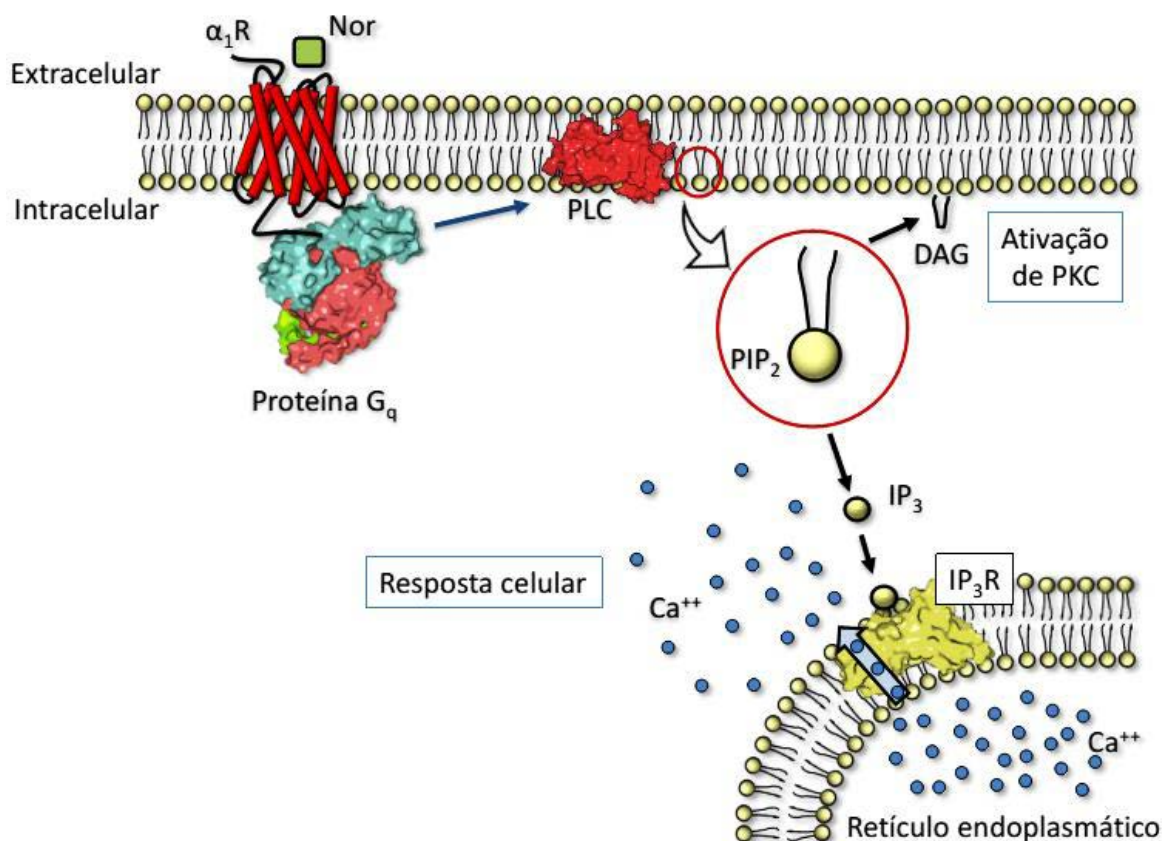


Figura 2. Principal via de sinalização intracelular ativada por adrenoreceptores α_1 (α_1R).

estabilização do receptor na membrana (Chen *et al.*, 2006), AP50, ao aumento da endocitose do receptor (Diviani *et al.*, 2003), ezrina, ao aumento da reciclagem do receptor (Stanasila *et al.*, 2006), o que pode ampliar o repertório de vias de sinalização intracelular disparadas pela ativação desses receptores (para revisão, ver (Cotecchia, 2010)).

Os três subtipos de adrenoceptores α_1 estão distribuídos de forma heterogênea nos diversos tecidos periféricos e têm importante papel na regulação da contratilidade da musculatura lisa vascular e não vascular e no controle da secreção de glândulas endócrinas e exócrinas (Docherty, 2010). Tal distribuição heterogênea fundamenta a conveniência terapêutica de alguns antagonistas seletivos de subtipos de adrenoceptores α_1 , especialmente aqueles úteis no tratamento da hiperplasia prostática, os quais apresentam menos efeitos cardiovasculares (Chapple, 1996; Lepor, Kazzazi e Djavan, 2012). Apesar da importância fisiológica e farmacológica dos subtipos de adrenoceptores α_1 , assim como sua localização e distribuição em tecidos periféricos serem relativamente bem definidas, muito menos é sabido sobre o papel e a distribuição de cada um desses subtipos de receptores no sistema nervoso central.

1.2. ADRENOCEPTORES α_1 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Ainda que se saiba que os adrenoceptores α_1 estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, o estudo sobre a localização de cada um dos subtipos

desses receptores é difícil em razão das limitadas ferramentas experimentais (drogas e anticorpos) disponíveis. Técnicas imunohistoquímicas poderiam ser utilizadas para a localização desses subtipos; entretanto, trabalhos recentes revelaram que os anticorpos comercialmente disponíveis para essa finalidade não apresentam a especificidade desejada, sendo incapazes de distinguir os três subtipos de adrenoceptores α_1 (Jensen, Swigart e Simpson, 2009; Bohmer, Pfeiffer e Gericke, 2014). Alternativamente, o estudo da expressão de transcritos de mRNA codificando cada um dos subtipos de adrenoceptores α_1 tem sido utilizado para a localização desses receptores no sistema nervoso central (Day *et al.*, 1997; Sands e Morilak, 1999; Szot *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2010); no entanto, além de permitirem apenas a comparação semi-quantitativa da expressão dos transcritos, a frequente falta de relação direta entre as quantidades de transcritos e de proteínas produzidas limita as conclusões sobre a localização e distribuição desses receptores no sistema nervoso central.

Recentemente, alguns trabalhos utilizaram camundongos transgênicos que expressam adrenoceptores α_{1A} (Papay *et al.*, 2006) ou α_{1B} (Papay *et al.* (2004) fundidos à proteína verde fluorescente melhorada (*enhanced fluorescent green protein*) na sua porção carboxi-terminal. Esses estudos revelaram que os adrenoceptores α_{1A} estão presentes em alta densidade e ampla distribuição no sistema nervoso central, sendo predominantes em algumas estruturas como a amígdala, células de Purkinje, córtex e núcleos da rafe (Papay *et al.*, 2006). Já os adrenoceptores α_{1B} apresentam distribuição e localização semelhantes, sendo

particularmente mais abundantes no córtex, amígdala e ponte (Papay *et al.*, 2004). Além disso, foi observado que interneurônios GABAérgicos expressam esses dois subtipos de adrenocetores (Papay *et al.*, 2006), sugerindo uma importante função na regulação inibitória de outros neurônios, uma vez que o ácido γ -aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor que ao ativar seu receptor ionotrópico GABA_A, leva à hiperpolarização da membrana plasmática e consequente diminuição da excitabilidade neuronal (Mody *et al.*, 1994; Farrant e Nusser, 2005).

Camundongos transgênicos desprovidos (*knockout*) de adrenocetores α_{1D} têm sido úteis na identificação da presença desse subtipo de receptor no sistema nervoso central. Foi observado que a capacidade máxima de ligação específica (B_{max}) do radioligante [¹²⁵I]-HEAT à preparações de membranas do encéfalo de camundongos *knockout* para o adrenocetor α_{1D} é cerca de 10% menor que aquela encontrada no encéfalo de camundongos não-transgênicos (Tanoue *et al.*, 2002). Já em preparações de membrana do córtex cerebral de camundongos *knockout* para o adrenocetor α_{1D} , o B_{max} do [¹²⁵I]-HEAT foi cerca de 40% menor que aquele encontrado em preparações de membrana do córtex de camundongos não-transgênicos. Além disso, estudos mostram redução de 15 % do B_{max} do [³H]-prazosin no hipocampo e 25 % no córtex cerebral de camundongos *knockout* para adrenocetores α_{1D} (Sadatge *et al.*, 2003).

Estudos de hibridização *in situ* mostram que o mRNA codificando o adrenocetor α_{1D} pode ser encontrado em núcleos paraventriculares hipotalâmicos (Sands e Morilak, 1999), estruturas envolvidas na resposta ao estresse na

depressão (Bao, Meynen e Swaab, 2008) e em outras áreas importantes do sistema nervoso central, como o bulbo olfatório, tálamo, hipocampo, córtex e amígdala (Day *et al.*, 1997).

Assim, evidências farmacológicas, histoquímicas e de expressão de mRNAs indicam que os três subtipos de adrenoreceptores α_1 estão presentes no sistema nervoso central. Apesar de ser classicamente conhecido que os adrenoreceptores α_1 têm localização predominantemente pós-sináptica no sistema nervoso autônomo simpático (Arbilla e Langer, 1978), muito pouco é sabido sobre a localização sináptica desses receptores no sistema nervoso central. Não obstante, a ausência de co-localização entre adrenoreceptores α_{1A} e α -sinucleína, uma proteína abundante em vesículas sinápticas de terminações nervosas (Clayton e George, 1998; Burgoyne e Morgan, 2011), sugere que esse subtipo de receptor tenha localização predominantemente pós-sináptica também no sistema nervoso central (Papay *et al.* (2006).

A neurotransmissão noradrenérgica no sistema nervoso central parece regular diversas funções através da ativação de adrenoreceptores α_1 , incluindo sono, aprendizado, comportamento sexual, apetite, controle central da pressão arterial, entre outros. Foi proposto que adrenoreceptores α_1 regulam o sono em humanos, uma vez que o antagonismo farmacológico desses receptores aumenta a duração da fase REM (*rapid eye movement*) (Oswald *et al.*, 1975) e alterações nos níveis de mRNA de adrenoreceptores α_1 no prosencéfalo basal de camundongos afetam a manutenção do sono (Kim *et al.*, 2013). A ativação de adrenoreceptores α_1 no córtex

pré-frontal prejudica a função cognitiva em ratos (Arnsten *et al.*, 1999), enquanto que na amígdala facilita o aprendizado (Ferry, Roozendaal e McGaugh, 1999). Já o comportamento sexual de lordose em ratas é dependente da ativação de adrenoceptores α_1 (Chu e Etgen, 1999). O tratamento com WB-4101, um antagonista de adrenoceptores α_{1A} e α_{1D} , reduz a ingestão de comida em ratos (Scopinho, Resstel e Correa, 2008). Adrenoceptores α_1 também estão envolvidos na resposta cardiovascular ao estresse (Alves *et al.*, 2014).

Além das funções mencionadas acima, tem sido proposto que adrenoceptores α_1 participam da regulação de dois tipos de comportamentos relacionados à depressão e ao estresse: os comportamentos motivados por estímulos positivos e os comportamentos inibidos por estresse (estímulos negativos) (Stone *et al.*, 2007). Nesse contexto, a administração do antagonista não-seletivo de adrenoceptores α_1 , prazosin, aumenta o comportamento de imobilidade de camundongos no teste de suspensão pela cauda (Stone e Quartermain, 1999; Stone *et al.*, 1999), um modelo animal preditivo de efeitos antidepressivos de drogas em humanos, enquanto que a administração de terazosin, outro antagonista de adrenoceptores α_1 , diminui os movimentos exploratórios de camundongos expostos à um novo ambiente sem prejudicar a coordenação motora (Stone *et al.*, 1999). Além disso, o tempo de interação social de ratos submetidos ao estresse por imobilização é aumentado em animais que receberam o antagonista de adrenoceptores α_1 , benoxatian, nos núcleos centrais da amígdala (Cecchi, Khoshbouei e Morilak, 2002). Estudos empregando o teste

do labirinto em cruz elevado, no qual o animal tende a permanecer nos braços fechados devido ao medo da exposição ao ambiente dos braços abertos, os animais que receberam doses baixas de prazosin permaneceram por mais tempo nos braços abertos, enquanto aqueles tratados com as doses mais elevadas diminuíram essa permanência (Handley e Mithani, 1984).

Além disso, tem sido mostrado que o efeito de diferentes tipos de drogas em modelos animais que avaliam atividade antidepressiva de fármacos é antagonizado pelo prazosin. Por exemplo, o prazosin reverteu o efeito anti-imobilidade da desipramina, um antidepressivo tricíclico, e da reboxetina, inibidor seletivo da recaptura de noradrenalina, no teste do nado forçado de Porsolt, (Rogoz, 2009); o prazosin também reverteu o efeito anti-imobilidade de extratos plantas (ou seus compostos isolados) no teste de suspensão pela cauda (Rodrigues *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2009; Capra *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2010); bem como vitaminas com atividade anti-imobilidade também tiveram seus efeitos diminuídos com o pré-tratamento dos animais com prazosin (Brocardo *et al.*, 2008; Binfare *et al.*, 2009).

Apesar de ser sabido que a neurotransmissão noradrenérgica envolvendo adrenoceptores α_1 tem papel importante na regulação do comportamento animal, há poucos estudos mostrando o papel de cada subtipo desses receptores. Um desses estudos mostra uma forte correlação entre a potência de antagonistas de adrenoceptores α_1 em inibir a atividade comportamental geral e suas afinidades por adrenoceptores α_{1B} , mas não por adrenoceptores α_{1A} ou adrenoceptores α_{1D}

(Stone *et al.*, 2001). Tais estudos sugerem que adrenoceptores α_{1B} , mas não adrenoceptores α_{1A} ou α_{1D} , estão envolvidos no controle de comportamentos motivados. Por outro lado, camundongos *knockout* para adrenoceptores α_{1B} têm a atividade exploratória e a motilidade aumentadas no teste do campo aberto quando comparados aos seus controles não-transgênicos (Spreng, Cotecchia e Schenk, 2001). Contudo, inferências sobre resultados de experimentos com animais *knockout* devem ser realizadas de maneira cuidadosa, pois pode ocorrer regulação compensatória de outros receptores e processos envolvidos (Groenink *et al.*, 2003). Em conjunto, esses dados indicam que a ativação de adrenoceptores α_{1B} parece ter um papel importante na indução da atividade comportamental.

1.3. ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS E ADRENOCEPTORES α_1

A pesquisa sobre as bases neuroquímicas da depressão foi, durante muito tempo, direcionada à investigação da neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica no sistema nervoso central, numa abordagem que passou a ser comumente conhecida como “teoria monoaminérgica da depressão” (Schildkraut, 1965; Coppen, 1967; Schildkraut, 1974; Krishnan e Nestler, 2008). Tal teoria foi fundamentada em parte na observação de que diversas drogas que aumentam os níveis sinápticos de noradrenalina e/ou serotonina aliviam muitos dos sintomas da depressão, indicando que a neurotransmissão envolvendo uma ou ambas dessas monoaminas é reduzida na vigência dessa doença. De fato, o tratamento

farmacológico da depressão utiliza drogas de diversas classes, dentre as quais se destacam os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptura de serotonina ou noradrenalina, inibidores da monoaminoxidase e antidepressivos atípicos (Haenisch e Bonisch, 2011). Em última instância, por mecanismos variados, todas essas drogas aumentam os níveis sinápticos das duas monoaminas, noradrenalina e serotonina. Embora os inibidores seletivos da recaptura de serotonina sejam os fármacos antidepressivos mais prescritos em razão de apresentarem menor incidência de efeitos cardiovasculares e sedativos (para revisão ver (Vaswani, Linda e Ramesh, 2003)), os antidepressivos tricíclicos ainda são muito utilizados no tratamento ou alívio dos sintomas da depressão. Um estudo no qual foram analisadas 358 publicações comparando a eficácia antidepressiva de inibidores seletivos da recaptura de serotonina e antidepressivos tricíclicos concluiu que as eficácias de ambos em reduzir os sintomas da depressão crônica foram semelhantes (Von Wolff *et al.*, 2013).

A imipramina (figura 3) é o protótipo dos antidepressivos tricíclicos, descoberta por serendipidade em 1957 por Roland Kuhn enquanto buscava fármacos com atividade anti-psicótica (Ban, 2001). Essa classe de fármacos ganha esse nome devido à sua estrutura química dibenzazepínica (figura 3), e é quimicamente semelhante à algumas drogas que possuem efeitos anti-psicóticos em humanos, as fenotiazinas. Os antidepressivos tricíclicos ligam-se com alta afinidade ao transportador neuronal de noradrenalina e/ou serotonina impedindo a captura desses neurotransmissores para dentro da terminação nervosa levando

ao aumento de suas disponibilidades sinápticas (Nelson, 1999). Consequentemente, esses níveis elevados de neurotransmissores aumentam a sinalização resultante da ativação de seus receptores alvos, dentre eles os adrenoceptores α_1 .

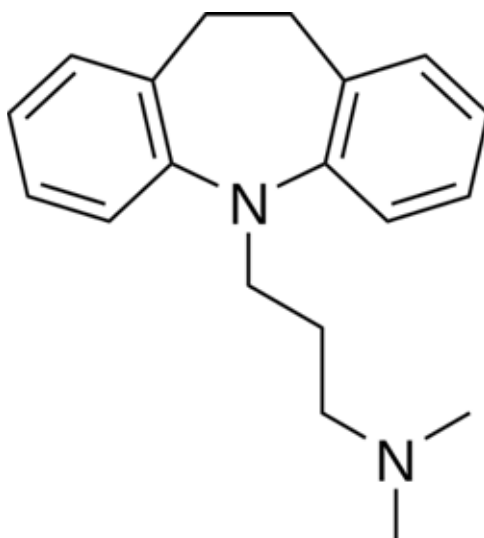


Figura 3. Figura representativa da estrutura química da imipramina mostrando seu dois anéis de benzeno fundidos a um grupo azepina. Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b7/Imipramine.svg/640px-Imipramine.svg.png>, acessado em 11/01/2015

No entanto, a imipramina e vários outros antidepressivos tricíclicos também interagem com adrenoceptores α_1 , colinoceptores muscarínicos e receptores histaminérgicos com afinidades semelhantes àsquelas com as quais essas drogas interagem com os transportadores neuronais de noradrenalina e/ou serotonina (Richelson e Nelson, 1984). De fato, a imipramina e outros antidepressivos tricíclicos se comportam como antagonistas competitivos desses receptores, e isso explica muitos de seus efeitos adversos como a hipotensão postural, devido à sua interação com adrenoceptores α_1 (U'prichard *et al.*, 1978; Schoenberger, 1991) a

sedação, via receptores histaminérgicos-1 (Richelson, 1979; Coupet e Szuch-Myers, 1981; Nicholson, Pascoe e Turner, 1989), boca seca, retenção urinária, visão turva e constipação, devido à interação com colinoceptores muscarínicos (El-Fakahany e Richelson, 1983; Remick, 1988).

A alta afinidade da imipramina e de outros antidepressivos tricíclicos pelos adrenoceptores α_1 e transportadores de monoaminas resulta em um mecanismo de ação auto-cancelante (figura 4) semelhante àquele descrito para drogas que simultaneamente antagonizam o receptor e inibem algum mecanismo de remoção do “agonista/neurotransmissor” da biofase (Kenakin e Beek, 1985; Crack *et al.*, 1994; Pupo *et al.*, 1999). Segundo tal mecanismo de ação auto-cancelante, no qual os efeitos resultantes dos níveis aumentados de noradrenalina (figura 4-B) são contrapostos pelo antagonismo dos adrenoceptores α_1 (figura 4-C), é aparentemente paradoxal que efeitos de drogas antidepressivas em modelos animais dependam da ativação de adrenoceptores α_1 , uma vez que é esperado que esses receptores sejam antagonizados pelos próprios antidepressivos tricíclicos. Entretanto, um estudo recente mostrou que a imipramina, a amitriptilina e seu metabólito desmetilado, a nortriptilina, interagem com alta afinidade ($K_i \approx 20$ nM) com adrenoceptores α_{1A} e α_{1D} , mas com afinidades cerca de 30 a 100 vezes menores com adrenoceptores α_{1B} (Nojimoto *et al.*, 2010). Essa afinidade diferenciada dos antidepressivos tricíclicos pelos subtipos de adrenoceptores α_1 pode indicar que o mecanismo pelo qual a imipramina e alguns antidepressivos promovem atividade antidepressiva possa ir além da inibição de transportadores

de noradrenalina; ou seja, o aumento dos níveis sinápticos de noradrenalina devem aumentar a ativação de adrenoreceptores α_{1B} pelos antidepressivos tricíclicos, ao mesmo tempo em que os adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} seriam antagonizados (figura 4-D).

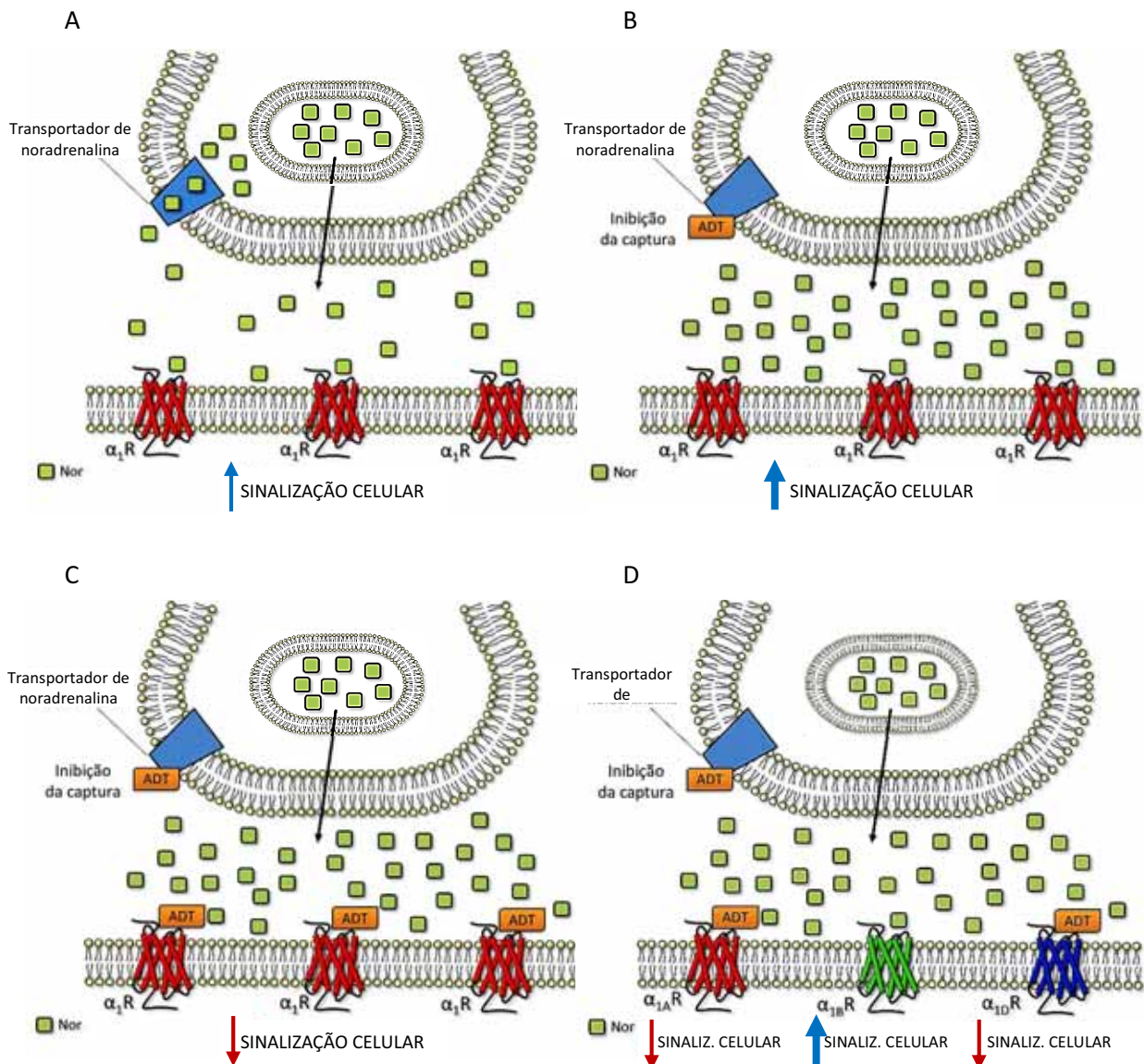


Figura 4. Esquema representando uma sinapse entre dois neurônios e o paradoxo farmacológico relacionado ao mecanismo auto-cancelante dos antidepressivos tricíclicos (ADT): em A, é representada uma situação onde não há inibição da captura neuronal. Em B, uma situação hipotética onde o antidepressivo tricíclico inibe a recaptação, aumentando os níveis sinápticos de noradrenalina (Nor), e consequentemente a sinalização celular é maior do que em “A”. Em C, além da inibição do transportador, o antidepressivo tricíclico também antagoniza os adrenoreceptores α_1 , situação em que a sinalização celular seria diminuída. E em D, o antidepressivo tricíclico antagonizaria apenas adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} permitindo a ativação de α_{1B} pela noradrenalina e aumentando a sinalização celular resultante da ativação desse subtipo.

1.4. JUSTIFICATIVA

Ainda que se saiba que a imipramina apresenta afinidades distintas pelos subtipos de adrenocetores α_1 , em especial, baixa afinidade por α_{1B} (Nojimoto *et al.*, 2010), e que o antagonismo de adrenocetores α_{1B} diminui o comportamento geral em roedores (Stone *et al.*, 2001), não é sabido se o mecanismo (ou pelo menos parte dele) pelo qual a imipramina promove efeito anti-imobilidade no teste de suspensão pela cauda é mediado pela atividade da noradrenalina em adrenocetores α_{1B} e/ou sua ação antagonista em α_{1A} e α_{1D} . A identificação do papel de cada um dos subtipos de adrenocetores α_1 nos efeitos da imipramina é importante na busca de novos antidepressivos mais eficazes para o tratamento da depressão, além de ampliar o conhecimento sobre a importância desses subtipos no comportamento animal no teste de suspensão pela cauda.

2. OBJETIVO

Investigar a participação dos adrenocetores α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços machos provenientes do Biotério Central da UNESP – campus de Botucatu, com peso médio de 35 g e 40 dias de idade. Os camundongos foram colocados em gaiolas de polipropileno (40 x 32 x 16 cm) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu durante 7 a 10 dias para aclimação em salas com ambiente controlado: temperatura média de 24 ± 1 °C e ciclo normal de claro-escuro de 12 h. Os animais foram acomodados em grupos de 8 a 10 por gaiola, com água fresca e comida *ad libitum* até 1 hora antes do início dos experimentos comportamentais. Os tratamentos com drogas ou respectivos veículos foram iniciados às 9 h e 30 min da manhã, e os experimentos comportamentais foram realizados das 10 h às 12 h da manhã do mesmo dia. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, Protocolo 418-CEUA de 2013.

3.2. DROGAS E TRATAMENTOS

Foram utilizados hidrocloridrato de imipramina (Sigma Chemical Co, USA), antidepressivo tricíclico inibidor da recaptura de serotonina/noradrenalina; hidrocloridrato de prazosin (Sigma RBI, Natick, MA, USA), antagonista seletivo de α_1 ; fluoxetina, inibidor seletivo da recaptura de serotonina; hidrocloridrato de RS-100329 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1A} ; hidrocloridrato de BMY-7378 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1D} ; hidrato de L-765314 (Sigma Chemical Co, USA), antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1B} ; desipramina (Sigma RBI, Natick, MA, USA), antidepressivo tricíclico inibidor da recaptura de noradrenalina; e diazepam, benzodiazepínico potencializador alostérico de GABA em receptores GABAérgicos GABA_A. A tabela 1 mostra a constante de dissociação em equilíbrio (K_I) para a imipramina e antagonistas de α_1 utilizados neste trabalho frente à cada um dos subtipos de adrenoceptores α_1 .

Tabela 1. Constante de dissociação em equilíbrio (K_I) da imipramina e de antagonistas de adrenoceptores α_1 e a razão entre as K_I determinada para cada subtipo.

	K_I (nM)			Razão de K_I			Referências
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	B/A	D/A	B/D	
Imipramina	57,00	1.318,00	112,00	24,00	2,00	12,00	(Nojimoto et al., 2010)
Prazosin	0,20	0,25	0,32	1,25	1,60	0,78	(Meyer <i>et al.</i> , 1997)
RS-100,329	0,25	31,6	12,6	126,4	50,40	2,51	(Williams <i>et al.</i> , 1999)
L-765314	420,00	2,00	34,00	0,005	0,08	0,06	(Patane <i>et al.</i> , 1998)
BMY-7378	250,00	630,00	6,30	2,50	0,03	100	(Kenny <i>et al.</i> , 1997)

Para os tratamentos e procedimentos experimentais, os animais foram separados em grupos independentes contendo de 7 a 9 indivíduos. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal, 30 minutos antes dos testes comportamentais. Cada grupo recebeu doses de imipramina, antagonista de adrenoceptores, o veículo apropriado (salina a 0,9 % para imipramina, prazosin, RS-100329, BMY-7378, desipramina e diazepam; ou DMSO a 2,5 % para L-765314), ou a associação imipramina+antagonista, num volume ajustado para 10 mL/kg de peso corporal.

A imipramina (32 mg/kg) também foi utilizada como controle positivo para o efeito anti-imobilidade no teste de suspensão pela cauda; o diazepam à 2 mg/kg, como controle positivo do teste da barra giratória; e a fluoxetina à 32 mg/kg, como controle positivo não associado à recaptura da noradrenalina no teste de suspensão pela cauda.

3.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os testes foram realizados nas dependências da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, junto ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, no laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular de Adrenoceptores α_1 .

3.3.1. Teste da suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda é um dos modelos clássicos para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos (Steru *et al.*, 1985). Nesse teste, os animais são suspensos pela cauda impedidos de tocar o chão ou fugir e defrontam-se com o conflito entre o estresse físico gerado pela tentativa de fuga sem sucesso e a motivação para continuar tentando. Provavelmente, no momento em que esse estresse físico ultrapassa a motivação para a fuga, eles adquirem uma postura imóvel característica (corpo e cabeça alongados, patas dianteiras unidas e traseiras separadas) cuja duração e frequência aumentam ao longo do tempo. Esse modelo tem validade preditiva, uma vez que drogas com atividade antidepressiva utilizadas na terapia da depressão em humanos diminuem o tempo de imobilidade (efeito anti-imobilidade) de camundongos nesse teste (Cryan, Mombereau e Vassout, 2005).

O teste de suspensão pela cauda consiste em suspender o animal numa armação de ferro a 50 cm da base, prendendo sua cauda com auxílio de uma fita adesiva a 1 cm da ponta. O comportamento de cada animal foi gravado por uma câmera de vídeo durante 6 minutos. Desse registro houve a transição do comportamento em questão para um banco de dados quantitativo. Dessa maneira, o tempo total de imobilidade foi adquirido manualmente com auxílio do *software* EthoLog 2,2 (Ottoni, 2000).

3.3.2. Teste da barra giratória

Nos estudos comportamentais com drogas psicoativas é importante a avaliação do possível comprometimento motor das doses utilizadas nos animais. Desse modo, os animais foram submetidos ao teste da barra giratória para a avaliação da habilidade motora (Dunham e Miya, 1957), modificado para as condições do nosso laboratório. Esse teste consistiu em desafiar o animal a permanecer em uma barra que gira a 5 rpm durante 3 minutos. Então, foi registrado manualmente o número total de quedas.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Alguns experimentos (especialmente aqueles com mais de 6 grupos) foram realizados em dias distintos, pois ultrapassaria o tempo máximo de 2 h estabelecido entre o primeiro e último animal. Entretanto, os grupos controle negativo (veículo) e positivo (imipramina) foram repetidos em cada um dos dias, e somados aos seus grupos equivalentes, e então, realizada a análise estatística.

Para as comparações múltiplas de variáveis contínuas (tempo de imobilidade), foi utilizada análise de variância paramétrica, seguida de teste de Dunnett, e para as variáveis discretas (número de quedas), análise de variância não-paramétrica, seguida de teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism v. 5,0, e a diferença entre as médias foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Os camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda apresentaram o característico comportamento de imobilidade e a imipramina nas doses de 16, 32 e 64 mg/kg reduziu o tempo que os animais despenderam imóveis (figura 5. [$F_{(5,40)} = 4,617$; $p = 0,002$]). No entanto, o tempo de imobilidade dos camundongos tratados com imipramina nas doses de 1 e 4 mg/kg não foi diferente daquele encontrado em animais tratados com veículo. Para os demais estudos, foi utilizada imipramina 32 mg/kg, pois esta dose produziu a maior redução da imobilidade dos camundongos.

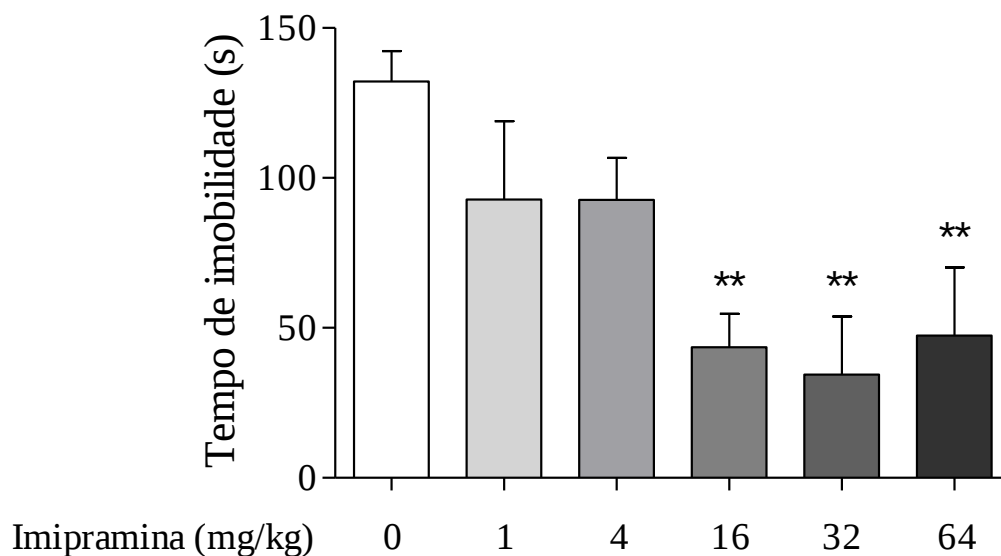


Figura 5. Efeito do tratamento dos camundongos com imipramina no tempo total de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM, de 7 a 8 camundongos. ** $p \leq 0,01$ vs salina.

A participação de adrenoceptores α_1 no efeito anti-imobilidade da imipramina foi investigada através da administração do prazosin, um antagonista não-seletivo de subtipos de adrenoceptores α_1 . Notavelmente, nos camundongos tratados com prazosin (0,5 e 1,0 mg/kg) a imipramina (32 mg/kg) foi incapaz de reduzir o tempo de imobilidade (figura 6. [$F_{(6,69)} = 11,06$; $p < 0,0001$]). Além disso, nos camundongos tratados previamente com veículo, o prazosin 0,25 ou 0,5 mg/kg não modificou o tempo de imobilidade nesse teste. Por outro lado, o prazosin na dose de 1 mg/kg aumentou o tempo de imobilidade dos animais comparado àqueles que receberam veículo.

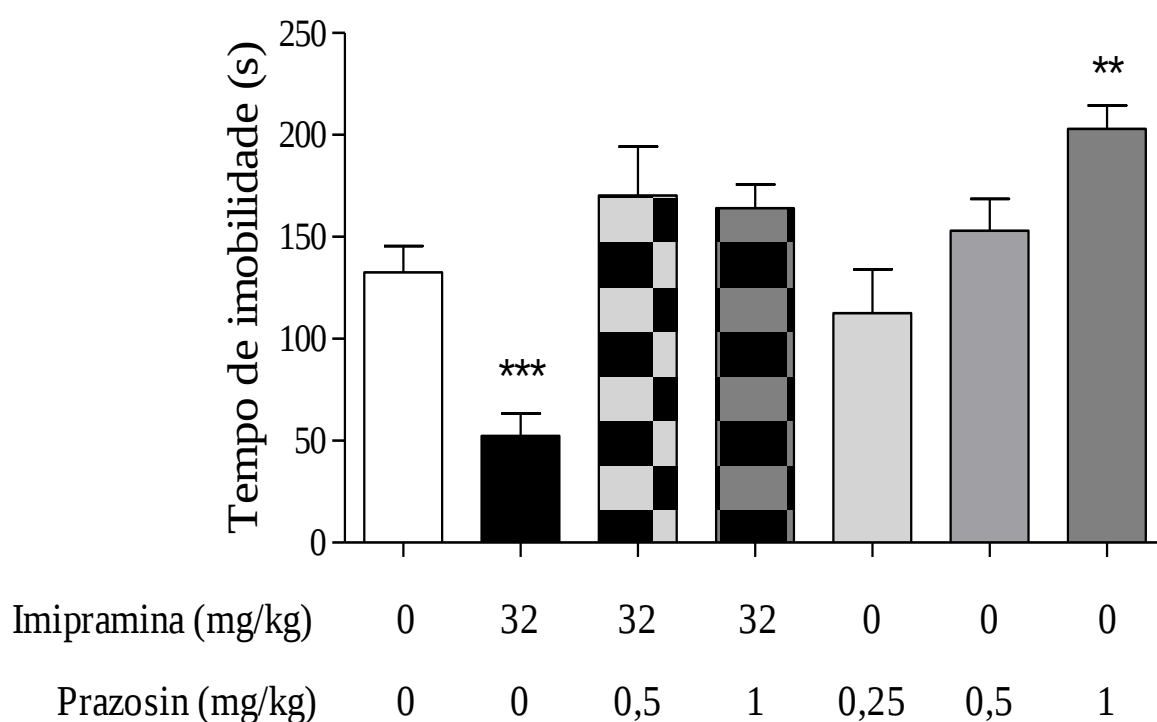


Figura 6. Efeitos do antagonista não-seletivo de adrenoceptores α_1 , prazosin (0,5 a 1,0 mg/kg, i.p.), na duração da imobilidade de camundongos tratados com imipramina (32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 9 a 15 camundongos. ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs salina.

Uma vez que o prazosin 1 mg/kg aumentou o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda, seus efeitos também foram avaliados quanto à capacidade de prejudicar a coordenação motora no teste da barra giratória. Os camundongos tratados com diazepam 2 mg/kg, adotados como controle positivo, apresentaram maior número de quedas em relação aos animais tratados com veículo (figura 7. [H (gl = 5, n = 49) = 16,31; p = 0,006]). Os camundongos tratados com imipramina (32 mg/kg), prazosin (0,5 ou 1 mg/kg), ou a combinação de imipramina (32 mg/kg) e prazosin (1 mg/kg) apresentaram o mesmo número de quedas no teste da barra giratória que aqueles tratados com veículo.

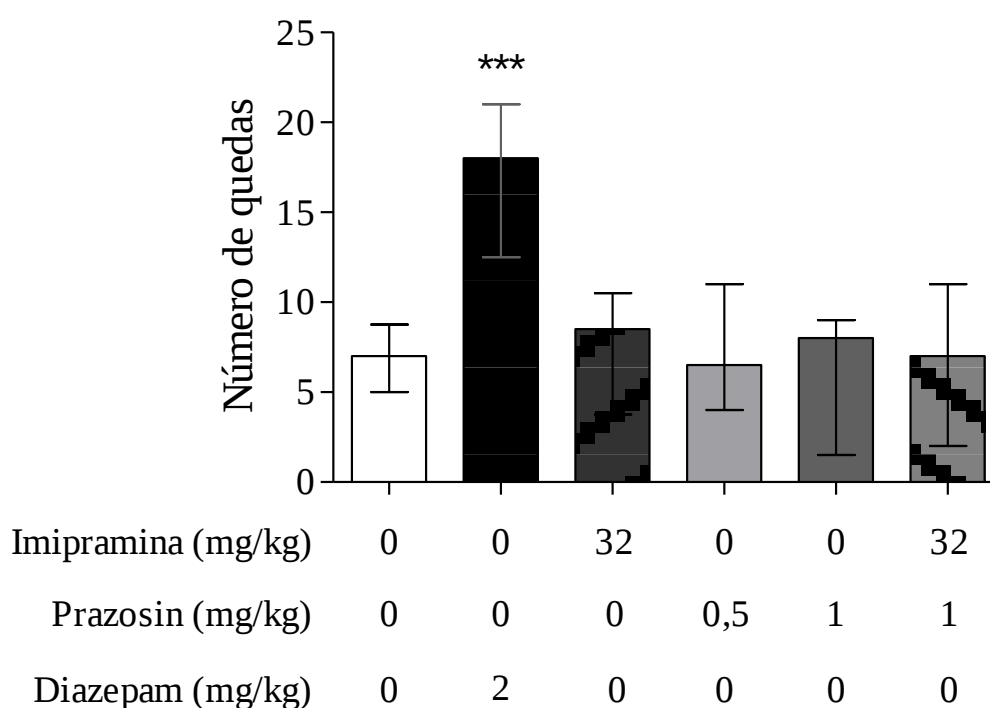


Figura 7. Efeitos do tratamento dos camundongos com imipramina, prazosin e diazepam no número de quedas no teste da barra giratória. Cada coluna representa a mediana e intervalo interquartis de 7 a 9 camundongos. *** $p \leq 0,001$ vs salina.

Para a avaliação da participação de subtipos de adrenoreceptores α_1 no efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda, foram investigados os efeitos da administração prévia dos antagonistas seletivos RS-100329 (α_{1A}), L-765314 (α_{1B}) e BMY-7378 (α_{1D}). As doses dos antagonistas seletivos escolhidas para a associação com a imipramina foram aquelas que apresentaram menor alteração da imobilidade em relação ao veículo quando administradas isoladamente.

O tratamento dos camundongos com o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} RS-100329 (0,5 e 1 mg/kg) não alterou o efeito anti-imobilidade da imipramina (32 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda (figura 8. [$F_{(9,109)} = 7,766$; $p < 0,0001$]). Entretanto, o tratamento apenas com RS-100329 (0,1 a 0,5 mg/kg) diminuiu o tempo de imobilidade dos camundongos.

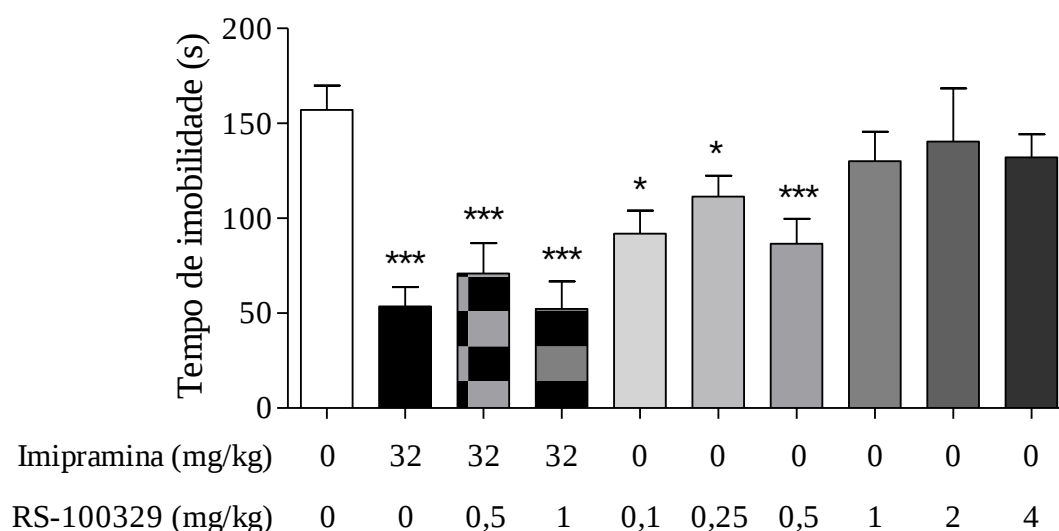


Figura 8. Efeitos do antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} RS-100329 (0,25 a 4,0 mg/kg, i.p.) na duração da imobilidade de camundongos tratados com imipramina (32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 8 a 24 camundongos. * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ vs salina.

De forma semelhante ao observado com os camundongos tratados com RS-100329, o tratamento com o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1D} BMY-7378 (até 1 mg/kg) não alterou o efeito anti-imobilidade da imipramina (32 mg/kg) (figura 9. [$F_{(6,63)} = 19,22$; $p < 0,0001$]). Além disso, os camundongos que receberam tratamento apenas com BMY-7378 (0,25 mg/kg) apresentaram tempo de imobilidade menor que aqueles tratados com veículo.

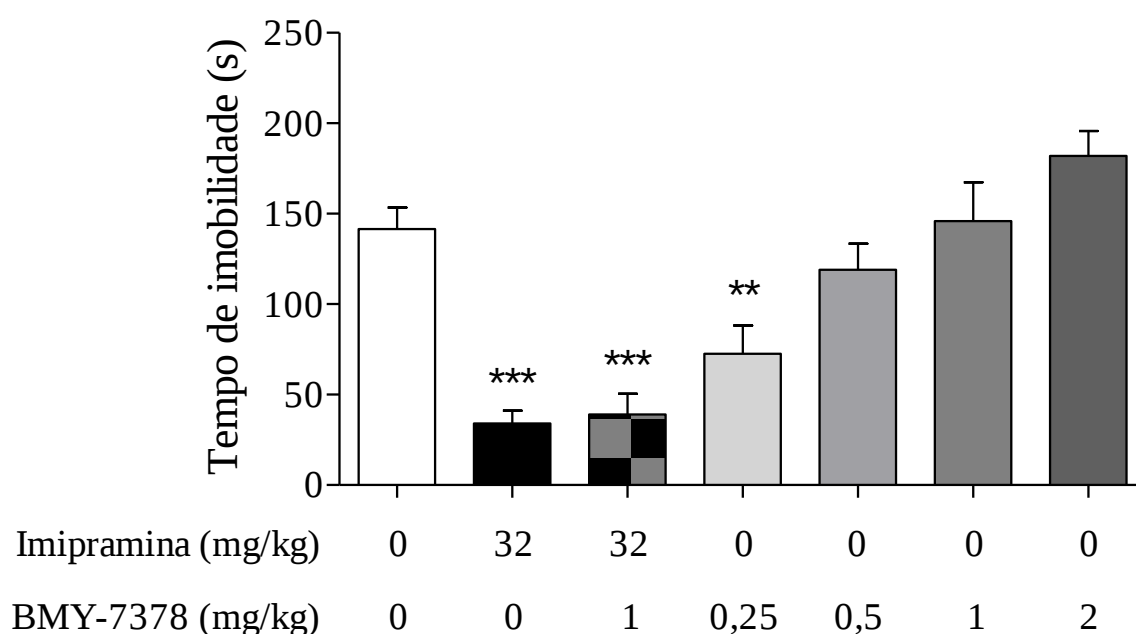


Figura 9. Efeitos do antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1D} BMY-7378 (0,25 a 2,0 mg/kg, i.p.) na duração da imobilidade de camundongos tratados com imipramina (32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 8 a 15 camundongos. ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs salina.

Uma vez que o antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1B} L-765314 foi solubilizado em DMSO 2,5%, foi investigado o efeito desse solvente no tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda. O tempo de imobilidade dos camundongos tratados com DMSO 2,5% não diferiu daquele encontrado em camundongos tratados com salina (Figura 10). Por outro lado, o efeito anti-imobilidade da imipramina (32 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda foi antagonizado pelo L-765314 (0,5 e 1,0 mg/kg, Figura 10, [$F_{(8,90)} = 9,622$; $p < 0,0001$]). Além disso, o tratamento dos camundongos apenas com L-765314 (0,25 à 1 mg/kg) não modificou o tempo de imobilidade, mas a dose 2 mg/kg aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda.

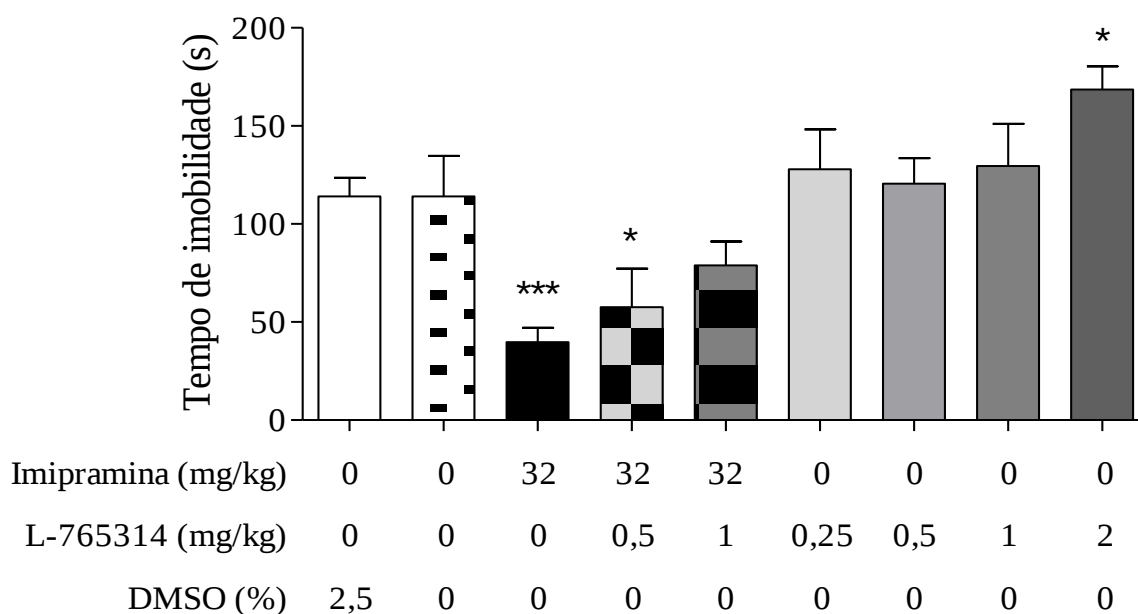


Figura 10. Efeitos do antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1B} L-765314 (0,25 a 2,0 mg/kg, i.p.) na duração da imobilidade de camundongos tratados com imipramina (32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina ou DMSO) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 8 a 22 camundongos. * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ vs DMSO.

Sendo também a imipramina um inibidor da recaptura de serotonina (Tatsumi *et al.*, 1997). Uma vez que o seu efeito anti-imobilidade foi antagonizado por antagonista de adrenoceptores α_1 , foi necessária a utilização de um controle positivo não associado à recaptura da noradrenalina. Para isso, foi investigada o efeito do antagonista não-seletivo de α_1 , prazosin, na redução da imobilidade de camundongos tratados com fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptura de serotonina (Tatsumi *et al.*, 1997), no teste de suspensão pela cauda. Tanto os tratamentos com doses de 16 ou 32 mg/kg de fluoxetina diminuíram significativamente o tempo de imobilidade do animais em relação ao veículo (figura 11. [$F_{(5,37)} = 7,886$; $p < 0,0001$]). Entretanto, o prazosin (0,5 mg/kg) antagonizou o efeito anti-imobilidade da fluoxetina a 32 mg/kg em camundongos.

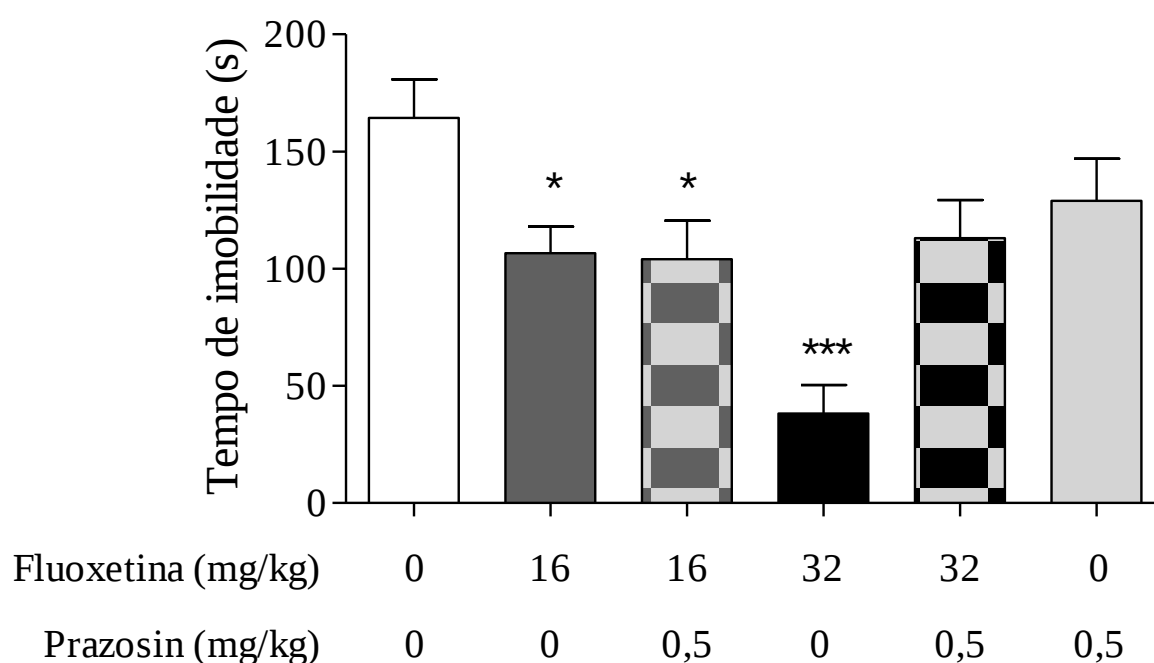


Figura 11. Efeitos do antagonista não-seletivo de adrenoceptores α_1 , prazosin (0,5 mg/kg, i.p.), na duração da imobilidade de camundongos tratados com fluoxetina (16 e 32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 7 a 8 camundongos. * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ vs salina.

Para mimetizar as características farmacológicas da imipramina, isto é, afinidades semelhantes por adrenoceptores α_{1A}/α_{1D} e pelo transportador de noradrenalina, foram investigados no teste de suspensão pela cauda os efeitos de uma dose “sub-efetiva” de desipramina, um antidepressivo tricíclico com alta afinidade para o transportador de noradrenalina, porém com menor afinidade por adrenoceptores α_1 (Tatsumi *et al.*, 1997) associada aos antagonistas seletivos de adrenoceptores RS-100329 (α_{1A}) ou BMY-7378 (α_{1D}). O tempo de imobilidade dos camundongos tratados com desipramina 1 e 4 mg/kg não foi estatisticamente diferente dos tratados com veículo sendo escolhida a dose de 4 mg/kg como a dose “sub-efetiva” deste antidepressivo. Já as doses de desipramina 16 e 32 mg/kg diminuíram o tempo de imobilidade em relação aos animais tratados com veículo (figura 12. [$F_{(6,47)} = 7,317$; $p < 0,0001$]). O antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1A} RS-100329 (1 mg/kg) potencializou o efeito anti-imobilidade da desipramina (4 mg/kg) [$p = 0,0280$, teste t]. Já o antagonista seletivo α_{1D} BMY-7378 não foi capaz de alterar a imobilidade dos camundongos tratados com desipramina (4 mg/kg, Figura 12 [$p = 0,5564$, teste t]).

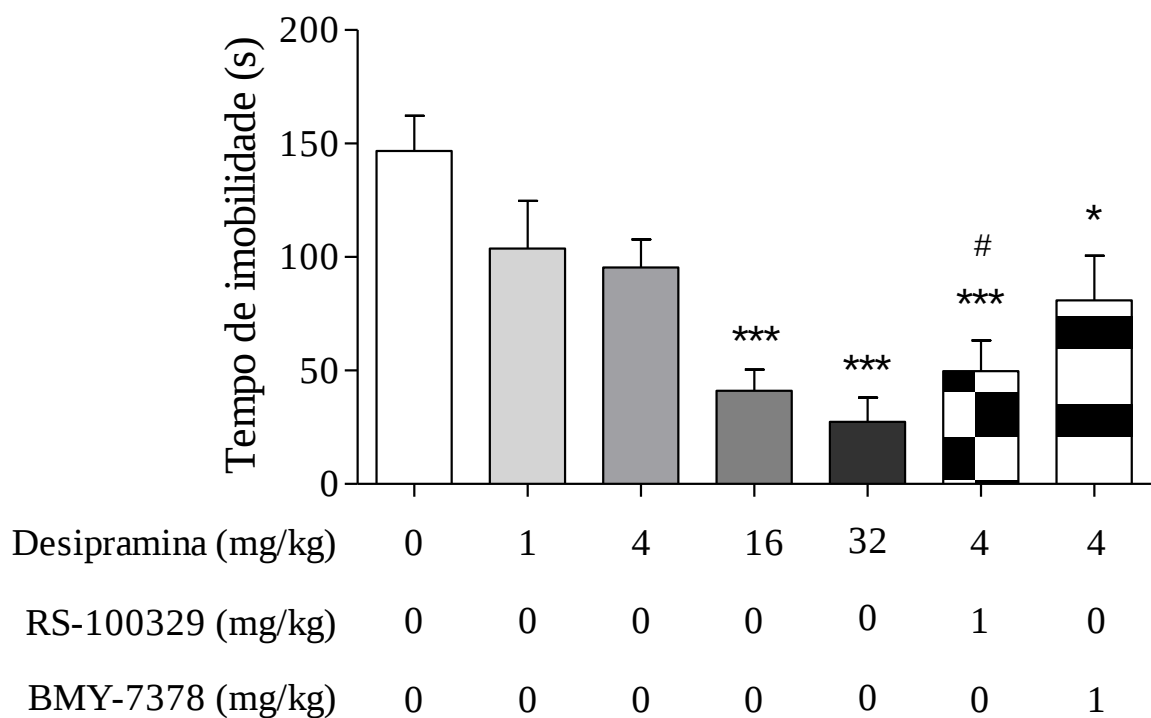


Figura 12. Efeitos do antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} , RS-100329 (1 mg/kg, i.p.), ou antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1D} , BMY-7378 (1 mg/kg, i.p.), na duração da imobilidade de camundongos tratados com desipramina (1 a 32 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina) no teste de suspensão pela cauda. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM de 7 a 8 camundongos. * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ vs salina. # $p \leq 0,05$ vs desipramina (4 mg/kg).

5. DISCUSSÃO

A depressão é uma doença do sistema nervoso central caracterizada por sintomas de anedonia (falta de interesse em ações que costumavam dar prazer), pesar, desesperança e infelicidade (WHO, 2012), com elevado risco de suicídio nos pacientes acometidos (Agerbo, 2005). A etiologia da depressão é complexa e incompletamente conhecida. Entretanto, estudos *post mortem* e de neuroimagem de pacientes com depressão reportaram redução do volume da massa cinzenta e densidade de células da glia em algumas estruturas como o córtex pré-frontal e o hipocampo, regiões relacionadas à aspectos cognitivos da depressão como sentimento de inutilidade e culpa (para revisão, ver (Krishnan e Nestler, 2008)). A deficiência das monoaminas serotonina e noradrenalina tem sido classicamente relacionada às causas da depressão, uma vez que substâncias que aumentam a disponibilidade dessas monoaminas, como antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptura de serotonina e/ou noradrenalina, inibidores da monoaminoxidase e antagonistas de adrenoreceptores α_2 diminuem os sintomas da depressão, enquanto que a reserpina, um inibidor do transportador vesicular que depleta os estoques neuronais de monoaminas, provoca episódios de depressão (para revisão, ver (Ban, 2001; Berton e Nestler, 2006)).

No entanto, cerca de 50% dos pacientes com depressão tem seus sintomas aliviados com a farmacoterapia atual (Berton e Nestler, 2006), demonstrando a importância da identificação de novos alvos farmacológicos para o tratamento da

depressão. Embora o tratamento de primeira escolha para a depressão seja o farmacológico, tratamentos alternativos são empregados nos casos em que os antidepressivos falham em aliviar os sintomas dos pacientes, tais como a estimulação do nervo vago, terapia eletroconvulsiva e psicoterapia (Shelton *et al.*, 2010).

A pesquisa sobre novas drogas com propriedades antidepressivas tem empregado esforços na busca de antagonistas e agonistas de receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos mais seletivos, com a intensão de produzir efeitos semelhantes aos das drogas já existentes, porém mais rápidos e mais seguros (Berton e Nestler, 2006). Além dessas, outras estratégias farmacológicas não relacionadas diretamente às monoaminas têm sido propostas como potencialmente efetivas para o tratamento da depressão como, por exemplo, a utilização de antagonistas de receptores κ -opiídeos (Mague *et al.*, 2003), agonistas ou antagonistas de receptores canabinóides CB₁ (Viveros, Marco e File, 2005), antagonistas de receptores NK₁ de neurocininas (Dunn, Swiergiel e De Beaurepaire, 2005), antagonistas de receptores V_{1b} de vasopressina (Holmes *et al.*, 2003), fármacos que ativam a sinalização envolvendo o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) (Chen *et al.*, 2001), inibidores de fosfodiesterases do tipo 4 (Duman, 2004), antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, bem como inibidores da liberação de glutamato (Paul e Skolnick, 2003), moduladores alostéricos positivos de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA

(Alt, Witkin e Bleakman, 2005) e antagonistas de receptores do hormônio concentrador de melanina, o MCH (Borowsky *et al.*, 2002).

A despeito da crescente lista de novas estratégias citadas acima, é notável que, ainda, muito resta a ser explorado sobre aspectos farmacológicos da neurotransmissão monoaminérgica na depressão, uma vez que, por exemplo, pouco se sabe sobre o papel específico dos receptores alvos dos níveis aumentados de monoaminas causados pelas drogas antidepressivas disponíveis na atualidade. Nesse sentido, a presente tese buscou identificar quais subtipos de adrenoreceptores α_1 estão envolvidos no efeito anti-imobilidade da imipramina em camundongos no teste de suspensão pela cauda, um modelo clássico preditivo do efeito de drogas antidepressivas.

O mecanismo de ação auto-cancelante da imipramina e de outros antidepressivos tricíclicos (no qual a influência sensibilizadora resultante do bloqueio do transportador de noradrenalina com consequente aumento na disponibilidade sináptica desse neurotransmissor, é ao mesmo tempo cancelada pelo antagonismo competitivo dos adrenoreceptores α_1) coloca os antidepressivos tricíclicos numa posição vantajosa como ferramentas farmacológicas úteis na investigação do papel de cada um dos subtipos desses receptores numa dada função biológica. Isso porque a imipramina e outros antidepressivos tricíclicos se comportam como antagonistas competitivos muito mais potentes de adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} do que de adrenoreceptores α_{1B} (Nojimoto *et al.*, 2010). Portanto, é improvável que a ativação de adrenoreceptores α_{1A} ou α_{1D} esteja

envolvida nos efeitos comportamentais agudos dos antidepressivos tricíclicos, enquanto que esse pode não ser o caso para os adrenoreceptores α_{1B} .

Considerando que as concentrações plasmáticas terapêuticas da imipramina em humanos varia de 0,70 a 1,10 mM, dos quais apenas cerca de 5 a 10% está na forma livre (não ligada à proteínas plasmáticas) (Baldessarini, 2001), e que a imipramina se acumula no cérebro numa razão cérebro:plasma de 13 a 20:1 (Besret *et al.*, 1996) estima-se que as concentrações “cerebrais” da imipramina disponíveis para interagir com adrenoreceptores α_1 seja de aproximadamente de 700 nM. Baseando-se nas afinidades desses antidepressivos tricíclicos pelos subtipos de adrenoreceptores α_1 determinadas por Nojimoto *et al.* (2010), simulações teóricas das ocupações dos receptores preveem que as concentrações sinápticas de noradrenalina devem ser aumentadas em muito para superar as ocupações dos adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} atingidas pelas concentrações de imipramina descritas acima. Por exemplo, é previsto que seja necessária que as concentrações sinápticas de noradrenalina sejam aumentadas em aproximadamente 10 vezes apenas para transpor a ocupação dos adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} promovidas pela imipramina 700 nM, enquanto que as ocupações dos adrenoreceptores α_{1B} seriam minimamente afetadas por essa concentração de imipramina; portanto, é previsto que as respostas funcionais mediadas por adrenoreceptores α_{1B} sejam aumentadas/sensibilizadas na mesma extensão na qual os antidepressivos aumentam a disponibilidade sináptica de noradrenalina (Nojimoto *et al.*, 2010).

Estudos de microdiálise em ratos conscientes e com movimentação livre mostram que a administração oral de imipramina à 10 ou 30 mg/kg (Mochizuki *et al.*, 2002) ou intraperitoneal à 20 mg/kg (Wesolowska e Kowalska, 2008) aumentam de 2,5 a 3,5 vezes os níveis extracelulares de noradrenalina no córtex pré-frontal de ratos. Tais dados indicam que o aumento dos níveis extracelulares de noradrenalina produzido pela imipramina é insuficiente para transpor o antagonismo competitivo dos adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} . Entretanto, é importante considerar que os aumentos reais das concentrações sinápticas de noradrenalina produzidos pelos antidepressivos tricíclicos podem ser maiores que aqueles previstos em estudos de microdialise, uma vez que as taxas de recuperação das sondas variam de 10 a 15% e estudos anatômicos e farmacológicos indicam que os transportadores de noradrenalina têm localização distal na terminação nervosa pré-sináptica e não na fenda sináptica (Callado e Stamford, 2000; Zahniser e Doolen, 2001).

Apesar dos efeitos quantitativos dos antidepressivos tricíclicos sobre os níveis extracelulares de noradrenalina no cérebro de roedores serem bem conhecidos, ainda são desconhecidos tais efeitos quantitativos no cérebro humano. Além disso, o alívio dos sintomas da depressão pelos antidepressivos em humanos requer o tratamento por várias semanas, pois processos adaptativos ainda não completamente esclarecidos, mas que envolvem a regulação da expressão de vários receptores monoaminérgicos devem ser instalados (Millan, 2004). De fato, tem sido proposto que o tratamento crônico com alguns

antidepressivos tricíclicos aumenta a densidade de adrenoreceptores α_1 em algumas áreas do cérebro do rato (Rehavi *et al.*, 1980; Nalepa *et al.*, 2002), o que pode aumentar a “eficácia” da noradrenalina nesses receptores (Menkes e Aghajanian, 1981; Menkes *et al.*, 1983). Portanto, é possível que o antagonismo competitivo dos adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} pelos antidepressivos tricíclicos seja menos importante nos tratamentos crônicos, uma vez que seriam necessárias ocupações de menores frações dos adrenoreceptores α_1 para produção de efeitos pela noradrenalina, caso sua “eficácia” esteja aumentada em razão do aumento na densidade de seus receptores. Não obstante, os efeitos do tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos na densidade de adrenoreceptores α_1 são controversos, uma vez que alguns estudos relataram ausência de efeito (Menkes *et al.*, 1983) ou até mesmo redução na densidade de receptores após tratamentos prolongados (Hayakawa, Shimizu e Yamawaki, 1992; Subhash *et al.*, 2003).

Foi observado na presente tese que diferentes antagonistas seletivos e não-seletivos de subtipos de adrenoreceptores α_1 reduzem o efeito do antidepressivo tricíclico imipramina, além de alterar o comportamento de imobilidade de camundongos no teste de suspensão pela cauda quando administrados isoladamente.

Como esperado, o tratamento agudo de camundongos com imipramina diminuiu o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda com perfil de efeito dependente da dose, sendo a dose de 32 mg/kg a que mostrou maior efeito

anti-imobilidade ($\approx 74\%$ de redução de imobilidade em relação aos animais tratados com veículo); tais resultados são semelhantes aos encontrados em estudos anteriores (Bai *et al.*, 2001; Castagne *et al.*, 2010).

Foi observado no presente estudo que o antagonista não-seletivo de adrenoceptores α_1 , prazosin, aboliu o efeito anti-imobilidade da imipramina no teste de suspensão pela cauda, o que indica que os adrenoceptores α_1 têm participação nos mecanismos pelos quais a imipramina promove seu efeito anti-imobilidade nesse teste. É importante ressaltar que esse achado não parece ser consequência da sobreposição de efeitos, ou seja, efeito pró-imobilidade do prazosin (o qual será discutido adiante) associado ao efeito anti-imobilidade da imipramina, pois o efeito inibitório do prazosin também foi observado à dose de 0,5 mg/kg, a qual não foi capaz de modificar o tempo de imobilidade dos camundongos quando administrada isoladamente.

O prazosin 1 mg/kg aumentou o tempo de imobilidade, resultado semelhante aos descritos em estudos anteriores (Hascoet, Bourin e Bradwejn, 1991; Stone e Quartermain, 1999; Hirano *et al.*, 2007). Esse efeito pró-imobilidade no teste de suspensão pela cauda não parece ser exclusivo ao prazosin, pois tem sido observado em outros modelos comportamentais e com outros antagonistas de adrenoceptores α_1 ; por exemplo, o prazosin diminuiu a motilidade no teste do campo aberto em camundongos (Hascoet, Bourin e Bradwejn, 1991), enquanto que o terazosin, antagonista de α_1 , também inibiu a atividade geral de

camundongos expostos a uma nova gaiola, situação que estimula o comportamento exploratório dos animais (Stone *et al.*, 1999).

Em estudos anteriores, foi sugerido que o aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ou diminuição da motilidade no teste do campo aberto em camundongos tratados com prazosin poderia ser devido a um possível efeito sedativo (Hascoet, Bourin e Bradwejn, 1991). Diante disso, para descartar a possibilidade de sedação dos animais no teste de suspensão pela cauda, foi investigada a capacidade do prazosin alterar o desempenho motor de camundongos no teste da barra giratória. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o prazosin não prejudicou o desempenho dos camundongos no teste da barra giratória, confirmando achados anteriores, os quais mostraram que o tratamento com prazosin não causou prejuízo na coordenação motora de camundongos no teste do arame horizontal, outro modelo animal para avaliação de desempenho motor (Stone e Quartermain, 1999).

Na presente tese, o RS-100329, um antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} (Williams *et al.*, 1999) e o BMY-7378, um antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1D} (Goetz *et al.*, 1995) foram incapazes de modificar o tempo de imobilidade dos camundongos tratados com imipramina no teste de suspensão pela cauda, sugerindo que os níveis sinápticos aumentados de noradrenalina não ativam adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} para a produção do efeito anti-imobilidade. Por outro lado, o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1B} L-765314, (Patane *et al.*, 1998) reduziu o efeito anti-imobilidade da imipramina, indicando que esse efeito

depende da ativação de adrenoreceptores α_{1B} pelos níveis sinápticos aumentados de noradrenalina. Mais ainda, esses resultados indicam que o efeito inibitório apresentado pelo prazosin na redução da imobilidade de camundongos tratados com imipramina é devido ao antagonismo de adrenoreceptores α_{1B} , e não ao antagonismo de adrenoreceptores α_{1A} ou α_{1D} .

Outro achado interessante da presente tese foi que os camundongos tratados apenas com as menores doses do antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1A} , RS-100329 (0,1 à 0,5 mg/kg), ou antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1D} , BMY-7378 (0,25 mg/kg), apresentaram redução no tempo de imobilidade quando comparados àqueles tratados com veículo. Por outro lado, o antagonista seletivo de adrenoreceptores α_{1B} , L-765314, à dose de 2 mg/kg aumentou o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda. Esses resultados levam a formulação de pelo menos duas importantes hipóteses sobre os mecanismos de ação da imipramina e de outros antidepressivos tricíclicos que compartilham as características farmacológicas dela: 1) o antagonismo de adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} pela imipramina (Nojimoto *et al.*, 2010) pode ser parte intrínseca de seu mecanismo de ação, e 2) a ativação de cada um dos subtipos de adrenoreceptores α_1 modula de forma distinta o comportamento de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda. A primeira hipótese foi testada indiretamente através da investigação dos efeitos da desipramina, um antidepressivo tricíclico com alta afinidade pelo transportador de noradrenalina (Tatsumi *et al.*, 1997), mas com afinidade muito menor pelos adrenoreceptores α_1

(Richelson e Nelson, 1984). De fato, quando uma dose sub-efetiva de desipramina no teste de suspensão pela cauda foi associada ao antagonista seletivo de adrenoceptores α_{1A} RS-100329 (1 mg/kg), os camundongos apresentaram tempo de imobilidade reduzido. Por outro lado, isso não ocorreu quando o BMY-7378 foi associado à dose sub-efetiva de desipramina. Isso pode indicar que o antagonismo de adrenoceptores α_{1D} seja menos relevante para o efeito anti-imobilidade da imipramina, comparado ao antagonismo de α_{1A} . Quanto à modulação diferencial do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda pelos subtipos de adrenoceptores α_1 , é interessante notar que o comportamento de imobilidade normal dos camundongos em modelos animais reflete uma falha do comportamento ativo de persistência em fugir (Cryan, Markou e Lucki, 2002; Cryan, Mombereau e Vassout, 2005). Tal comportamento de imobilidade tem sido relacionado ao estado de depressão em humanos, pois fármacos que diminuem os sintomas da depressão em pacientes também diminuem o tempo de imobilidade nesses modelos animais (Cryan, Markou e Lucki, 2002; Cryan, Mombereau e Vassout, 2005). No presente trabalho foi observado que tanto o antagonismo de adrenoceptores α_{1A} como de α_{1D} apresentaram efeito anti-imobilidade, e que o antagonismo de α_{1B} promoveu efeito pró-imobilidade, indicando que o estado normal do comportamento de imobilidade é regulado pelo balanço da ativação de cada um dos três subtipos de adrenoceptores α_1 . Esses resultados corroboram achados de Stone *et al.* (2001) que mostram uma forte correlação entre a potência de antagonistas de adrenoceptores α_1 em inibir a atividade comportamental geral

e suas afinidades por adrenoreceptores α_{1B} , mas não por adrenoreceptores α_{1A} ou adrenoreceptores α_{1D} ; ainda, Stone *et al.* (2002) mostraram que a capacidade do modafinil aumentar a atividade geral de camundongos expostos a uma nova gaiola não é observada em camundongos *knockout* para adrenoreceptores α_{1B} .

Embora o BMY-7378 seja um análogo da bupirona com alta afinidade e baixa eficácia em receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (Yocca *et al.*, 1987), e a ativação de 5-HT_{1A} tenha efeito anti-imobilidade no teste de suspensão pela cauda (Miyata, Hirano e Kamei, 2004), a eficácia relativa do BMY-7378 sobre a inibição do acúmulo de 5-hidroxitriptofano no córtex e hipocampo de ratos é menor que aquela da bupirona nos mesmos tecidos (Meller, Goldstein e Bohmaker, 1990). Além disso, a bupirona não reduziu o tempo de imobilidade de gerbos no teste de suspensão pela cauda (Varty, Cohen-Williams e Hunter, 2003), e aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda em camundongos (Cryan, Mombereau e Vassout, 2005). Isso indica que o efeito anti-imobilidade do BMY-7378 observado neste estudo é devido a sua alta afinidade por adrenoreceptores α_{1D} (Goetz *et al.*, 1995; Kenny *et al.*, 1997), e não por ações agonistas em receptores 5-HT_{1A}.

Um estudo recente com camundongos transgênicos que expressam adrenoreceptores α_{1A} e α_{1B} constitutivamente ativos chegou a conclusões diferentes sobre o papel desses dois subtipos de adrenoreceptores no teste do nado forçado de Porsolt e no teste de suspensão pela cauda (Doze *et al.*, 2009): o tempo de imobilidade dos camundongos que expressam adrenoreceptores α_{1A}

constitutivamente ativos foi reduzido, enquanto que o tempo de imobilidade dos camundongos que expressam adrenoceptores α_{1B} constitutivamente ativos foi maior em relação aos camundongos não-transgênicos. Entretanto, a intensa e contínua atividade desses adrenoceptores podem desencadear mecanismos compensatórios, os quais não podem ser previstos nem controlados, como a internalização que ocorre com vários receptores acoplados a proteína G constitutivamente ativos: receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo 1 (Sallese *et al.*, 2000), adrenoceptores α_{1A} , α_{1B} (Stanasila *et al.*, 2008; Akinaga *et al.*, 2013) e α_{1D} (Mccune *et al.*, 2000). É possível que, ao longo do desenvolvimento desses camundongos transgênicos expressando adrenoceptores α_{1A} ou α_{1B} constitutivamente ativos, a densidade de receptores seja menor comparados aos não-transgênicos e por isso os resultados parecem opostos aos achados em nossos estudos.

Adicionalmente, a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptura neuronal de serotonina, foi utilizada como um controle negativo não associado à inibição do transportador de noradrenalina, pois o esperado do antagonismo de adrenoceptores α_1 pelo prazosin era o de não alterar o efeito anti-imobilidade da fluoxetina no teste da suspensão pela cauda. Entretanto, o prazosin (0,5 mg/kg) reverteu o efeito anti-imobilidade da fluoxetina (32 mg/kg) em camundongos no teste de suspensão pela cauda. De fato, Perry e Fuller (1997) em de estudos de microdiálise *in vivo* mostraram que a fluoxetina aumenta a liberação de noradrenalina no hipotálamo. Além disso, em outros estudos envolvendo essa

mesma técnica, porém em outras regiões do sistema nervoso central e empregando agonistas totais ou parciais de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} também sugeriram que a ativação desses receptores pode aumentar a liberação de noradrenalina, tal efeito que foi revertido por antagonistas de 5-HT_{1A} (para revisão, ver (Fink e Gothert, 2007)). Portanto, uma vez que a fluoxetina pode aumentar indiretamente a liberação de noradrenalina, é provável que seu efeito anti-imobilidade no teste de suspensão pela cauda seja devido, pelo mesmo em parte, a esse aumento indireto dos níveis sinápticos de noradrenalina, e quando a fluoxetina foi administrada simultaneamente com o prazosin, teve seu efeito anti-imobilidade revertido.

Inúmeros trabalhos também têm mostrado que o antagonista de adrenoceptores α_1 , prazosin, reverte o efeito anti-imobilidade de extratos de plantas e outros compostos no teste de suspensão pela cauda (Rodrigues *et al.*, 2002; Brocardo *et al.*, 2008; Binfare *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2009; Capra *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2010), bem como o efeito anti-imobilidade da desipramina e da reboxetina no teste do nado forçado de Porsolt (Rogoz, 2009). Esses achados levam a uma perspectiva interessante em relação à participação de adrenoceptores α_1 no efeito anti-imobilidade de diferentes classes de antidepressivos em modelos preditivos para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos.

Em conjunto, os resultados desta tese indicam que os subtipos de adrenoceptores α_1 apresentam funções opostas no comportamento de imobilidade de camundongos no teste de suspensão pela cauda: o antagonismo de

adrenoceptores α_{1A} e α_{1D} não interfere no efeito anti-imobilidade da imipramina, mas reduz o tempo de imobilidade; e o antagonismo de adrenoceptores α_{1B} reduz o efeito anti-imobilidade da imipramina.

6. CONCLUSÃO

O antagonismo seletivo de adrenoreceptores α_{1A} e α_{1D} não modificou o efeito anti-imobilidade da imipramina, sugerindo que esse efeito não dependa da ativação desses receptores. Por outro lado, o efeito da imipramina é dependente da ativação de adrenoreceptores α_{1B} , uma vez que o antagonismo de α_{1B} reverteu seu efeito anti-imobilidade. Além disso, parte do mecanismo de ação da imipramina pode ser devido a sua habilidade em antagonizar adrenoreceptores α_{1A} e de α_{1D} .

Esses resultados podem ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos que, além de inibirem a recaptura de noradrenalina, não antagonizem adrenoreceptores α_{1B} , permitindo à noradrenalina seu livre acesso a esse receptor. Ainda, o desenvolvimento de antagonistas seletivos de adrenoreceptores α_{1A} e de α_{1D} , bem como agonistas seletivos de α_{1B} como fármacos coadjuvantes poderiam beneficiar o tratamento da depressão. Mais estudos envolvendo os subtipos de adrenoreceptores α_1 em modelos animais que avaliam a atividade antidepressiva de fármacos também devem ser realizados, para aumentar o conhecimento sobre as vias do sistema nervoso central envolvidas na depressão e que são moduladas pelos três subtipos.

8. REFERÊNCIAS

AGERBO, E. Midlife suicide risk, partner's psychiatric illness, spouse and child bereavement by suicide or other modes of death: a gender specific study. **J Epidemiol Community Health**, v. 59, n. 5, p. 407-12, 2005.

AKINAGA, J. et al. Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of alpha1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. **Mol Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 870-81, 2013.

ALT, A.; WITKIN, J. M.; BLEAKMAN, D. AMPA receptor potentiators as novel antidepressants. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 12, p. 1511-27, 2005.

ALVES, F. H. et al. Both alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the insular cortex are involved in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83900, 2014.

ARBILLA, S.; LANGER, S. Z. Differences between presynaptic and postsynaptic alpha-adrenoceptors in the isolated nictitating membrane of the cat: effects of metanephrine and tolazoline. **Br J Pharmacol**, v. 64, n. 2, p. 259-64, 1978.

ARNSTEN, A. F. et al. Alpha-1 noradrenergic receptor stimulation impairs prefrontal cortical cognitive function. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 1, p. 26-31, 1999.

BAI, F. et al. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p. 187-92, 2001.

BALDESSARINI, R. J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: depression and anxiety disorders. In: MCGRAW-HILL (Ed.). **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11^a. New York, 2001. p.447-483.

BAN, T. A. Pharmacotherapy of mental illness--a historical analysis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 709-27, 2001.

BAO, A. M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D. F. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 2, p. 531-53, 2008.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BESRET, L. et al. A comprehensive investigation of plasma and brain regional pharmacokinetics of imipramine and its metabolites during and after chronic administration in the rat. **J Pharm Sci**, v. 85, n. 3, p. 291-5, 1996.

BINFARE, R. W. et al. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530-40, 2009.

BOHMER, T.; PFEIFFER, N.; GERICKE, A. Three commercial antibodies against alpha1-adrenergic receptor subtypes lack specificity in paraffin-embedded sections of murine tissues. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 703-6, 2014.

BOROWSKY, B. et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nat Med**, v. 8, n. 8, p. 825-30, 2002.

BROCARD, P. S. et al. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 464-73, 2008.

BURGOYNE, R. D.; MORGAN, A. Chaperoning the SNAREs: a role in preventing neurodegeneration? **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 1, p. 8-9, 2011.

CALLADO, L. F.; STAMFORD, J. A. Spatiotemporal interaction of alpha(2) autoreceptors and noradrenaline transporters in the rat locus coeruleus: implications for volume transmission. **J Neurochem**, v. 74, n. 6, p. 2350-8, 2000.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 232-8, 2010.

CASTAGNE, V. et al. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit 5 8, 2010.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1139-47, 2002.

CHAPPLE, C. R. Selective alpha 1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia: rationale and clinical experience. **Eur Urol**, v. 29, n. 2, p. 129-44, 1996.

CHEN, B. et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, Z. et al. Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. **J Biol Chem**, v. 281, n. 18, p. 12414-20, 2006.

CHU, H. P.; ETGEN, A. M. Ovarian hormone dependence of alpha(1)-adrenoceptor activation of the nitric oxide-cGMP pathway: relevance for hormonal facilitation of lordosis behavior. **J Neurosci**, v. 19, n. 16, p. 7191-7, 1999.

CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. **Trends Neurosci**, v. 21, n. 6, p. 249-54, 1998.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry**, v. 113, n. 504, p. 1237-64, 1967.

COTECCHIA, S. The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 30, n. 6, p. 410-9, 2010.

COUPET, J.; SZUCHS-MYERS, V. A. Brain histamine H1- and H2-receptors and histamine-sensitive adenylate cyclase: effects of antipsychotics and antidepressants. **Eur J Pharmacol**, v. 74, n. 2-3, p. 149-55, 1981.

CRACK, B. E. et al. Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoceptor ligands. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 4, p. 1432-8, 1994.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

DAY, H. E. et al. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. **J Chem Neuroanat**, v. 13, n. 2, p. 115-39, 1997.

DIVIANI, D. et al. The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 19331-40, 2003.

DOCHERTY, J. R. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 3, p. 405-17, 2010.

DOZE, V. A. et al. alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenergic receptors differentially modulate antidepressant-like behavior in the mouse. **Brain research**, v. 1285, p. 148-57, 2009.

DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med**, v. 5, n. 1, p. 11-25, 2004.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208-9, 1957.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 891-909, 2005.

EL-FAKAHANY, E.; RICHELSON, E. Antagonism by antidepressants of muscarinic acetylcholine receptors of human brain. **Br J Pharmacol**, v. 78, n. 1, p. 97-102, 1983.

FARRANT, M.; NUSSE, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 215-29, 2005.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. **Eur J Pharmacol**, v. 372, n. 1, p. 9-16, 1999.

FINK, K. B.; GOTHERT, M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. **Pharmacol Rev**, v. 59, n. 4, p. 360-417, 2007.

FREITAS, A. E. et al. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 335-43, 2010.

GOETZ, A. S. et al. BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, v. 272, n. 2-3, p. R5-6, 1995.

GROENINK, L. et al. 5-HT_{1A} receptor knockout mice and mice overexpressing corticotropin-releasing hormone in models of anxiety. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 185-97, 2003.

HAENISCH, B.; BONISCH, H. Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. **Pharmacol Ther**, v. 129, n. 3, p. 352-68, 2011.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J. Behavioral models in mice. Implication of the alpha noradrenergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 825-40, 1991.

HAYAKAWA, H.; SHIMIZU, M.; YAMAWAKI, S. The effects of electroconvulsive shock or imipramine on subtypes of alpha 1-adrenoceptors in the frontal cortex of the rat. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 9, p. 955-60, 1992.

HIRANO, S. et al. Involvement of dopamine D1 receptors and alpha1-adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. **Eur J Pharmacol**, v. 562, n. 1-2, p. 72-6, 2007.

HOLMES, A. et al. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 11, p. 580-8, 2003.

JENSEN, B. C.; SWIGART, P. M.; SIMPSON, P. C. Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 379, n. 4, p. 409-12, 2009.

KENAKIN, T. P.; BEEK, D. Self-cancellation of drug properties as a mode of organ selectivity: the antimuscarinic effects of ambenonium. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 232, n. 3, p. 732-40, 1985.

KENNY, B. et al. Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. **J Med Chem**, v. 40, n. 9, p. 1293-315, 1997.

KIM, Y. et al. Sleep allostasis in chronic sleep restriction: the role of the norepinephrine system. **Brain Res**, v. 1531, p. 9-16, 2013.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LEPOR, H.; KAZAZI, A.; DJAVAN, B. alpha-Blockers for benign prostatic hyperplasia: the new era. **Curr Opin Urol**, v. 22, n. 1, p. 7-15, 2012.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 642-50, 2009.

MAGUE, S. D. et al. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, n. 1, p. 323-30, 2003.

MCCUNE, D. F. et al. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. **Mol Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 659-66, 2000.

MELLER, E.; GOLDSTEIN, M.; BOHMAKER, K. Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists. **Mol Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 231-7, 1990.

MENKES, D. B.; AGHAJANIAN, G. K. alpha 1-Adrenoceptor-mediated responses in the lateral geniculate nucleus are enhanced by chronic antidepressant treatment. **Eur J Pharmacol**, v. 74, n. 1, p. 27-35, 1981.

MENKES, D. B. et al. Functional Super-Sensitivity of Cns Alpha-1-Adrenoceptors Following Chronic Anti-Depressant Treatment. **Life Sciences**, v. 33, n. 2, p. 181-188, 1983.

MEYER, M. D. et al. Synthesis and pharmacological characterization of 3-[2-((3aR,9bR)-cis-6-methoxy-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-benz[e]isoindol-2-yl)ethyl]pyrido[3',4':4,5]thieno[3,2-d]pyrimidine-2,4 (1H,3H)-dione (A-131701): a uroselective alpha 1A adrenoceptor antagonist for the symptomatic treatment of benign prostatic hyperplasia. **J Med Chem**, v. 40, n. 20, p. 3141-3, 1997.

MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 371-84, 2004.

MIYATA, S.; HIRANO, S.; KAMEI, J. Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT_{1A} receptor in the mouse tail suspension test. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 3, p. 461-9, 2004.

MOCHIZUKI, D. et al. Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 162, n. 3, p. 323-32, 2002.

MODY, I. et al. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. **Trends Neurosci**, v. 17, n. 12, p. 517-25, 1994.

NALEPA, I. et al. Repeated imipramine and electroconvulsive shock increase alpha 1A-adrenoceptor mRNA level in rat prefrontal cortex. **Eur J Pharmacol**, v. 444, n. 3, p. 151-9, 2002.

NELSON, J. C. A review of the efficacy of serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors for treatment of major depression. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1301-8, 1999.

NICHOLSON, A. N.; PASCOE, P. A.; TURNER, C. Modulation of sleep by trimipramine in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 145-50, 1989.

NOJIMOTO, F. D. et al. The tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline and imipramine are weak antagonists of human and rat alpha_{1B}-adrenoceptors. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 1-2, p. 49-57, 2010.

OSWALD, I. et al. Alpha-adrenergic receptor blockade increases human REM sleep. **Br J Clin Pharmacol**, v. 2, n. 2, p. 107-10, 1975.

OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behav Res Methods Instrum Comput**, v. 32, n. 3, p. 446-9, 2000.

PAPAY, R. et al. Localization of the mouse alpha1A-adrenergic receptor (AR) in the brain: alpha1AAR is expressed in neurons, GABAergic interneurons, and NG2 oligodendrocyte progenitors. **The Journal of comparative neurology**, v. 497, n. 2, p. 209-22, 2006.

PAPAY, R. et al. Mouse alpha1B-adrenergic receptor is expressed in neurons and NG2 oligodendrocytes. **J Comp Neurol**, v. 478, n. 1, p. 1-10, 2004.

PATANE, M. A. et al. 4-Amino-2-[4-[1-(benzyloxycarbonyl)-2(S)- [(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]-piperazinyl]-6, 7-dimethoxyquinazoline (L-765,314): a potent and selective alpha1b adrenergic receptor antagonist. **J Med Chem**, v. 41, n. 8, p. 1205-8, 1998.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1003, p. 250-72, 2003.

PERRY, K. W.; FULLER, R. W. Fluoxetine increases norepinephrine release in rat hypothalamus as measured by tissue levels of MHPG-SO4 and microdialysis in conscious rats. **J Neural Transm**, v. 104, n. 8-9, p. 953-66, 1997.

PUPO, A. S. et al. Effects of indoramin in rat vas deferens and aorta: concomitant alpha1-adrenoceptor and neuronal uptake blockade. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 8, p. 1832-6, 1999.

PUPO, A. S.; MINNEMAN, K. P. Interaction of neuronal nitric oxide synthase with alpha1-adrenergic receptor subtypes in transfected HEK-293 cells. **BMC Pharmacol**, v. 2, p. 17, 2002.

_____. Specific interactions between gC1qR and alpha1-adrenoceptor subtypes. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 23, n. 2-3, p. 185-95, 2003.

REHAVI, M. et al. Amitriptyline: long-term treatment elevates alpha-adrenergic and muscarinic receptor binding in mouse brain. **Brain Res**, v. 194, n. 2, p. 443-53, 1980.

REMICK, R. A. Anticholinergic side effects of tricyclic antidepressants and their management. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 12, n. 2-3, p. 225-31, 1988.

RICHELSON, E. Tricyclic antidepressants and histamine H1 receptors. **Mayo Clin Proc**, v. 54, n. 10, p. 669-74, 1979.

RICHELSON, E.; NELSON, A. Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 230, n. 1, p. 94-102, 1984.

RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

ROGOZ, Z. Potentiation of the antidepressant-like effect of desipramine or reboxetine by metyrapone in the forced swimming test in rats. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 6, p. 1173-8, 2009.

SADALGE, A. et al. α_1 Adrenoceptor signaling is required for stimulus induced locomotor activity. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 7, p. 664-72, 2003.

SALLESE, M. et al. The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. **FASEB J**, v. 14, n. 15, p. 2569-80, 2000.

SANDS, S. A.; MORILAK, D. A. Expression of α_1 adrenergic receptor messenger RNA in oxytocin- and corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat paraventricular nucleus. **Neuroscience**, v. 91, n. 2, p. 639-49, 1999.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

_____. Biogenic amines and affective disorders. **Annu Rev Med**, v. 25, n. 0, p. 333-48, 1974.

SCHOENBERGER, J. A. Drug-induced orthostatic hypotension. **Drug Saf**, v. 6, n. 6, p. 402-7, 1991.

SCOPINHO, A. A.; RESSEL, L. B.; CORREA, F. M. α_1 -Adrenoceptors in the lateral septal area modulate food intake behaviour in rats. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 5, p. 752-6, 2008.

SEGURA, V. et al. Alpha1-adrenoceptors in the rat cerebral cortex: new insights into the characterization of alpha1L- and alpha1D-adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, v. 641, n. 1, p. 41-8, 2010.

SHELTON, R. C. et al. Therapeutic options for treatment-resistant depression. **CNS Drugs**, v. 24, n. 2, p. 131-61, 2010.

SPRENG, M.; COTECCHIA, S.; SCHENK, F. A behavioral study of alpha-1b adrenergic receptor knockout mice: increased reaction to novelty and selectively reduced learning capacities. **Neurobiol Learn Mem**, v. 75, n. 2, p. 214-29, 2001.

STANASILA, L. et al. Different internalization properties of the alpha1a- and alpha1b-adrenergic receptor subtypes: the potential role of receptor interaction with beta-arrestins and AP50. **Mol Pharmacol**, v. 74, n. 3, p. 562-73, 2008.

STANASILA, L. et al. Ezrin directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. **J Biol Chem**, v. 281, n. 7, p. 4354-63, 2006.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STONE, E. A. et al. Role of brain alpha 1B-adrenoceptors in modafinil-induced behavioral activity. **Synapse**, v. 46, n. 4, p. 269-70, 2002.

STONE, E. A. et al. Pharmacological evidence for the role of central alpha 1B-adrenoceptors in the motor activity and spontaneous movement of mice. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 2, p. 254-61, 2001.

STONE, E. A.; QUARTERMAIN, D. Alpha-1-noradrenergic neurotransmission, corticosterone, and behavioral depression. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1287-300, 1999.

STONE, E. A. et al. Central alpha1-adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochemical pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1063-75, 2007.

STONE, E. A. et al. Brain alpha 1-adrenergic neurotransmission is necessary for behavioral activation to environmental change in mice. **Neuroscience**, v. 94, n. 4, p. 1245-52, 1999.

SUBHASH, M. N. et al. Cortical alpha-adrenoceptor downregulation by tricyclic antidepressants in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 43, n. 7, p. 603-9, 2003.

SZOT, P. et al. Alpha1-adrenoreceptor in human hippocampus: binding and receptor subtype mRNA expression. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 139, n. 2, p. 367-71, 2005.

TANOUE, A. et al. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. **J Clin Invest**, v. 109, n. 6, p. 765-75, 2002.

TATSUMI, M. et al. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. **Eur J Pharmacol**, v. 340, n. 2-3, p. 249-58, 1997.

U'PRICHARD, D. C. et al. Tricyclic antidepressants: therapeutic properties and affinity for alpha-noradrenergic receptor binding sites in the brain. **Science**, v. 199, n. 4325, p. 197-8, 1978.

VARTY, G. B.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; HUNTER, J. C. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. **Behav Pharmacol**, v. 14, n. 1, p. 87-95, 2003.

VASWANI, M.; LINDA, F. K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2003.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 331-42, 2005.

VON WOLFF, A. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants in the acute treatment of chronic depression and dysthymia: a systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 144, n. 1-2, p. 7-15, 2013.

WESOŁOWSKA, A.; KOWALSKA, M. Influence of serotonin 5-HT(7) receptor blockade on the behavioral and neurochemical effects of imipramine in rats. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 4, p. 464-74, 2008.

WILLIAMS, T. J. et al. In vitro alpha1-adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel alpha1A-adrenoceptor selective antagonists. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 1, p. 252-8, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression: A Global Crisis, 2012.

YOCCA, F. D. et al. BMY 7378, a buspirone analog with high affinity, selectivity and low intrinsic activity at the 5-HT1A receptor in rat and guinea pig hippocampal membranes. **Eur J Pharmacol**, v. 137, n. 2-3, p. 293-4, 1987.

ZAHNISER, N. R.; DOOLEN, S. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻ -dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. **Pharmacol Ther**, v. 92, n. 1, p. 21-55, 2001.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 261-76, 1999.