

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DE DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS
ANTIPSICÓTICOS DE SEGUNDA GERAÇÃO**

GILDA ANGELA NEVES

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DE DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS
CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS
ANTIPSIKÓTICOS DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada por
Gilda Angela Neves
para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientação: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2009.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.07.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cristina Wayne Nogueira
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Hugo Cerecetto
Universidad de la Republica – Uruguay

Prof. Dr. Hugo Verli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rafael Roesler
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

N518e Neves, Gilda Angela
Estudo de derivados N-fenilpiperazínicos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos de segunda geração / Gilda Ângela Neves – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xviii, 193 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Derivados N-fenilpiperazínicos. 2. Esquizofrenia. 3. Antipsicóticos. 4. LASSBio-579. 5. LASSBio-664. 6. Dopamina. 7. Serotonina. 8. Glutamato. 9. Modelos animais. I. Rates, Stela Maris Kuze. II. Título.

CDU: 615.214

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

*“Um menino caminha e caminhando chega no muro
E ali logo em frente a esperar pela gente o futuro está...
E o futuro é um astronave que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade, e nem tem hora de chegar
Sem pedir licença muda nossa vida e depois convida a rir ou chorar
Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar
Vamos todos numa linda passarela de uma aquarela
Que um dia enfim descolorirá...”*

Guido Morra, Maurizio Fabrizio, Toquinho e Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

À Stela pelos ensinamentos, apoio, confiança, paciência e dedicação durante todos estes anos em que trabalhamos juntas.

Ao Prof. François Noël, pelos ensinamentos, apoio, discussões e enriquecimento deste trabalho.

Ao Newton, pela confiança, paciência, apoio, dedicação e pelo exemplo profissional.

Aos Profs. Carlos Alberto Manssour Fraga e Eliezer Barreiro pela colaboração constante.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À Michele, Camila, Andresa e Mari, colegas e amigas do laboratório de Psicofarmacologia Experimental que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, pela ajuda, convivência, apoio e estímulo constantes.

À Alice, Ana Cristina, Ana Paula, Andressa, Eve, Fernanda, Gustavo, Keka, Leo, Luiza, Luisa e Thiaguinho, colegas e amigos no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental, pela convivência, apoio e pelas conversas profissionais ou não.

À Cláudia, Dani Rezende, Dani Valentin, Elisa, Jean Pierre, Luís, Natália, Paulo e Renan, colegas do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular pelos ensinamentos e pela receptividade.

À Luisa, Marcela, Pedro e Priscila, colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, pelos ensinamentos, apoio, convivência, receptividade e pelo carinho nos momentos difíceis.

À Aline, Ana Paula, Bárbara, Diogo, Eduardo, Elizete, Kellen, Liliana, Liziane, Márcio, Rita e Valéria, colegas do corpo docente do Curso de Farmácia – UCS, pelo apoio, compreensão, ensinamentos e troca de experiências ao longo de toda esta jornada dupla.

Aos meus pais, Nádia e Sérgio, pelo apoio, compreensão e confiança constante em todos os momentos. E principalmente por aturarem minhas crises de estresse e mau humor.

À minha irmã, Gina, pela amizade, confiança e valorização constante.

À todos os meus grandes amigos (gaúchos, “cariúchos” e cariocas) por valorizarem a minha presença e não reclamarem da minha ausência quando necessário.

À Dara, por ter enchido minha vida de alegria.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, passaram pela minha vida neste período e me fizeram crescer de alguma forma.

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado foi desenvolvida no âmbito de um projeto interinstitucional intitulado “Planejamento, Síntese e Avaliação dos Perfis Farmacológicos e de ADME de Derivados Heterocíclicos *N*-Fenilpiperazínicos e Isósteros Funcionalizados Candidatos a Novos Protótipos de Fármacos Neuroativos”, que conta com a colaboração de pesquisadores vinculados à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal do Goiás (UFG) e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O referido projeto conta com apoio da CAPES (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica – PROCAD/CAPES processo nº 0092/05-3) e é uma das linhas de pesquisa apoiadas pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INOFARMED) do CNPq.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos seguintes locais:

- Ensaios *in vivo* – Laboratório de Psicofarmacologia Experimental, Faculdade de Farmácia, UFRGS sob a orientação da Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates;

- Ensaios de radioligação (*binding*) – Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, sob a supervisão do Prof. Dr. François Germain Noël;

- Ensaios eletrofisiológicos – Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, sob a supervisão do Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro.

Os resultados obtidos foram divididos em cinco diferentes capítulos. Os quatro primeiros relatam a avaliação farmacológica de novos derivados *N*-fenilpiperazínicos candidatos a protótipos de antipsicóticos de segunda geração, enquanto o quinto capítulo versa sobre o início do desenvolvimento de um novo modelo animal de sintomas da esquizofrenia. São eles:

- *Envolvimento do Sistema Serotonérgico na Atividade In Vivo de LASSBio-579 e LASSBio-581* – artigo publicado junto a periódico *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (ISSN: 0091-3057): NEVES, G.; KLIEMANN, M.; BETTI, A.H.; CONRADO, D.J.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; RATES, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 89: 23-30, 2008.

- *Avaliação da Potencial Atividade Antipsicótica de LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581* – artigo submetido a publicação junto ao periódico *Psychopharmacology* (ISSN: 0033-3158): NEVES, G.; BETTI, A.H.; ANTONIO, C.B.; PRANKE, M.A.; KLIEMANN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; NOËL, F.; RATES, S.M.K. LASSBio-579: a new antipsychotic lead compound active on animal models of schizophrenia positive symptoms. **Psychopharmacol.**, 2009.

- *Efeito de LASSBio-579 Sobre a Neurotransmissão Glutamatérgica* – resultados preliminares dos ensaios eletrofisiológicos realizados com a substância LASSBio-579.

- *Triagem Farmacológica de Derivados N-Fenilpiperazínicos Heterocíclicos* – artigo submetido a publicação junto ao periódico *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (ISSN: 0968-0896): NEVES, G.; MENEGATTI, R.; ANTONIO, C.B.; GRAZZIOTTIN, L.R.; VIEIRA, R.O.; RATES, S.M.K.; BARREIRO, E.J.; NOËL, F.; FRAGA, C.A.M. Searching Multiple Ligands for Schizophrenia Treatment: Discovery of Orally Active Heterocyclic N-Phenylpiperazine Prototypes Acting at D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors. **Bioorg. Med. Chem.**, 2009.

- *Desenvolvimento de Um Modelo Animal de Sintomas da Esquizofrenia* – resultados obtidos na proposição de um novo modelo de sintomas negativos/cognitivos da esquizofrenia baseado no efeito da administração repetida de cetamina sobre animais submetidos à natação forçada repetida.

Todos os protocolos experimentais aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (protocolo n° 2006541) (Anexo I). Um encarte com a estrutura química e todos os fármacos e drogas citados neste trabalho bem como outros artigos relacionados a este trabalho podem ser visualizados nos Anexos II e III, respectivamente.

RESUMO

Este trabalho apresenta a continuidade da avaliação farmacológica das substâncias LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, em busca de um novo protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos antipsicóticos de segunda geração. LASSBio-581 se liga a receptores D_2 -like ($K_i=0,95 \mu\text{M}$), 5-HT_{1A} ($K_i=1,2 \mu\text{M}$) e 5-HT_{2A} ($K_i=11 \mu\text{M}$) com afinidades moderadas. Esta substância é capaz de reduzir a temperatura corporal de roedores, um efeito provavelmente mediado pela ativação de receptores 5-HT_{1A} , e inibir o desenvolvimento de *head-twiches* e *ear-scratches* induzidos pela administração de um antagonista de receptores 5-HT_{2A} . Estes efeitos demonstram a capacidade de LASSBio-581 em modular o sistema serotoninérgico *in vivo* e *in vitro*. Porém, quanto avaliado em modelos animais preditivos de ação antipsicótica, LASSBio-581 foi inativo. LASSBio-580 também é capaz de se ligar a receptores D_2 -like ($K_i=0,73 \mu\text{M}$), 5-HT_{1A} ($K_i=0,48 \mu\text{M}$) e 5-HT_{2A} ($K_i=5,7 \mu\text{M}$) com afinidades moderadas. Esta substância não foi capaz de inibir o desenvolvimento do comportamento de escalada nem a redução da temperatura corporal de roedores induzidos por apomorfina, não apresentando potencial atividade antipsicótica nos ensaios realizados. Já LASSBio-579 é capaz de modular três diferentes sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia: a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica. Esta substância se liga a receptores D_2 -like ($K_i=0,11 \mu\text{M}$), 5-HT_{1A} ($K_i=0,09 \mu\text{M}$) e 5-HT_{2A} ($K_i=2,2 \mu\text{M}$) com afinidades adequadas para uma molécula protótipo que se liga a múltiplos alvos. Apresenta ação antidopaminérgica *in vivo*, demonstrada em três modelos animais preditivos de atividade antipsicótica (sintomas positivos): inibição da estereotipia anfetamínica (NEVES *et al.*, 2003), bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina e hipotermia apomorfínica. A ação agonista 5-HT_{1A} de LASSBio-579 *in vivo* foi claramente demonstrada através de ensaios de aferição da temperatura corporal, onde o efeito hipotérmico induzido por esta substância é completamente bloqueado pela pré-administração de WAY 100635. Porém, a habilidade de LASSBio-579 em modular a atividade de receptores 5-HT_{2A} *in vivo* permanece incerta. Ensaios eletrofisiológicos preliminares demonstraram um aumento da liberação de glutamato induzido por LASSBio-579 que parece ser mediado pela ativação de receptores 5-HT_{2A} , porém comportamentos ou efeitos relacionados a ativação deste sub-tipo de receptor serotoninérgico não foram identificados em roedores tratados com LASSBio-579. Além disso, a administração de LASSBio-579 não induziu efeitos catatônicos em camundongos em doses até 12 vezes superiores àquela ativa no modelo do bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina. Estes resultados demonstram que a estratégia de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante empregada neste trabalho se

mostrou bem sucedida. LASSBio-579 pode ser considerado um novo protótipo de fármaco antipsicótico de segunda geração, ativo em modelos animais de sintomas positivos da esquizofrenia e com baixo potencial de indução de efeitos motores. Porém, algumas limitações em seu perfil farmacológico pode ser identificadas. A afinidade desta substância por receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos é considerada moderada e inferior a de antipsicóticos atualmente no mercado. Ainda, LASSBio-579 induziu um prejuízo na coordenação motora em roedores e apresentou um perfil farmacocinético pouco adequado a utilização clínica (CONRADO *et al.*, 2008). Estes dados encorajam a busca de substâncias com um perfil farmacológico superior ao de LASSBio-579. Neste sentido, uma triagem farmacológica de 18 derivados *N*-fenilpiperazínicos análogos a LASSBio-579 foi realizada. Os resultados obtidos nos ensaios de radioligação a receptores D_2 -like, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} foram utilizados na proposição de relações qualitativas entre estrutura química das substâncias e a afinidade apresentada pelos diferentes receptores. A partir dos resultados obtidos *in vitro*, cinco outras substâncias foram selecionadas para avaliação da potencial atividade frente a sintomas positivos da esquizofrenia no modelo de bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina. Neste ensaio, apenas LASSBio-664 apresentou atividade, sem induzir catatonia nos animais. Porém, esta substância também induz um importante prejuízo motor nos animais. Ensaio adicionais são necessários a fim de diferenciar o perfil farmacológico de LASSBio-664 e LASSBio-579. Outro objetivo deste trabalho foi iniciar o desenvolvimento de um modelo animal de sintomas da esquizofrenia. Os resultados obtidos até o momento apontam para a possibilidade do desenvolvimento de um modelo relacionado a sintomas negativos/cognitivos da esquizofrenia baseados na exposição à natação forçada repetida. Foi demonstrado que apenas clozapina e não imipramina é capaz de reverter o aumento de imobilidade ao longo dos dias acarretado pela exposição repetida à natação forçada em roedores. Este dado demonstra uma potencial validade preditiva, o primeiro grau de validação necessário para um novo modelo animal. O efeito de LASSBio-579 também foi avaliado neste protocolo experimental.

Palavras-chave: esquizofrenia, antipsicóticos, derivados *N*-fenilpiperazínicos, LASSBio-579, LASSBio-664, dopamina, serotonina, glutamato, modelos animais de sintomas da esquizofrenia.

STUDY OF *N*-PHENYLPIPERAZINE DERIVATIVES CANDIDATES TO SECOND GENERATION ANTIPSYCHOTIC LEAD COMPOUNDS

This study strengthened the pharmacological evaluation of the heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivatives LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 by means of in vitro and in vivo pharmacological assays searching a new second generations antipsychotic lead compound. LASSBio-581 presented moderate affinities for *D*₂-like ($K_i=0.95 \mu\text{M}$), 5-HT_{1A} ($K_i=1.2 \mu\text{M}$) e 5-HT_{2A} ($K_i=11 \mu\text{M}$). This compound induced an hypothermic effect in rodents probably mediated by 5-HT_{1A} receptor activation. LASSBio-581 administration inhibited the induction of head-twitches and ear-scratches by a 5-HT_{2A} agonist. These results shown that LASSBio-581 modulates serotonergic neurotransmission in vivo and in vitro. However, it was inactive on animal models predictive of antipsychotic activity. LASSBio-580 presented moderate affinities for *D*₂-like ($K_i=0.73 \mu\text{M}$), 5-HT_{1A} ($K_i=0.48 \mu\text{M}$) e 5-HT_{2A} ($K_i=5.7 \mu\text{M}$). This compound did not inhibited apomorphine-induced climbing nor apomorphine-induced hypothermia. Thus, among the three compounds initially evaluated, LASSBio-579 was the only one that exhibited promising results. This derivative was able to modulate three neurotransmitter systems involved in schizophrenia's pathophysiology: dopaminergic, serotonergic and glutamateric ones. As a multi-target lead compound, LASSBio-579 presented adequate affinities for *D*₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors (K_i *D*₂-like = $0.11 \mu\text{M}$, 5-HT_{1A} = $0.093 \mu\text{M}$ and 5-HT_{2A} = $2.2 \mu\text{M}$). Its antidopaminergic in vivo effect was demonstrated in three animal models of positive symptoms of schizophrenia: amphetamine-induced stereotypy (NEVES *et al.*, 2003), apomorphine-induced climbing behavior and apomorphine-induced hypothermia. Regarding the serotonergic system, LASSBio-579 was considered a 5-HT_{1A} receptor agonist, since the hypothermia induced by this compound was blocked by WAY 100,635 pre-administration. The ability of LASSBio-579 to modulate 5-HT_{2A} receptors was not fully characterized. Electrophysiological assays demonstrated an increase on synaptic glutamate release induced by LASSBio-579 that may be related to 5-HT_{2A} receptor activation, however this compound did not induce any behavior related to 5-HT_{2A} activation in rodents. In addition, LASSBio-579 did not induce catalepsy in mice at doses 12 folds higher than those active at apomorphine-induced climbing test. Thus, LASSBio-579 represents a new antipsychotic lead compound active in animal models of positive symptoms of schizophrenia and with a mild propensity to induce motor side effects. However, some limitations on LASSBio-579's pharmacological profile could be identified. The affinity of LASSBio-579 for dopamine and serotonin receptors is moderate and lower than those presented by second generation antipsychotics. Furthermore, this compound induced a mild decrease on locomotion and exploratory behavior, a meaningful motor coordination impairment and presents a limited oral bioavailability and a low brain penetration (CONRADO

et al., 2008). Considering this, a pharmacological screening of 18 *N*-phenylpiperazine derivatives were done in order to achieve an optimized analogue of LASSBio-579. Structural features of this molecular scaffold were discussed regarding binding affinity and selectivity for D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Among the compounds prepared, LASSBio-664 exhibited an adequate binding profile and a potential for schizophrenia positive symptoms treatment without cataleptogenic effects. However, the motor coordination impairment remained. Additional pharmacological characterization of LASSBio-664 is still needed to find differences from LASSBio-579's profile. Another aim of this study was to start the development of an animal model of schizophrenia symptoms. It was shown that clozapine but not imipramine presented an anti-immobility effect in animals repeated exposed to forced swimming. This result points to the usefulness of repeated forced swimming protocol for developing new animal models predictive of antipsychotic action. The effect of LASSBio-579 in this protocol was also evaluated.

Key-Words: schizophrenia, antipsychotics, *N*-phenylpiperazine derivatives, LASSBio-579, LASSBio-664, dopamine, serotonin, glutamate, animal models of schizophrenia symptoms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	09
3. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ATIVIDADE IN VIVO DE LASSBIO-579 E LASSBIO-581	13
4. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIPSICÓTICA DE LASSBIO-579, LASSBIO-580 E LASSBIO-581	23
5. EFEITO DE LASSBIO-579 SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	55
5.1. Introdução.....	57
5.2. Objetivo.....	59
5.3. Material e métodos.....	60
5.3.1. <i>Cultura de células</i>	60
5.3.2. <i>Whole-cell patch-clamp</i>	60
5.3.3. <i>Drogas</i>	61
5.3.4. <i>Análise dos dados</i>	62
5.4. Resultados e discussão.....	62
5.5. Conclusão.....	69
5.6. Referências bibliográficas.....	69
6. TRIAGEM FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS HETEROCÍCLICOS	75
7. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE SINTOMAS DA ESQUIZOFRENIA	117
7.1. Introdução.....	119
7.2. Objetivo.....	123
7.3. Material e métodos.....	123
7.3.1. <i>Animais</i>	123
7.3.2. <i>Fármacos e tratamentos</i>	124
7.3.3. <i>Natação forçada</i>	124
7.3.4. <i>Experimento 1</i>	124
7.3.5. <i>Experimento 2</i>	125
7.3.6. <i>Experimento 3</i>	125
7.3.7. <i>Experimento 4</i>	126
7.3.7. <i>Experimento 5</i>	126
7.3.8. <i>Análise estatística</i>	127

7.4. Resultados e discussão.....	127
7.5. Conclusão.....	137
7.6. Referências bibliográficas.....	138
8. DISCUSSÃO GERAL.....	145
9. CONCLUSÕES GERAIS.....	153
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
11. ANEXOS.....	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Gênese estrutural dos novos candidatos a protótipos de agentes dopaminérgicos.....	05
Figura 1.2: Metabólitos de LASSBio-581 obtidos por bioconversão.....	07
Figura 3.1: Dose-response curve and influence of haloperidol, (±)-DOI and WAY 100,635 pretreatment on the hypothermic effect of LASSBio-579.....	17
Figura 3.2: Dose-response curve and influence of haloperidol, (±)-DOI and WAY 100,635 pretreatment on the hypothermic effect of LASSBio-581.....	18
Figura 3.3: Effect of LASSBio-579 and LASSBio-581 p.o. on core temperature in mice.....	19
Figura 4.1: Competition curves of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 for D ₂ -like, 5-HT _{1A} and 5-HT _{2A} receptors.....	49
Figura 4.2: Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 on the apomorphine-induced climbing behavior.....	50
Figura 4.3: Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 on the apomorphine induced hypothermia.....	51
Figura 4.4: Effect of different doses of LASSBio-579 in the apomorphine-induced climbing test.....	52
Figura 4.5: Effect of LASSBio-579 on locomotor activity in mice.....	53
Figura 4.6: Effect of LASSBio-579 in the rota-rod test.....	54
Figura 5.1: Esquema de perfusão utilizado para avaliar o efeito de LASSBio-579 sobre mEPSCs em neurônios de hipocampo de rato.....	61
Figura 5.2: Efeito de LASSBio-579 sobre mEPSC em neurônios isolados de hipocampo de ratos.....	63
Figura 5.3: Efeito de antagonistas de receptores de serotonina sobre o aumento na frequência de mEPSCs induzido por LASSBio-579 em neurônios isolados de hipocampo de ratos.....	65
Figura 6.1: Structures of clozapine, aripiprazole, LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581.....	111
Figura 6.2: Correlation between compounds affinities for different receptor.....	112
Figura 6.3: Correlation between affinities of pyrazole and 1,2,3-triazole derivatives with the same substitution pattern.....	113

Figura 6.4: Effects of compounds 3, 6, 7, 9 and 10 in the apomorphine-induced climbing test.....	114
Figura 7.1: Efeito da manipulação animal sobre a natação forçada repetida em camundongos.....	128
Figura 7.2: Efeito do tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 1, 5 ou 14 dias sobre a natação forçada repetida em camundongos.....	129
Figura 7.3: Efeito do tratamento com cetamina 15, 30 e 45 mg/kg i.p. durante 5 dias sobre a natação forçada repetida em camundongos.....	129
Figura 7.4: Efeito de cetamina, clozapina, imipramina e LASSBio-579 no teste de natação forçada de Porsolt.....	133
Figura 7.5: Efeito do tratamento com clozapina, imipramina e LASSBio-579 sobre o aumento do comportamento de imobilidade induzido pela natação forçada repetida no dia 22 (quarta exposição ao nado forçado) em camundongos tratados ou não com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 14 dias.....	135
Figura 7.6: Efeito do tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 14 dias sobre o aumento de imobilidade induzido pela natação forçada repetida em camundongos.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Effect of LASSBio-579 on head-twitches and ear-scratches induced by (\pm)-DOI.....	19
Tabela 3.2: Effect of LASSBio-581 on head-twitches and ear-scratches induced by (\pm)-DOI.....	19
Tabela 4.1: Affinities of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 for D ₂ -like, 5-HT _{1A} and 5-HT _{2A} receptors.....	45
Tabela 4.2: Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 in the catalepsy test.....	46
Tabela 4.3: Effect of LASSBio-579 on the sodium pentobarbital sleeping time.....	47
Tabela 6.1: Structures and apparent affinities of compounds 3-23 for D ₂ -like, 5-HT _{1A} and 5-HT _{2A} receptors.....	107
Tabela 6.2: Effect of 3 (LASSBio-579) and 9 (LASSBio-664) in catalepsy and rota-rod tests.....	109

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos agentes terapeuticamente úteis é o objeto de estudo da química medicinal. Esta pode ser definida como uma área de conhecimento com base na química, que engloba aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cujo foco está na invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de substâncias farmacologicamente ativas, bem como na interpretação de seu mecanismo de ação em nível molecular e na construção de relações entre estruturas químicas e atividades biológicas (estudos de REA) (WERMUTH *et al.*, 1996).

Dentre as estratégias modernas disponíveis para o desenho molecular de novos fármacos, a principal é aquela baseada no mecanismo de ação pretendido, também denominada de abordagem fisiológica. Esta estratégia fundamenta-se no prévio conhecimento de processos fisiológicos e na escolha correta do melhor alvo terapêutico. Este alvo, geralmente representado por uma biomacromolécula, pode ter sua estrutura molecular conhecida ou não (GANELLIN, 1991; PATRICK, 2005; BARREIRO & FRAGA, 2008).

No primeiro caso, programas de modelagem molecular (química computacional) são capazes de simular a topografia tridimensional do receptor, particularmente do sítio de interação com o ligante endógeno, permitindo a visualização do complexo ligante-receptor e fornecendo informações sobre os requisitos estruturais essenciais que permitam uma interação adequada de novas moléculas com o sítio receptor. Este processo de busca de complementaridade molecular apresenta o potencial de planejar teoricamente moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais para um perfeito encaixe com o receptor, isto é, potencialmente bioativas (GANE & DEAN, 2000; WERMUTH, 2003a; BARREIRO & FRAGA, 2008).

Em outros casos a estrutura do alvo terapêutico pode não ser conhecida, como é o caso da maioria das proteínas de membrana, especialmente aquelas que contêm vários segmentos inseridos na bicamada lipídica, como os receptores acoplados a proteína G (AMZEL, 1998). Apenas recentemente foi determinada a estrutura tridimensional do primeiro receptor metabotrópico humano (RASMUSSEN *et al.*, 2007). Frente a esta situação, o desenho molecular de novas entidades químicas se inicia através da estrutura do ligante endógeno, ou seja, o substrato enzimático ou o agonista do receptor eleito. Também pode ser utilizada a estratégia de modificação estrutural planejada de um protótipo-ativo, que pode ser um fármaco, buscando modificações estruturais que representem a otimização das propriedades farmacodinâmicas, ao mesmo tempo que maximizam suas propriedades

farmacocinéticas. Nesta etapa, ferramentas como a simplificação molecular, o bioisosterismo e a restrição conformacional da estrutura protótipo são as estratégias mais empregadas (GANELLIN, 1991; WERMUTH, 2003a; PATRICK, 2005; BARREIRO & FRAGA, 2008).

Dentro deste contexto iniciou-se um projeto com o objetivo de planejar, sintetizar e avaliar farmacologicamente de novas substâncias protótipo candidatas a novos fármacos neuroativos. Foi selecionado como alvo o sistema neurotransmissor dopaminérgico, mais precisamente a ligação seletiva aos subtipos D₂ e D₄ receptores dopaminérgicos buscando o desenvolvimento de substâncias com potencial utilização no tratamento da esquizofrenia (MENEGATTI *et al.*, 2003).

Selecionou-se então como estratégia de planejamento de novos candidatos a fármacos a modificação molecular de ligantes conhecidos de receptores dopaminérgicos. Assim, a equipe do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio - UFRJ) elegeu como protótipos-ativos as estruturas da clozapina, devido ao seu alto grau de restrição conformacional e interessante perfil farmacológico (alta afinidade por receptores D₄) (GRAEFF *et al.*, 1999), e do composto L-741, um ligante seletivo de receptores dopaminérgicos D₂-like (KULAGOWSKI *et al.*, 1996). O emprego da estratégia de hibridação molecular da estrutura dos protótipos deu origem a 3 novos derivados N-fenilpiperazínicos (Figura 1) (MENEGATTI *et al.*, 2003) cujo padrão molecular básico preenche os requisitos necessários à ligação a receptores D₂, conforme modelo de ocupação de volume desenvolvido através de técnicas de modelagem molecular (MACCHI JR, 2001).

O desenho dos compostos LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581 foi realizado através da contração do anel B da estrutura da clozapina e transposição do núcleo aromático D para o átomo de nitrogênio distal do anel piperazínico C, levando a uma maior similaridade estrutural com o composto L-741. Os novos candidatos possuem o grupamento farmacofórico N-fenilpiperazínico e apresentam variação dos núcleos isostéricos pirazólico (LASSBio-579) e 1,2,3-triazólico (LASSBio-580 e LASSBio-581) (Figura 1) (MENEGATTI *et al.*, 2003).

Ensaio de radioligação a receptores muscarínicos, nicotínicos, D₁-like e D₂-like revelaram que estas substâncias apresentam afinidade apenas por receptores D₂-like. Estudos eletrofisiológicos subseqüentes demonstraram que LASSBio-579 e LASSBio-581 atuam como agonistas de receptores D₂ com localização pré-sináptica, enquanto LASSBio-580 seria um antagonista deste mesmo sub-tipo de receptor dopaminérgico (MENEGATTI *et*

al., 2003). Assim, os derivados LASSBio-579 e LASSBio-581 foram selecionadas para a realização de testes farmacológicos *in vivo*.

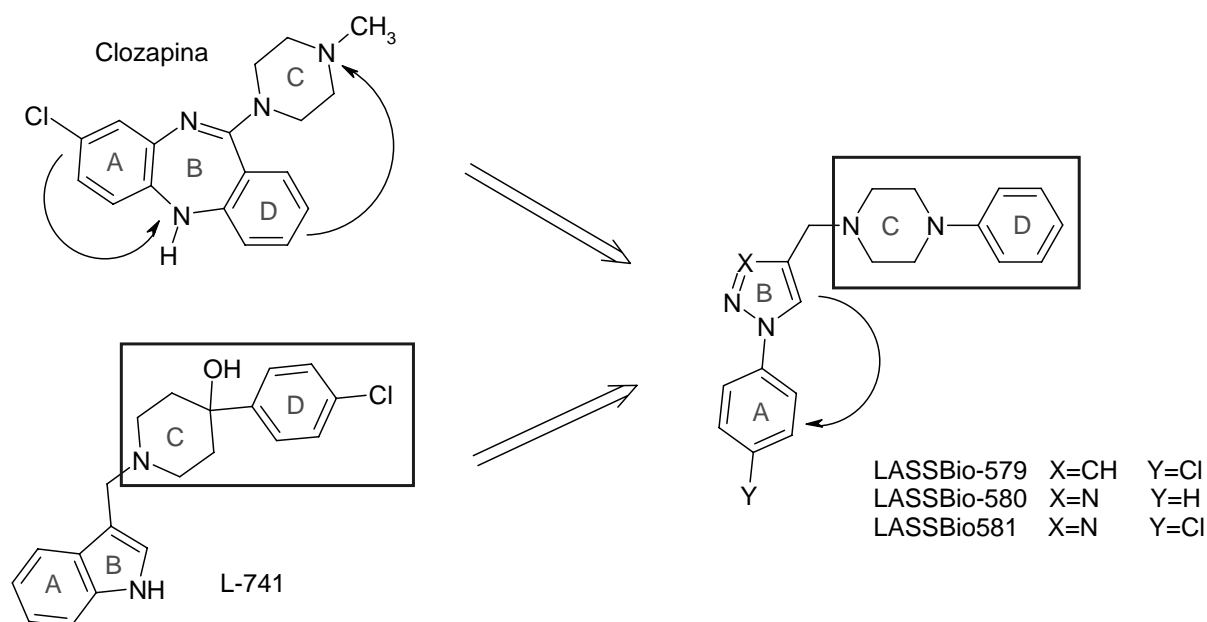


Figura 1: Gênese estrutural dos novos candidatos a protótipos de agentes dopaminérgicos a partir da estrutura da clozapina e do composto L-741 (MENEGATTI *et al.*, 2003).

Ao serem avaliados em modelos de efeitos e comportamentos mediados pelo sistema dopaminérgico em roedores, LASSBio-579 e LASSBio-581 demonstraram uma ação peculiar sobre a neurotransmissão dopaminérgica. Um efeito inibitório sobre comportamentos dopaminérgicos, especialmente de LASSBio-579, foi demonstrado em testes relacionados com o envolvimento de funções motoras. Este efeito provavelmente é mediado pela ativação de receptores D_2 pré-sinápticos demonstrado nos ensaios *in vitro*. Por outro lado, os efeitos hipotérmico, pró-erétil e sobre a motilidade intestinal apresentados pelas substâncias apontaram para uma ação estimulatória das funções dopaminérgicas (NEVES, 2003; NEVES *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2004).

Para a investigação do mecanismo de ação de LASSBio-579 e LASSBio-581 foi selecionado o modelo de aferição da temperatura corporal. Ambas as substâncias induziram uma redução na temperatura corporal dos animais de forma dose-dependente (15 - 60 mg/kg *i.p.*; 30 mg/kg *v.o.*) (NEVES, 2003; NEVES *et al.*, 2003). A indução de hipotermia é um efeito classicamente relacionado à ação de agonistas dopaminérgicos nos centros de regulação da temperatura corporal, especialmente agonistas de receptores D_2 -like (MENON *et al.*, 1988; SALMI *et al.*, 1993; VERMA & KULKARNI, 1993; SALMI, 1998; CHAPERON *et al.*,

2003). Porém, a pré-administração de haloperidol 0,5 mg/kg *i.p.* (antagonista D₂/D₃) não alterou o efeito hipotérmico das substâncias (NEVES *et al.* 2003; NEVES, 2003). Uma vez que os derivados em estudo não apresentaram afinidade por receptores D₁-like em ensaios de radioligação a receptores (MENEGATTI *et al.*, 2003), pode-se afirmar que a hipotermia induzida por LASSBio-579 e LASSBio-581 não é mediada pela ativação direta de receptores dopaminérgicos.

Por outro lado, a pré-administração de uma dose elevada de haloperidol (4 mg/kg *i.p.*) levou a uma potenciação do efeito hipotérmico de LASSBio-579 e de LASSBio-581. Além disso, o haloperidol nesta dose induziu uma redução na temperatura dos animais *per se* (NEVES, 2003). O efeito hipotérmico de altas doses de haloperidol assim como sua reversão pela pré-administração de agonistas de receptores 5-HT₂ são relatados na literatura (YAMADA *et al.*, 1995). Considerando este conjunto de dados e a grande afinidade da clozapina (estrutura protótipo das moléculas em questão) por receptores 5-HT₂, fica clara a necessidade de investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito hipotérmico de LASSBio-579 e LASSBio-581. A comprovação de uma ação antagonista 5-HT₂ através de ensaios *in vitro* e *in vivo* forneceria um importante suporte para a identificação de um protótipo de um novo agente antipsicótico. Também é relevante a realização da avaliação farmacológica pré-clínica do derivado LASSBio-580, uma vez que este apresentou atividade antagonista de receptores dopaminérgicos *in vitro* (MENEGATTI *et al.*, 2003), efeito também interessante na busca de um novo candidato a fármaco antipsicótico.

É importante salientar que para a confirmação de uma potencial utilização das moléculas para o tratamento da esquizofrenia é necessário o uso de modelos animais que representem uma tentativa de reprodução de sintomas da esquizofrenia em roedores, especialmente de sintomas negativos e cognitivos. Exemplos de ensaios que podem ser realizados são os modelos de inibição de pré-pulso e aqueles que fazem uso da administração de antagonistas de receptores de glutamato, como fenciclidina e cetamina (MOORE & GERSHON, 1989; WEISS & KILTS, 1998; KILTS, 2001; BECKER & GRECKSCH, 2004; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005; POWELL & MIYAKAWA, 2006; MOURI *et al.*, 2007; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008; CARPENTER & KOENIG, 2008).

Concomitantemente aos estudos farmacodinâmicos, foi realizada a avaliação do perfil farmacocinético de LASSBio-579 e LASSBio-581 em roedores. A determinação dos principais parâmetros farmacocinéticos para estas substâncias foi realizada pelas vias intravenosa (10 mg/kg), intraperitoneal (30 e 60 mg/kg) e oral (60 mg/kg para LASSBio-579 e 30 e 60 mg/kg para LASSBio-581) (TASSO *et al.*, 2005; CONRADO *et al.*, 2008). Os

resultados obtidos apontam para um perfil farmacocinético adequado à utilização terapêutica para LASSBio-581, com uma biodisponibilidade por via oral de 26% (TASSO *et al.*, 2005), enquanto LASSBio-579 apresentou uma baixa biodisponibilidade por via oral (0,6%) (CONRADO *et al.*, 2008). Os estudos de distribuição tecidual realizados indicam uma menor penetração no sistema nervoso central de LASSBio-579 quando comparado a LASSBio-581 (TASSO *et al.*, 2005, CONRADO *et al.*, 2008).

Ensaio de bioconversão utilizando fungos filamentosos também foram realizados, identificando quatro potenciais metabólitos para LASSBio-581 (Figura 2) (PAZINI *et al.*, 2003) e dois para LASSBio-579 (GOMES, 2007). A elucidação da estrutura dos metabólitos de LASSBio-579 encontra-se em andamento.

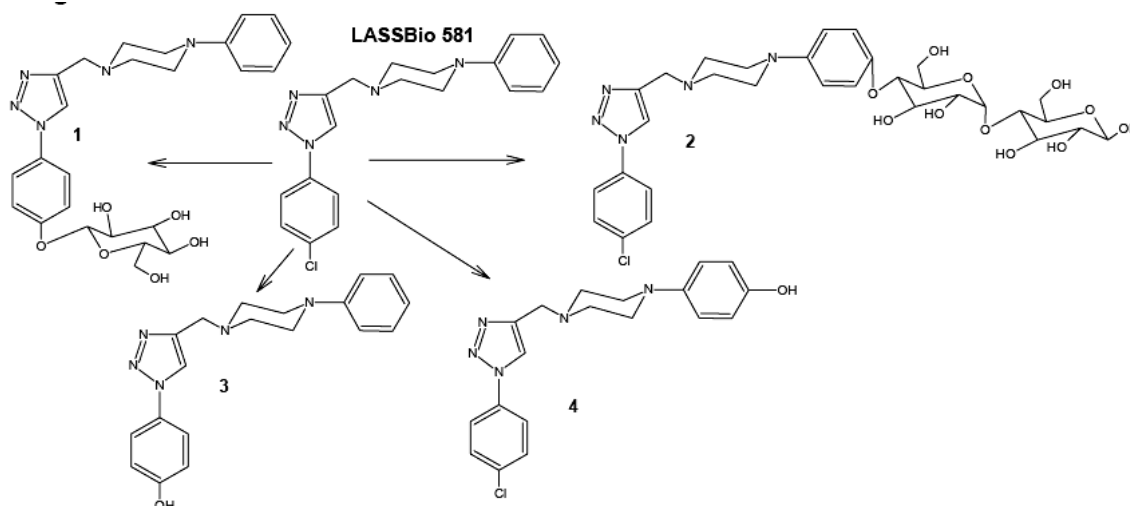


Figura 2: Metabólitos de LASSBio-581 obtidos por bioconversão utilizando os fungos filamentosos *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757 (PAZINI *et al.*, 2003).

O conjunto de resultados acima apresentado determinou o depósito de um pedido de proteção patentária junto ao Instituto Nacional de Proteção Industrial (INPI), intitulado “Novos Derivados *N*-Fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos” (PI 0303465-8), depositado em setembro de 2003 e renovado no ano seguinte (Uso de Derivados *N*-Fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos - PI0405418-0).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

São objetivos desta tese de doutorado:

- Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito hipotérmico induzido por LASSBio-579 e LASSBio-581;
- Investigar a potencial ação antipsicótica de LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581 em modelos animais relacionados aos sintomas positivos da esquizofrenia;
- Avaliar o potencial da substância LASSBio-579 para indução de reações adversas comuns a fármacos antipsicóticos;
- Avaliar o efeito de LASSBio-579 sobre a neurotransmissão glutamatérgica *in vitro*;
- Realizar a triagem farmacológica com 18 outros derivados *N*-fenilpiperazínicos heterocíclicos buscando novas substâncias com potencial utilização para o tratamento da esquizofrenia;
- Desenvolver um modelo animal de sintomas da esquizofrenia, através da investigação do efeito da administração repetida de cetamina sobre a natação forçada em camundongos.

**3. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO NA ATIVIDADE *IN VIVO* DE
LASSBio-579 E LASSBio-581**

3. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ATIVIDADE *IN VIVO* DE LASSBIO-579 E LASSBIO-581

Os dados referentes a este capítulo encontram-se publicados:

NEVES, G.; KLIEMANN, M.; BETTI, A.H.; CONRADO, D.J.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; RATES, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 89: 23-30, 2008.

**4. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIPSIKÓTICA DE LASSBio-579, LASSBio-580
E LASSBio-581**

LASSBio-579: a new antipsychotic lead compound active on animal models of schizophrenia positive symptoms

Gilda Neves^a, Andresa H. Betti^a, Camila B. Antonio^a, Mariana A. Pranke^a, Michele Kliemann^a, Carlos A.M. Fraga^b, Eliezer J. Barreiro^b, Teresa Dalla Costa^c, François Noël^d, Stela M.K. Rates^{a,*}

^a*Laboratório de Psicofarmacologia Experimental, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga no. 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil*

^b*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68.023, 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil*

^c*Laboratório de Farmacocinética, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga no. 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil*

^d*Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil*

*Corresponding author: Dr. Stela Maris Kuze Rates

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752 lab 505C

E-mail: stela.rates@ufrgs.br

Phone: 55-51-33085455

FAX: 55-51-33085437

Abstract

Introduction Recently our group described the design and synthesis of three *N*-phenylpiperazine derivatives (LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581). Initial pharmacological evaluation demonstrated that these compounds may represent potential second generation antipsychotic lead compounds.

Objectives This study strengthened the pharmacological evaluation of the *N*-phenylpiperazine derivatives LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 by means of binding assays and animal models of positive symptoms of schizophrenia and extrapyramidal side effects.

Results LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 presented a moderate affinity for D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. LASSBio-579 presented the highest affinity for all receptors (K_i D₂-like = 0.11 μM, 5-HT_{1A} = 0.093 μM and 5-HT_{2A} = 2.2 μM). Furthermore, this compound was the only one that inhibited apomorphine-induced climbing behavior at 5, 15 and 30 mg/kg p.o. and apomorphine-induced hypothermia at non

cataleptogenic doses. At 15, 30 and 60 mg/kg p.o. LASSBio-579 induced a mild decrease on locomotion and exploratory behavior and meaningful motor coordination impairment in the rota-rod test. At 5 mg/kg p.o. it did not interfere with motor parameters. LASSBio-579 30 and 60 mg/kg p.o. did not influence pentobarbital sleeping time.

Conclusions LASSBio-579 represents a new antipsychotic lead compound active on animal models of positive symptoms of schizophrenia and with a mild propensity to induce motor side effects.

Keywords *N-phenylpiperazine derivatives, LASSBio-579, schizophrenia, antipsychotic, apomorphine-induced climbing*

Introduction

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder characterized by the development of three main kinds of symptoms: positive (hyperactivity, delusions, hallucinations, disorganized speech), negative (avolition, anhedonia, social isolation) and cognitive (attentional impairment, memory deficits) (Wong and Van Tol, 2003, Marek and Merchant, 2005). The annual incidence of schizophrenia averages 15 per 100,000 and there is a 0.7% risk of developing the illness over one's lifetime (Tandon et al., 2008a).

Pharmacological treatment of schizophrenia includes two classes of drugs: the typical or first generation antipsychotics (mainly haloperidol and chlorpromazine) and the atypical or second generation antipsychotics (clozapine, amisulpride, zotepine, risperidone, olanzapine, quetiapine, sertindole, ziprasidone, aripiprazole, perospirone, and paliperidone) (Tandon et al., 2008b). These drugs share an equivalent efficacy in improving positive symptoms and ability to inhibit dopamine actions mediated by D₂ and D₃ dopamine receptors (Reynolds, 2004; Gardner et al., 2005; Strange, 2008; Tandon et al., 2008b). However, strong inhibition of dopaminergic neurotransmission in the dorsal striatum is related to extrapyramidal side effects which can impair drug compliance (Reynolds, 2004; Gardner et al., 2005; Strange, 2008).

Second-generation antipsychotics seem to be more effective than first-generation agents in alleviating negative and cognitive symptoms and present a lower risk of causing extrapyramidal side effects (Farah, 2005; Tandon et al., 2008b). Although atypical antipsychotics could present diverse receptor binding profiles and mechanisms of action, it is accepted that activity at serotonin receptors plays an important role in their antipsychotic activity. Agonism at 5-HT_{1A} receptors and 5-HT_{2A} antagonism might be important for

explaining the effects of drugs such as clozapine and aripiprazole on cognitive and negative symptoms and for their relative lack of extrapyramidal effects (Kapur and Remington, 1996; Millan, 2000; Meltzer et al., 2003; Farah, 2005; Jones and McCreary, 2008). However, second-generation drugs induce severe metabolic side effects (weight gain, dyslipidemia and diabetes mellitus) and a significant population of patients is refractory to the treatment (Holt et al., 2004; Farah, 2005; Johnsen and Jorgensen, 2008; Tandon et al., 2008b), thus underscoring the importance of developing more effective and safer antipsychotics.

Recently our group described the design and synthesis of three *N*-phenylpiperazine derivatives [LASSBio-579 (1-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-4-pyrazolylmethyl]-4-phenylhexahydropiperazine), LASSBio-580 (1-[1-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylmethyl]-4-phenylhexahydropiperazine) and LASSBio-581 (1-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylmethyl]-4-phenylhexahydropiperazine)] aiming to achieve a new antipsychotic lead compound (Menegatti et al., 2003). A preliminar *in vitro* pharmacological evaluation indicated that LASSBio-579 and LASSBio-581 act as agonists at pre-synaptic dopamine D₂-like receptors while LASSBio-580 as antagonist at this same receptor (Menegatti et al., 2003).

In vivo studies performed by intraperitoneal route demonstrated that LASSBio-579 and LASSBio-581 modify behaviors and pharmacological effects mediated by dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rodents, more specifically associated with D₂, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors (Neves et al., 2003; 2008). LASSBio-579 inhibited amphetamine-induced stereotypy in rats (Neves et al., 2003). LASSBio-579 and LASSBio-581 caused a significative reduction in mice core temperature that was blocked by WAY 100635 (a 5-HT_{1A} receptor antagonist), inhibited head-twitches and ear-scratches induced by (±)-DOI, two responses related with 5-HT_{2A} receptor activation in rodents (Neves et al., 2008), and induced mild catalepsy in mice (Neves et al., 2003). Taking together, these results indicate that LASSBio-581 and mainly LASSBio-579 may represent potential atypical antipsychotic lead compounds. No *in vivo* pharmacological studies were conducted with LASSBio-580 until now.

In this work we carried on a further pharmacological evaluation of LASSBio579, LASSBio-580 and LASSBio-581 by means of binding assays to serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors and animal models of positive symptoms of schizophrenia and extrapyramidal effects, by the oral route of administration.

Materials and Methods

In vitro assays

Radioligands and drugs

[³H]-YM-09151-2 (82.5 Ci/mmol), [³H]-8-OH-DPAT (170.2 Ci/mmol) and [³H]-ketanserin (67 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear Life Science Products, USA. Clozapine, ketanserin tartrate, pargilyne, prazosin hydrochloride, serotonin creatinine sulphate and (-)-sulpiride were purchased from Sigma, São Paulo, Brazil. Aripiprazole was kindly provided by Bristol-Myers Squibb Corporation. LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 were synthesized, purified and structurally characterized as previously described (Menegatti et al., 2003).

The test substances were dissolved in DMSO to obtain stock solutions. Solutions of LASSBio-579 ($1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-8}$ M), LASSBio-580 ($5 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-7}$ M) and LASSBio-581 ($3 \times 10^{-5} - 3 \times 10^{-7}$ M) were prepared in incubation buffer. (-)-Sulpiride was dissolved in DMSO whereas prazosin was dissolved in ethanol and clozapine was dissolved in purified water with addition of 0.1 % acetic acid 0.1 M. Other agents were dissolved in purified water to obtain stock solutions. Subsequent dilutions were prepared in incubation buffer. At the final concentration used, DMSO and ethanol had no effect in our assays.

Tissue preparation

Adult male Wistar rats (200 - 300 g) were killed by decapitation. The brains were immediately removed on ice and hippocampus, striatum and cortex were dissected, weighted and stored in liquid nitrogen until use. This procedure was approved by the Institutional Ethical Committee for Animal Care from Federal University of Rio de Janeiro.

Striatum were homogenized in a Potter apparatus with a motor-driven Teflon pestle at 4°C in 20 volumes per gram of tissue of ice-cold Tris-HCl 50 mM buffer (pH 7.4) containing MgCl₂ 8 mM and EDTA 5 mM. The resulting suspension was ultracentrifuged at 48 000 g_{av} at 4°C for 20 min. The pellet was resuspended in 20 volumes of buffer and incubated at 37°C during 10 min for endogenous neurotransmitters removal. This suspension was cooled on ice and ultracentrifuged twice at 48 000 g_{av} for 20 min at 4°C. The final pellet was resuspended in buffer yielding a proportion of 1.5 ml/g tissue and stored in liquid nitrogen until use.

Hippocampus and cortex were homogenized in a Potter apparatus with a motor-driven Teflon pestle at 4°C in 20 volumes (hippocampus) or 10 volumes (cortex) of ice-cold Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) buffer per gram of tissue. The resulting suspension was centrifuged twice at 900 g_{\max} at 4°C for 10 min. The resulting supernatants were combined and ultracentrifuged at 48 000 g_{av} for 10 min. The pellet was resuspended in buffer and incubated at 37°C during 10 min for endogenous neurotransmitters removal. This suspension was cooled on ice and ultracentrifuged twice at 48 000 g_{av} for 10 min at 4°C. The final pellet was resuspended in buffer yielding a proportion of 1.5 ml/g tissue and stored in liquid nitrogen until use.

The protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

Binding assays

For binding to D2-like receptors, striatal membranes (50 μg protein), test compounds and 0.1 nM [^3H]-YM-09151-2 were incubated at 37°C for 60 min in a solution containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM EDTA and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) in a final volume of 500 μL . Non-specific binding was estimated in the presence of 30 μM (-)sulpiride.

For binding to 5-HT_{1A} receptors, hippocampal membranes (50 μg protein), test compounds and 1 nM [^3H]-8-OH-DPAT were incubated at 37°C for 15 min in a solution containing 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 μM pargyline and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), in a final volume of 500 μL . Non-specific binding was estimated in the presence of 10 μM serotonin.

For binding to 5-HT_{2A} receptors, cortical membranes (150 μg protein), test compounds and 1 nM [^3H]-ketanserin were incubated at 37°C for 15 min in a solution containing 100 nM prazosin and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), in a final volume of 500 μL . Non-specific binding was estimated in the presence of 1 μM ketanserin.

After the incubation, samples were rapidly diluted with 3 x 4 ml Tris-HCl 5 mM and immediately filtered under vacuum on glass fibre filters (GMF 3, Filtrak, Germany) previously soaked in 0.5% polyethyleneimine. Filters were then dried and immersed in a scintillation mixture (POPOP (1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene) 0.1 g/l and POP (2,5-diphenyloxazole) 4.0 g/l in toluene). The radioactivity retained in the filters was counted with a Packard Tri-Carb 1600 TR liquid scintillation analyzer. Competition curves with clozapine

(2×10^{-6} – 1×10^{-10} M) and aripiprazole (2×10^{-7} – 5×10^{-10} M) were also performed for receptor profile comparisons.

Behavioral Experiments

Animals

Adult male CF1 mice (25 – 35 g) from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS) breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages (17 x 28 x 13 cm) in groups of eight mice with free access to food (Nuvital®) and water. Mice were kept at constant room temperature (22 ± 2 °C) and humidity (60%), under a 12 h light-dark cycle (lights off at 7:00 pm) and were adapted to local conditions for at least 72 h before the experiments. All experimental protocols were approved by CONEP - Brazil (National Commission of Research Ethics – Protocol 2006541) and performed according to guidelines of The National Research Ethical Committee (published by National Health Council – MS, 1998) and Brazilian law (Brasil, 2008), which are in compliance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS, 1985).

Drugs and treatments

LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 were synthesized, purified and structurally characterized as described elsewhere (Menegatti et al., 2003). Apomorphine hydrochloride hemihydrate (Sigma, São Paulo, Brazil), clozapine (Novartis, São Paulo, Brazil), haloperidol (Galena, São Paulo, SP, Brazil) and sodium pentobarbital (Cristália, São Paulo, SP, Brazil) were used.

LASSBio-579, LASSBio-580, LASSBio-581 and haloperidol were suspended in saline with addition of 1% (v/v) polysorbate 80. Sodium pentobarbital were directly dissolved in saline. Apomorphine was dissolved in saline with addition of 0.1% ascorbic acid and clozapine in saline with addition of 0.1% acetic acid 0.1 M. Vehicle groups received 1% (v/v) polysorbate 80 in saline. The drugs were administered by intraperitoneal and oral routes (10 ml/kg body weight) or subcutaneously (5 ml/kg body weight).

At the beginning LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 (15 mg/kg p.o.) were evaluated in models predictive of antipsychotic action (apomorphine-induced climbing and apomorphine-induced hypothermia tests) as well regarding their ability to induce catalepsy (30 and 60 mg/kg p.o.), a behavior linked to extrapyramidal effects. Given that LASSBio-579 presented a superior profile, it was selected for an additional pharmacological

evaluation. Then it was tested in apomorphine-induced climbing (1, 5, 15 and 15 mg/kg p.o.), spontaneous locomotor activity (15, 30 and 60 mg/kg p.o.), rota-rod (5, 15, 30 and 60 mg/kg p.o.) and barbiturate sleeping time tests (30 and 60 mg/kg p.o.). Haloperidol (0.5 and 4.0 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) were used as reference drugs when appropriate. All doses are expressed as free base.

Apomorphine-induced climbing

Mice were treated with one of the test compounds or vehicle (first treatment) and immediately put in cages (29 x 23 x 19 cm) with the floor, walls and top consisting of metal bars (2 mm diameter). Animals were allowed to freely explore the cages for 30 min. After that they were treated with apomorphine 4 mg/kg or vehicle s.c. (second treatment). The climbing behavior score was evaluated as described by Park et al. (2005): normal behavior (0 point), increased activity and sniffing (1 point), occasional clinging to sides of cage with forepaws (2 points), intermittent clinging to sides of top of cage with all four paws (3 points) and uninterrupted climbing with all four paws (4 points). Climbing behavior was scored at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min after second treatment administration. The climbing index was calculated as the sum of all scores obtained by the same animal at each time interval.

Apomorphine-induced hypothermia

Core temperature was recorded with a digital thermometer (ProCheck®) with reading precision of 0.1 °C. Temperature measures were carried out between 9:00 and 11:00 a.m. at controlled room temperature (24 ± 1 °C). Mice were gently immobilized and the apparatus lubricated with vaseline was inserted 1.5 cm into animal's rectum. Mice were pretreated with one of the test drugs or vehicle p.o. Thirty minutes later, all animals received a second treatment with apomorphine 1 mg/kg i.p. The body temperature of each animal was taken immediately prior (basal temperature), 45 and 60 minutes after the pre-treatment (i.e. 15 and 30 minutes after the second treatment). Temperature decrease (°C) was determined by the difference between basal core temperature and the core temperature after apomorphine treating at each time of measure.

Catalepsy test

Mice were gently placed by forepaws on a wood bar elevated 6.5 cm from the floor. The time spent by the animals in this position (up to 3 min) was measured 30, 60 and 90 minutes after treatment.

Locomotor activity

Locomotor activity was monitored in an area made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 x 30 x 45 cm) divided into 24 squares of equal area. Mice were treated with the test substances and immediately positioned at the apparatus center. After a five-minutes habituation period, mice were observed during 45 minutes. The following parameters were recorded: number of squares crossings and rearings.

Rota-rod test

The apparatus consisted of a cylinder of 3 cm of diameter rotating at 5 rpm. One day before test the animals were trained once during five minutes. On the test day the mice that were able to stay 90 seconds balanced on the rotating rod were selected for testing. Mice performance was measured before and 60 minutes after drug administration. The integrity of motor coordination was assessed on the basis of the longest time of permanence and the number of falls in a 5 min period.

Barbiturate sleeping time

Sixty minutes after gavage with the test compounds, all groups received pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.). Sleep latency and sleeping time (time elapsed between the lost and voluntary recovery of the righting reflex) were recorded. It was assumed a 240 minutes cut-off for sleeping time, i.e., animals whose sleeping time was over 240 min was counted as 240 min.

Statistical Analysis

The median inhibitory concentrations (IC_{50}) were estimated from the competition curves, using a computerized non-linear regression analysis of the untransformed data (Prism 4.0, GraphPad Software Inc.), assuming a single population of binding sites. The K_i values were calculated from Cheng-Prusoff equation, $K_i = IC_{50}/(1 + [radioligand]/K_d)$.

Apomorphine-induced hypothermia, catalepsy and rota-rod tests results were analyzed by two-way (treatment and time factors) ANOVA for repeated measures followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test. The remaining experimental data were subjected to a one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc test, or Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks followed by Dunn's Method post-hoc according to data distribution. The analyses were performed using Sigma Stat 2.03 software (Jandel Scientific Corporation). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 Pharmacological Evaluation

Binding assays

The competition curves of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 at D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors are shown in Figure 1. The corresponding K_i values (table 1) indicate that all three compounds have a moderate affinity for D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, when compared to clozapine and aripiprazole, and a similar selectivity profile, with equivalent affinities for D₂-like and 5-HT_{1A} and low-grade affinity for 5-HT_{2A} receptors (D₂-like \cong 5-HT_{1A} > 5-HT_{2A}). LASSBio-579 presented the highest affinity for all investigated receptors (Table 1).

[Figure 1 near here]

[Table 1 near here]

Apomorphine-induced climbing

LASSBio-579 15 mg/kg p.o significantly (P<0.01) diminished the climbing induced by apomorphine (4 mg/kg s.c.), an effect that is not observed with LASSBio-580 and LASSBio-581 at the same dose (Fig 2). As a comparison, note that haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) fully abolished the effect of apomorphine (P<0.001). None of these substances induced a climbing behavior per se.

[Fig 2 near here]

Apomorphine-induced hypothermia

From all compounds tested only LASSBio 579 was active. Pretreatment with LASSBio-579 (15 mg/kg p.o.) inhibited apomorphine (1 mg/kg i.p.) hypothermic effect at 60 min after administration (P=0.018) (Fig 3). Haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) blocked the apomorphine-induced hypothermia at both time intervals (P<0.002) (Fig 3).

[Figure 3 near here]

Catalepsy test

LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 (30 and 60 mg/kg p.o.) did not induce any cataleptic behavior (Table 2). As expected haloperidol (4 mg/kg p.o.) caused a significant increase in the time spent by mice at imposed uncomfortable position ($P < 0.01$).

[Table 2 near here]

LASSBio-579

Effect of different doses in the apomorphine-induced climbing test

LASSBio-579 was tested at 1, 5, 15 and 30 mg/kg p.o. Except for 1 mg/kg all doses significantly blocked the climbing behavior induced by apomorphine ($P < 0.013$) (Fig 4). Mice treated with LASSBio effective doses plus apomorphine (4 mg/kg s.c.) presented a climbing index not significantly different from those treated with vehicle only ($P > 0.237$). None of tested doses induced climbing behavior per se.

[Figure 4 near here]

Locomotor activity

LASSBio-579 60 mg/kg p.o. significantly reduced locomotor activity and exploratory behavior expressed as number of crossings and rearings ($P < 0.05$) (Fig 5). The 15 mg/kg p.o. dose affected rearing number only (Fig 5b).

[Figure 5 near here]

Rota-rod test

Rota-rod mice performance was somewhat impaired by LASSBio-579 in a dose dependent manner (Fig 6). Mice treated with LASSBio-579 15, 30 and 60 mg/kg p.o. presented lower permanence time when compared to vehicle treated animals ($P < 0.01$) and to their own performance before the treatment ($P < 0.05$) (Fig 6a). The number of falls was not altered (Fig 6b). At 5 mg/kg p.o. LASSBio-579 did not affect any animals' motor coordination parameters (Fig 6). As expected, haloperidol (4 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) induced both an increase in the number of falls (Fig 6b) and a decrease in the longest time of permanence (Fig 6a) ($P < 0.001$).

[Figure 6 near here]

Barbiturate sleeping time

LASSBio-579 (30 and 60 mg/kg p.o.) treatment did modify neither latency nor pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.) sleeping time (Table 3) differently from haloperidol (4 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) that caused an increase in mice sleeping time ($P < 0.05$).

[Table 3 near here]

Discussion

The purpose of this work was to further evaluate the pharmacological profile of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581, three heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivatives designed aiming a new antipsychotic lead compound.

Results from binding assays indicate that LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 bind with moderate affinity to D₂-like receptors in agreement with previous results published by Menegatti et al. (2003). It is important to notice that [³H]-YM-09151-2 is labeling D₂, D₃ and D₄ receptors in a non selective manner (Assié et al., 1993). Since D₄ receptor density in the rat striatum represents only about 20% of the D₂-like receptors (Defagot et al., 2000), the estimated K_i value probably represents mainly the affinities of the compounds for the D₂ and D₃ receptors.

The present study also demonstrates that these derivatives present a moderate affinity for 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, in good accordance with previous results indicating that these drugs also modulate serotonergic neurotransmission in rodents (Neves et al., 2008).

LASSBio-579 presented the highest affinity for all investigated receptors with K_i values about 5-13 times lower than LASSBio-580 and LASSBio-581 for 5-HT_{1A} and D₂-like receptors, and 3-5 times lower for 5-HT_{2A} receptors. With respect to their selectivity profile, all derivatives present equivalent affinities for 5-HT_{1A} and D₂-like receptors. On the other hand, the three compounds have a 7-24 times lower affinity for the 5-HT_{2A} receptors, as indicated by the 5-HT_{1A}/5HT_{2A} and D₂-like/5HT_{2A} K_i ratios. Although different with respect to the absolute affinities, this binding profile is quite similar to that presented by aripiprazole in our experimental conditions (Table 1) and described elsewhere (Shapiro et al., 2003; Newman-Tancredi et al., 2005) confirming the usefulness of this molecular scaffold for developing new antipsychotic drugs.

All three compounds were evaluated in two animal models predictive of efficacy on treating positive symptoms of schizophrenia: apomorphine-induced climbing and apomorphine-induced hypothermia in mice (Costall et al., 1978; Geyer and Ellenbroek, 2003).

Although both models are based on the induction of a hyperdopaminergic state by apomorphine, the main difference between them is the dependence of motor activity. Apomorphine-induced climbing is an animal model classically linked to motor agitation, one of the schizophrenia positive symptoms, and consequently can be altered by substances that induce motor deficits (Costall et al., 1978; Weiss and Kilts, 1998; Geyer and Ellenbroek, 2003). On the other hand, hypothermia induced by low doses of apomorphine (such as 1 mg/kg i.p.) is mediated by direct activation of D₂-like receptors in the hypothalamus thermoregulatory center, making this model useful for detecting substances with antidopaminergic activity, independently of motor parameters (Puech et al., 1978; Salmi et al., 1998)

Initially LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 were tested using a single dose (15 mg/kg p.o.), which was elected as a screening dose for potential antipsychotic activity based on catalepsy results (Neves et al., 2003). Despite having virtually no strength as an animal behavioral model for antipsychotics, the catalepsy test is valuable for studying the neuropharmacology of extrapyramidal function and as a rapid behavioral screening for predicting motor side effects of potential antipsychotic drugs (Sangberg et al, 1988; Moore and Gershon, 1989; Weiss and Kilts, 1998). Neves et al., (2003) have demonstrated that LASSBio-579 (40 mg/kg) and LASSBio-581 (20, 30 and 40 mg/kg) induced catalepsy in mice when intraperitoneally administrated. In the present study, LASSBio-579 LASSBio-580 and LASSBio-581 were evaluated at 30 and 60 mg/kg by the oral route and did not provoke any significant effect (Table 2).

LASSBio-579 (15 mg/kg, i.p.) was effective in apomorphine-induced climbing and hypothermia tests, blocking the climbing behavior and inhibiting the core temperature decrease (Fig 2 and 3). These results are in accordance with previous observation that this compound inhibits amphetamine-induced stereotyped behavior (Neves et al., 2003) and substantiate its potential effectiveness for treating schizophrenia positive symptoms.

LASSBio-580 and LASSBio-581 (15 mg/kg p.o.) did not inhibit the climbing behavior (Fig 2) nor block apomorphine induced hypothermia (Fig 3). Furthermore, LASSBio-581 had no effect in the amphetamine-induced stereotypy test in rats (Neves et al., 2003). Thus we can discard the hypothesis of a potential antipsychotic activity for LASSBio-580 and LASSBio-581.

In summary, from the tested compounds only LASSBio-579 was effective in the apomorphine-induced climbing and hypothermia tests and these effect takes place at a non cataleptogenic dose. This profile could fit in with second generation antipsychotics that

induce extrapyramidal effects just with dose escalation, such as risperidone and olanzapine (Owens, 1996; Farah, 2005). Consequently, this derivative was selected for an additional pharmacological characterization.

Different doses of LASSBio-579 (1, 5, 15 and 30 mg/kg p.o.) were tested in the apomorphine-induced climbing model. All tested doses, with exception of 1 mg/kg, blocked the apomorphine-induced climbing behavior (Fig 4). This result confirms the antidopaminergic *in vivo* effect of this compound at doses even lower than that evaluated earlier (Neves et al., 2003).

In order to evaluate potential motor side effects, LASSBio-579 influence on spontaneous locomotor activity and motor coordination were assessed. Animals treated with LASSBio-579 presented a mild effect on spontaneous locomotion and exploratory behavior, decreasing rearing and crossing numbers at 60 mg/kg p.o. only (Fig 5). When tested in the rota-rod apparatus LASSBio-579 (15, 30 and 60 mg/kg p.o) considerably reduced the longest permanence time (Fig 6a), considered as meaningful motor coordination impairment. Nevertheless, when administered at 5 mg/kg p.o. LASSBio-579 did not produce any alteration in mice motor coordination (Fig 6) and preserved its effectiveness in the apomorphine-induced climbing test (Fig 4).

Beyond motor impairments, sedation is also an important side effect induced by current antipsychotic drugs. All first generation drugs (initially called major tranquilizers or neuroleptics) induce sedative effect in patients (Baldessarini and Tarazi, 2001). A meta-analysis comparing different schizophrenia treatments concluded that clozapine, quetiapine and zotepine are more sedating than haloperidol whereas aripiprazole was significantly less sedating (Leucht et al., 2009). LASSBio-579 (30 and 60 mg/kg p.o.) did not alter barbiturate sleeping time (Table 3) indicating that it does not have an important central depressant or hypnotic effect. However, considering its influence on locomotor parameters, a mild sedative effect can not be excluded.

The results discussed so far characterize LASSBio-579 as an antipsychotic lead compound with a preclinical pharmacology predictive of efficacy for treating schizophrenia positive symptoms as well as an advantageous side effects profile when compared to current therapeutic arsenal. With respect to its mechanism of action, the *in vitro* binding profile of LASSBio-579 could, at least partially, underlie its *in vivo* pharmacological properties. Indeed, LASSBio-579 binds with moderate affinity to rat D₂-like receptors and act as a pre-synaptic agonist at these receptors (Menegatti et al., 2003). The inhibition of apomorphine-induced effects by this compound could be explained by its antidopaminergic action. Furthermore,

both mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic pathways have an important role in motor functions control and striatum and nucleus accumbens are considered the central structures mainly involved (Gold et al., 1988; Canales & Iversen, 2000). An increase in spontaneous locomotion as well as in exploratory behavior can be induced by dopaminergic agonists of both D₁ and D₂-like receptor family (Glickstein & Schmauss, 2001; Ikemoto, 2002). Accordingly, compounds that decrease dopaminergic neurotransmission (such as D₂-like antagonists or presynaptic agonists) induce an impairment of motor function (Bradbury et al., 1984). Thus, the antidopaminergic action demonstrated in vitro by LASSBio-579 might also underlie the motor deficits induced by this substance in rodents. On the other hand, we already demonstrated that LASSBio-579 can also modulate serotonergic neurotransmission in rodents (Neves et al., 2008) probably acting as 5-HT_{1A} agonist and 5-HT_{2A} antagonist. 5-HT_{2A} receptors differentially modulate the activity of dopaminergic neurons depending on the brain region. Antagonism at this site can modulate nigrostriatal dopamine function and decrease the liability for extrapyramidal symptoms induction (Kapur and Remington, 1996; Meltzer et al., 2003; Reynolds, 2004). In addition, 5-HT_{1A} agonists can attenuate the catalepsy induced by haloperidol and other antipsychotics (Prinssen et al., 1998; Haleem et al., 2004; Reynolds, 2004; Bardin et al., 2005). The anticataleptogenic properties of clozapine have been found to be partially 5-HT_{1A} receptor-mediated (Millan et al., 1998; Millan, 2000; Jones and McCreary, 2008), despite its modest affinity for this receptor (IC₅₀ 0.85 μM – Table 1; IC₅₀ = 0.49 μM – literature data) (Newman-Tancredi et al., 1998). Finally LASSBio-579 mild sedative and non-hypnotic effects are also consistent with its binding profile. Clozapine sedative mechanism is not fully understood but muscarinic, H₁ and 5-HT_{2A} receptors may contribute to this action (Sorge et al., 2004). LASSBio-579 does not bind to muscarinic receptors (Menegatti et al., 2003) and presents low affinity for 5-HT_{2A} receptors in comparison with 5-HT_{1A} and D₂-like receptors.

As a result is conceivable that the in vitro binding profile LASSBio-579 could explained part of its in vivo effects, even if we know that it is extremely difficult to do such predictions in the case of schizophrenia (Roth et al., 2004). An additional difficulty araised with the evidence that LASSBio-579 has a limited oral bioavailability (F=0.6%) and a low brain penetration (6.3%) in rats (Conrado et al., 2008). Thus, it may be possible that at the doses evaluated, LASSBio-579 does not reach the necessary central concentration to occupy a significative number of receptors to induce the observed effects. These considerations lead to different hypotheses to explain the in vivo activity of LASSBio-579, such as a specific distribution into brain structures or contribution of active metabolites. Identification of

LASSBio-579 main metabolites and its pharmacological evaluation are in progress. It is also important to keep in mind that pharmacokinetic evaluation was performed in rats whereas pharmacodynamic studies were conducted in mice. The pharmacokinetic evaluation in mice is planned.

In conclusion, LASSBio-579 represents a new antipsychotic lead compound active in animal models of positive symptoms of schizophrenia and with a mild propensity for inducing motor side effects.

Acknowledgements This work was supported by grants from INCT de Fármacos e Medicamentos (INOFARMED), CNPq, Brazil and Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD), CAPES, Brazil. The authors are grateful to CAPES, for the fellowship to Gilda Neves and Andresa Heemann Betti, and to FAPERGS, for the fellowship to Michele Kliemann, Camila Boque Antonio and Mariana Pranke.

References

Assié M, Sleight AJ, Koek W (1993). Biphasic displacement of [3H]-YM-09151-2 binding in the rat brain by thioridazine, risperidone and clozapine, but not by other antipsychotics. *Eur J Pharmacol* 237: 183-189.

Baldessarini RJ and Tarazi FI (2001). Drugs and the treatment of psychiatric disorders: psychosis and mania. In: Hardman J G, Limbird L E, Gilman, A G (2001). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. McGraw-Hill, New York.

Bardin L, Kleven MS, Barret-Grevoz C, Depoortere R, Newman-Tancredi A (2005). Antipsychotic-like vs cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D₂ antagonist and 5-HT_{1A} agonist properties. *Neuropsychopharmacol* 31: 1869-1879.

Bradbury AJ, Cannon JG, Costall B, Naylor RJ (1984). A comparison of dopamine agonist actions to inhibit locomotor activity and to induce stereotyped behaviour in the mouse. *Eur J Pharmacol* 105: 33-47.

Brasil, Congresso Nacional. Lei n. 11.794. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. D.O.U, Brasília, 08 de outubro de 2008.

Canales JJ and Iversen SD (2000). Psychomotor-activating effects mediated by dopamine D₂ and D₃ receptor in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 161-168.

CIOMS (1985). International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Council for International Organizations of Medical Sciences.

Conrado DJ, Verli H, Neves G, Fraga CAM, Barreiro EJ, Rates SMK, Dalla Costa T (2008). Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N-phenylpiperazine antipsychotic prototype. *J Pharm Pharmacol* 60: 699-707.

Costall B, Naylor RJ, Nohria V (1978). Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. *Eur J Pharmacol* 50: 39-50.

Defagot MC, Falzone TL, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M, Antonelli MC (2000). Quantitative analysis of the dopamine D₄ receptor in the mouse brain. *J Neurosci Res* 59: 202-208.

Farah A (2005) Atypicality of atypical antipsychotics. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 7: 268-284.

Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P (2005) Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ* 172: 1703-1711.

Geyer MA and Ellenbroek B (2003). Animal behavior models and the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1071-1079.

Glickstein SB and Schmauss C (2001). Dopamine receptor functions: lessons from knockout mice. *Pharmacol Ther* 91: 63-83.

Gold LH, Swerdlow NR, Koob GF (1988). The role of mesolimbic dopamine in conditioned locomotion produced by amphetamine. *Behav Neurosci* 102: 544-552.

Haleem DJ, Shireen E, Haleem MA (2004). Somatodendritic and postsynaptic serotonin-1A receptors in the attenuation of haloperidol-induced catalepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 28: 1323-1329.

Holt RIG, Pevelert RC, Byrne CD (2004) Schizophrenia, the metabolic syndrome and diabetes. *Diabet Med* 21: 515-523.

Ikemoto S (2002). Ventral striatal anatomy of locomotor activity induced by cocaine, D-amphetamine, dopamine and D₁/D₂ agonists. *Neuroscience* 113: 939-955.

Johnsen E and Jorgensen HA (2008) Effectiveness of second generation antipsychotics: a systematic reviews of randomized trials. *BMC Psychiatry* 8: 31-44.

Jones CA and McCreary AC (2008) Serotonergic approaches in the development of novel antipsychotics. *Neuropharm* 55: 1056-1065.

Kapur S and Remington G (1996) Serotonin dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* 153: 466-476.

Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Daves JM (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373: 31-41.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Marek G, Merchant K (2005) Developing therapeutics for schizophrenia and other psychotic disorders. *NeuroRX* 2: 579-589.

Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1159-72.

Menegatti R, Cunha AC, Ferreira VF, Pereira EFR, El-Nawabi A, Eldefrawi AT, Albuquerque EX, Neves G, Rates SMK, Fraga CAM, Barreiro EJ (2003) Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D₂ receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 11: 4807-4813.

Millan MJ, Schreiber R, Dekeyne A, Rivet JM, Bervoets K, Mavridis M, Sebban C, Maurel-Remy S, Newman-Tancredi A, Spedding M, Muller O, Lavielle G, Brocco M (1998). S 16924 ((R)-2-[1-[2-(2,3-dihydro-benzo[1,4]dioxin-5-yloxy)-ethyl]-pyrrolidin-3yl]-1-(4-fluoro-phenyl)-ethanone), a novel, potential antipsychotic with marked serotonin 5-HT_{1A} agonist properties: II. Functional profile in comparison to clozapine and haloperidol. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1356-1373.

Millan MJ (2000) Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)_{1A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 853-61.

Moore NC and Gershon S (1989). Which atypical antipsychotics are identified by screening tests? *Clin Neurophar* 12: 167-84.

Neves G, Fenner R, Heckler AP, Viana AF, Tasso L, Menegatti R, Fraga CAM, Barreiro EJ, Dalla Costa T, Rates SMK (2003) Dopaminergic profile of new heterocyclic N-phenylpiperazine derivatives. *Braz J Med Biol Res* 36: 625-629.

Neves G, Kliemann M, Betti AH, Conrado DJ, Tasso L, Fraga, CAM, Barreiro EJ, Dalla Costa T, Rates SMK (2008) Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the N-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 23-30.

Newman-Tancredi A, Gavaudan S, Conte C, Chaput C, Touzard M, Verrièle L, Audinot V, Millan MJ (1998). Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]-GTPγS binding study. *Eur J Pharmacol* 355: 245-256.

Newman-Tancredi A, Assié MB, Leduc N, Ormière AM, Danty N, Cosi C (2005) Novel antipsychotics activate recombinant human and native rat serotonin 5-HT_{1A} receptors: affinity, efficacy and potential implications for treatment of schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol* 8: 341-356.

Owens DGC (1996) Adverse effects of antipsychotic agents: do newer agents offer advantages? *Drugs* 51: 895-930.

Park WK, Jeong D, Cho H, Lee SJ, Cha MY, Pae AN, Choi KI, Koh HY, Kong JY (2005) KKHA-761, a potent D₃ receptor antagonist with high 5-HT_{1A} receptor affinity, exhibits antipsychotic properties in animal models of schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 361-372.

Prinssen EP, Kleven MS, Koek W (1998). The cataleptogenic effects of the neuroleptic nemonapride are attenuated by its 5-HT_{1A} receptor agonist properties. *Eur J Pharmacol* 356: 189-192.

Puech AJ, Frances H, Simon P (1978). Imipramine antagonism of apomorphine-induced hypothermia: a non-dopaminergic interaction. *Eur J Pharmacol* 47: 125-127.

Reynolds GP (2004). Receptor mechanisms in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 18: 340-345.

Roth BL, Sheffler DJ, Kroese WK (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nature Rev Drug Discov* 3: 353-359.

Salmi P (1998). Independent roles of dopamine D₁ and D_{2/3} receptors in rat thermoregulation. *Brain Res* 781: 188-193.

Sangberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman, A (1988) The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci* 102: 748-759.

Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo LA, Liu LX, Sibley DR, Roth BL, Mailman R (2003) Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacol* 28: 1400-1411.

Sorge S, Pollmächer T, Lancel M (2004). Clozapine alters sleep-wake behavior in rats. *Neuropsychopharmacol* 29: 1462-1469.

Strange PG (2008) Antipsychotic drug action: antagonism, inverse agonism or partial agonism. *Trends Pharmacol Sci* 29: 314-321.

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah, HA (2008a) Schizophrenia, "just the facts". What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 102: 1-18.

Tandon R, Belmaker RH, Gattaz WF, Lopez-Ibor Jr JJ, Okasha A, Singh B, Sein DJ, Olie J-P, Fleischhacker WW, Moeller H-J (2008b). World psychiatric association pharmacopsychiatry section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 100: 20-38.

Weiss JM and Kilts CD (1998). Animal models of depression and schizophrenia. In: Schatzberg A F and Nemeroff C B (1998). *Textbook of Psychopharmacology* 2nd ed. American Psychiatric Press, Washington.

Wong AH, Van Tol HH (2003) Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 269-306.

Table 1. Affinities of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 for D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Clozapine and aripiprazole were used as reference drugs.

Substance	K _i (μM)					
	D ₂ -like	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	Ratio D ₂ /5-HT _{1A}	Ratio D ₂ /5-HT _{2A}	Ratio 5-HT _{1A} /5-HT _{2A}
LASSBio-579	0.11	0.093	2.2	1.2	0.05	0.042
LASSBio-580	0.73	0.49	5.7	1.5	0.13	0.086
LASSBio-581	0.95	1.2	11	0.79	0.086	0.11
Clozapine	0.12	0.38	0.014	0.31	8.6	27
Aripiprazole	0.0010	0.0004	0.007	2.5	0.14	0.057

Table 2. Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 (30 and 60 mg/kg v.o.) in the catalepsy test (n=10). Clozapine and haloperidol were used as reference drugs

Treatment		Catalepsy (s)		
		30 min	60 min	90 min
Vehicle		1.8 ± 1.1	2.7 ± 2.9	2.4 ± 2.6
LASSBio-579	30 mg/kg	3.9 ± 2.7	13.4 ± 19.2	10.5 ± 9.2
	60 mg/kg	5.4 ± 4.7	16.5 ± 26.3	32.1 ± 43.0
LASSBio-580	30 mg/kg	5.4 ± 10.0	2.2 ± 2.5	8.0 ± 11.8
	60 mg/kg	7.2 ± 12.7	2.6 ± 4.5	3.6 ± 5.8
LASSBio-581	30 mg/kg	2.8 ± 1.6	10.3 ± 9.2	24.2 ± 24.8
	60 mg/kg	3.2 ± 3.4	6.3 ± 7.3	8.8 ± 11.0
Clozapine	15 mg/kg	23.4 ± 36.5	12.0 ± 8.1	3.5 ± 8.7
Haloperidol	4 mg/kg	54.4 ± 68.2**	89.7 ± 79.1***	105.0 ± 75.9***

Data are expressed as mean ± S.D. Two-way repeated measure ANOVA (treatment factor $F_{8,269}=11.620$ $P<0.001$; time factor $F_{2,269}=5.537$ $P=0.006$; treatment x time interaction $F_{16,269}=2.608$ $P=0.001$): different from vehicle+vehicle group at the same time of measure in post-hoc test, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$.

Table 3. Effect of LASSBio-579 on the sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.) sleeping time. Haloperidol and clozapine were used as reference drug.

Treatment		Latency to sleep ^a (min)	Sleep duration ^b (min)
Vehicle (n=10)		4.5 (4.0 – 5.0)	29.5 (24.0 – 50.0)
LASSBio-579 (n=10)	30 mg/kg	4.0 (3.0 – 5.0)	56.5 (45.0 – 91.0)
	60 mg/kg	4.0 (3.0 – 5.0)	64.0 (57.0 – 68.0)
Clozapine (n=10)	15 mg/kg	3.0 (3.0 – 4.0)	72.0 (56.0 – 83.0)*
Haloperidol (n=9)	4 mg/kg	3.0 (3.0 – 4.3)	80.0 (56.8 – 81.3)*

^a Data are expressed as median and interquartile intervals. Kruskal-Wallis (H=5.855 P=0.210).

^b Data are expressed as median and interquartile intervals Kruskal-Wallis (H=18.542, P<0.001). Different from vehicle group at Dunn's post-hoc test *P<0.05.

Figure legends

Fig 1 Competition curves of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 for D₂-like (0.1 nM [³H]-YM-09151-2), 5-HT_{1A} (1 nM [³H]-8-OH-DPAT) and 5-HT_{2A} (1 nM [³H]-ketanserin) receptors. The curves were drawn using the parameters fitted by non-linear regression analysis using the model of a single class of independent binding sites. Each point represents the mean obtained from one experiment performed in triplicate

Fig 2 Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 (15 mg/kg p.o.) on the apomorphine-induced climbing behavior. Clozapine (15 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean + S.E.M. (n= 8-12). ANOVA (F_{9,98}=13.823, P<0.001): different from vehicle+vehicle group in post-hoc test *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; different from vehicle+apomorphine group in post-hoc test #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001

Fig 3 Effect of LASSBio-579, LASSBio-580 and LASSBio-581 (15 mg/kg p.o.) on the apomorphine-induced hypothermia. Haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) was used as reference drug. Data are expressed as mean + S.E.M (n=10). Two-way repeated measures ANOVA (treatment factor F_{5,119}=10.252 P<0.001; time factor F_{1,119}=12.317 P<0.001; treatment x time interaction F_{5,119}=1.550 P=0.190): different from vehicle+vehicle group at the same time of measure in post-hoc test *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; different from vehicle+apomorphine group at the same time of measure in post-hoc test #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001

Fig 4 Effect of different doses of LASSBio579 p.o. in the apomorphine-induced climbing test. Data are expressed as mean + S.E.M. (n=8-12). ANOVA (F_{9,99}=10.783, P<0.001): different from vehicle+vehicle group in post-hoc test *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; different from vehicle+apomorphine group in post-hoc test #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001

Fig 5 Effect of LASSBio-579 on locomotor activity of mice (n=8-12). A) Crossing number. Data are expressed as median and interquartile intervals. Kruskal-Wallis (H=19.3, P<0.001). B) Rearing number. Data are expressed as median and interquartile intervals. Kruskal-Wallis (H=25.149, P<0.001). Different from vehicle group at post-hoc test ***P<0.001

Fig 6 Effect of LASSBio-579 in the rota-rod test (n=8-10). Clozapine (15 mg/kg p.o.) and haloperidol (4 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A) Maximum time of permanence. Data are expressed as mean + S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA (treatment factor F_{6,133}=4.340 P=0.001; time factor F_{1,133}=64.108 P<0.001; treatment x time interaction F_{6,133}=7.270 P<0.001). B) Number of falls. Data are expressed as mean + S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA (treatment factor F_{6,133}=6.624 P<0.001; time factor F_{1,133}=38.292 P<0.001; treatment x time interaction F_{6,133}=6.903 P<0.001). Different from vehicle+vehicle group at the same time of measure at post-hoc test, *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. Different from first measure (basal) at the same treatment group at post-hoc test #p<0.05 ##p<0.01 ###p<0.001.

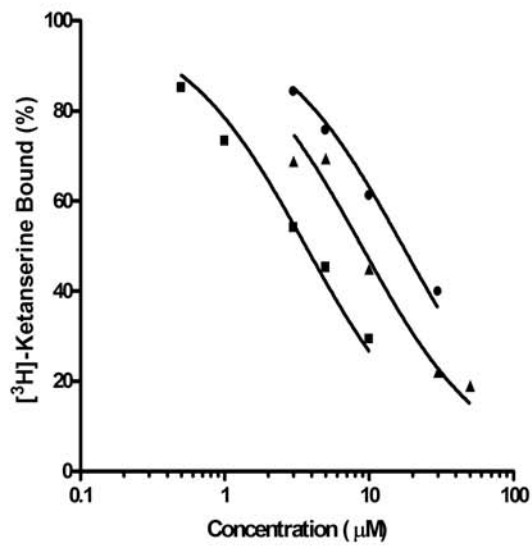
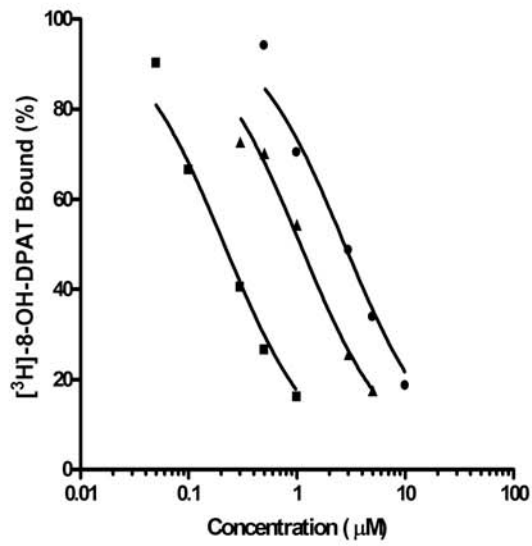
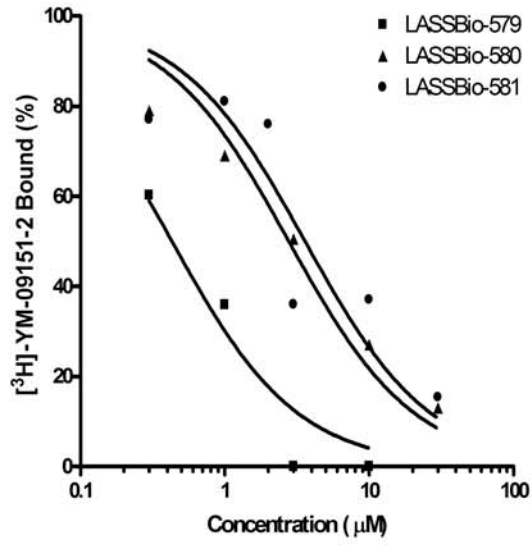


Figure 1

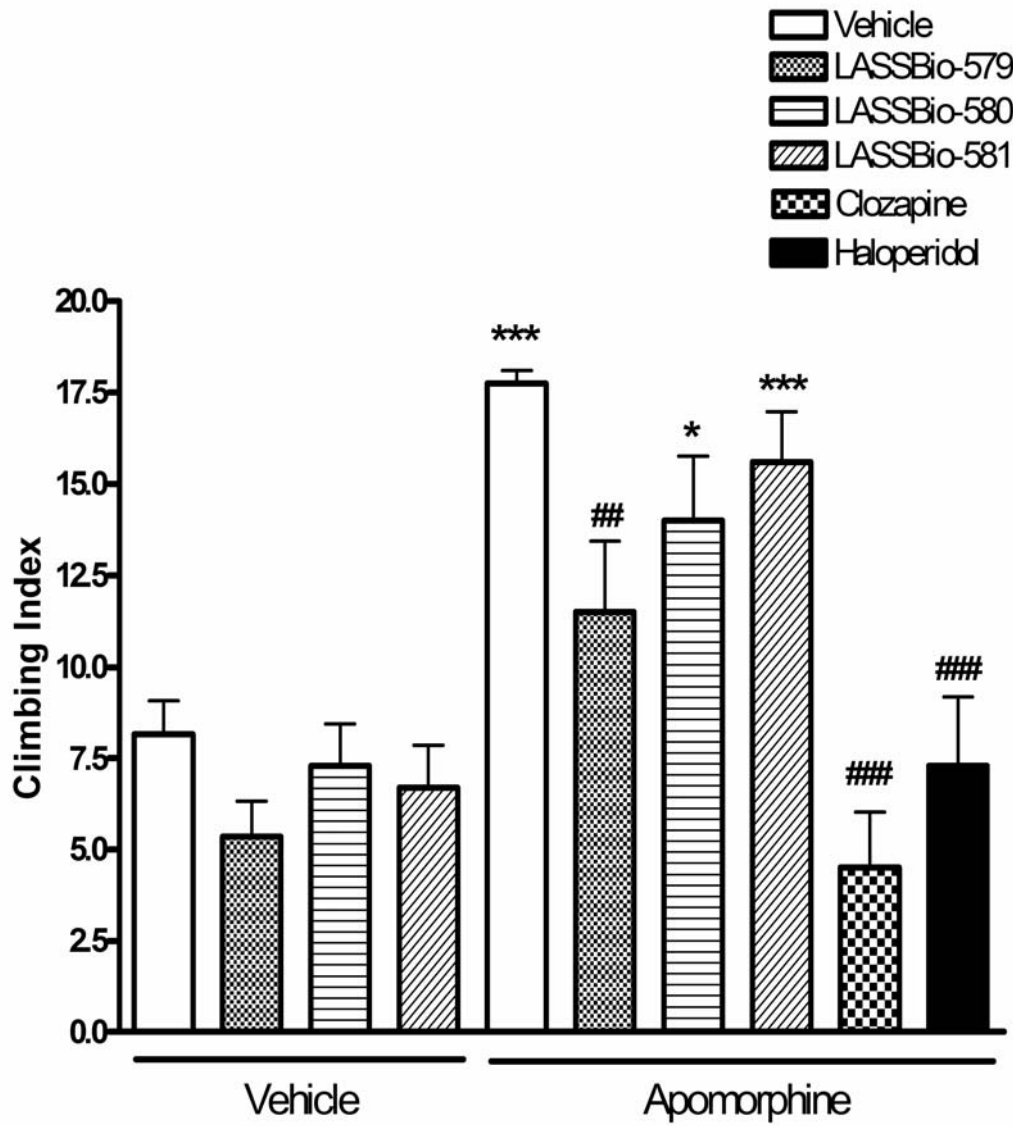


Figure 2

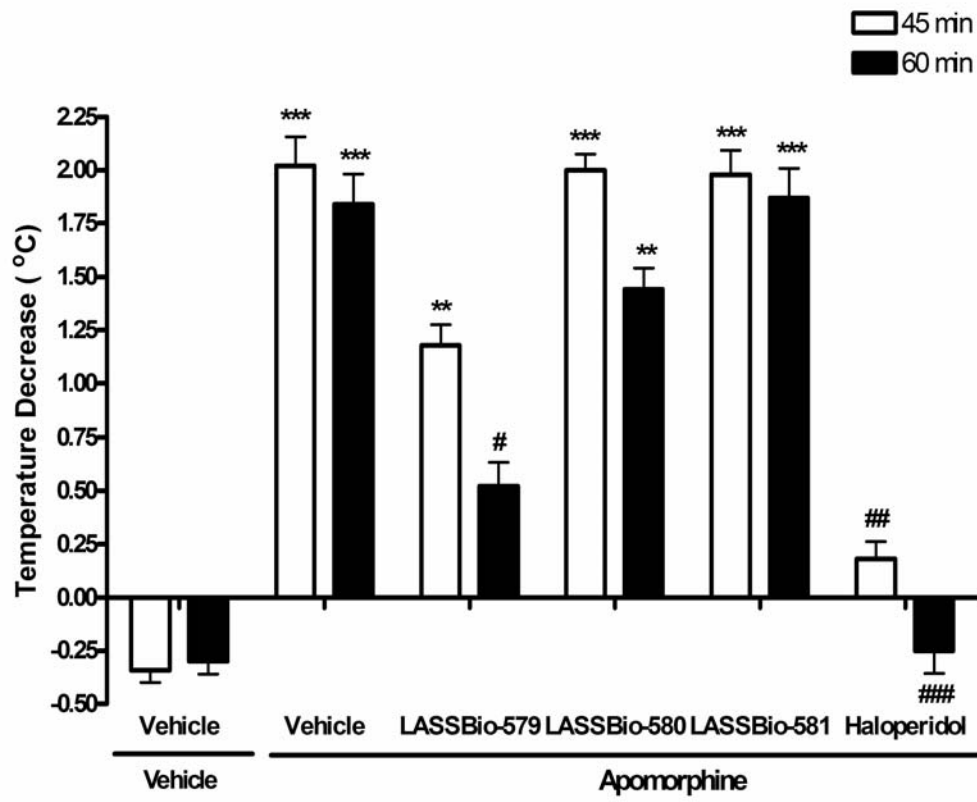


Figure 3

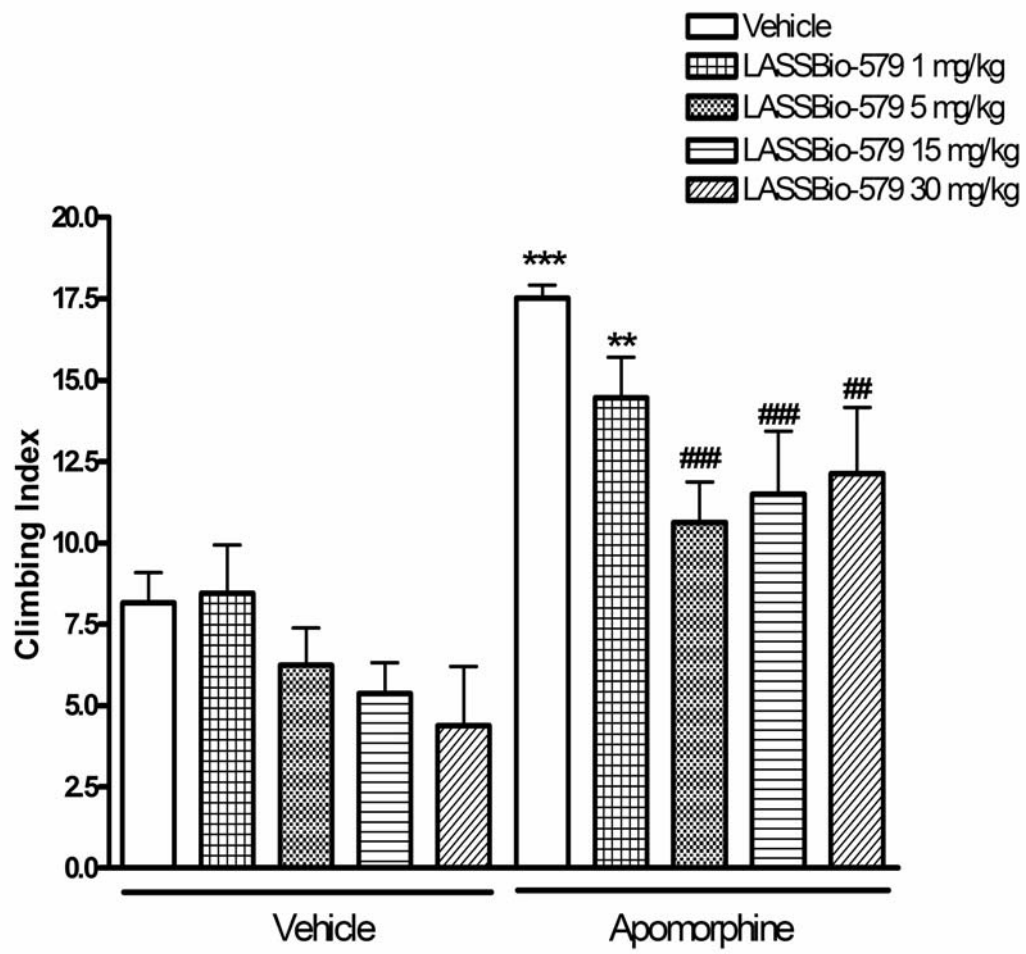


Figure 4

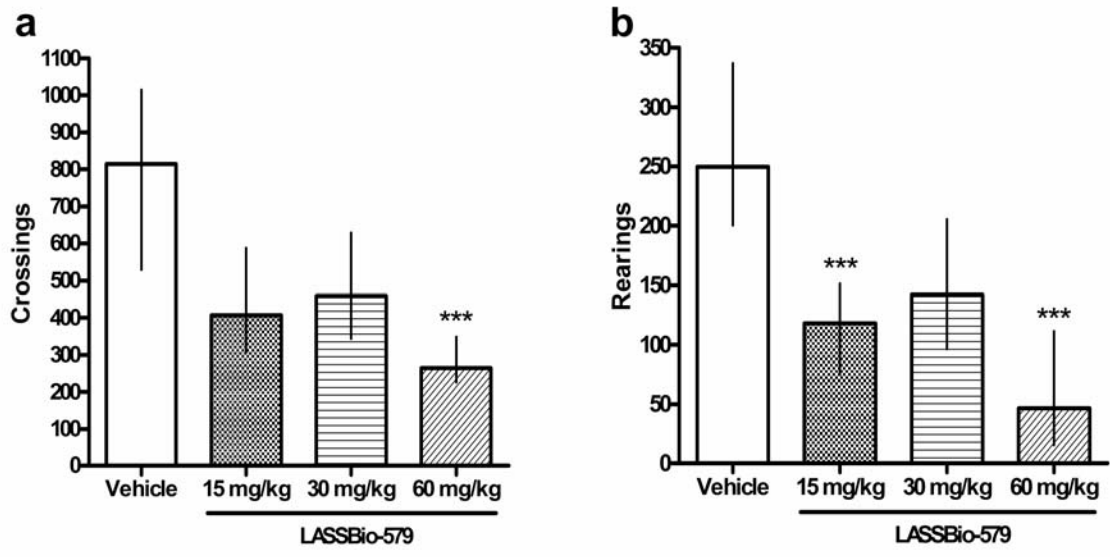


Figure 5

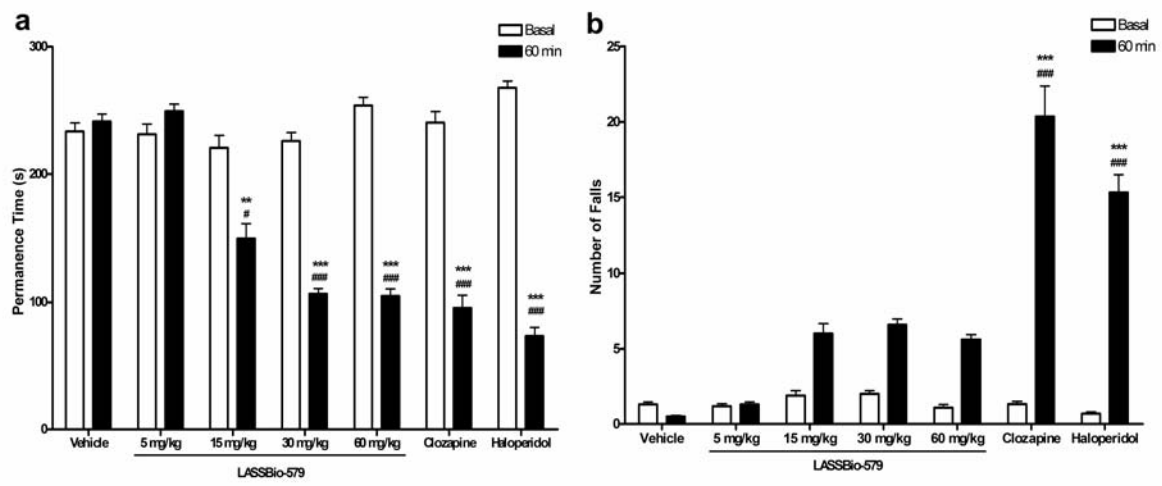


Figure 6

5. EFEITO DE LASSBio-579 SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

5.1. Introdução

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em dois grupos: metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos (mGluR) são acoplados a diferentes tipos de proteínas G e encontram-se divididos em três sub-grupos: grupo I (compreende os receptores mGluR1a-d e mGluR5a-b), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6-8). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos ativados por ligantes e também podem ser divididos em três sub-grupos de acordo com a afinidade por agonistas específicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) e kainato (MELDRUM, 2000; SANACORA *et al.*, 2008).

Dentre estes receptores, o mais amplamente expresso no SNC de mamíferos, e também o mais estudado, é o NMDA. Este receptor é formado por quatro subunidades protéicas (receptor tetramérico), sendo obrigatoriamente duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2. Este receptor forma um canal catiônico cuja condutância a íons Ca^{++} é maior que a dos demais receptores glutamatérgicos ionotrópicos. O sítio de ligação ao glutamato encontra-se na subunidade NR2, enquanto que na subunidade NR1 encontra-se o sítio de ligação do co-agonista glicina. Para ativação do receptor e conseqüente abertura do canal iônico, é necessária a ligação de duas moléculas de glutamato e duas moléculas de glicina ou D-serina, outro co-agonista endógeno (SANACORA *et al.*, 2008).

Neurônios glutamatérgicos encontram-se amplamente distribuídos pelo SNC e é necessário um controle minucioso sobre sua neurotransmissão a fim de manter um funcionamento neuronal adequado e evitar a hiperestimulação do sistema (SANACORA *et al.*, 2008). O funcionamento anormal do sistema glutamatérgico tem sido envolvido na patofisiologia de diversas desordens psiquiátricas, incluindo esclerose amiotrófica lateral, coréa de Huntington, epilepsia, doença de Alzheimer, distúrbios do humor, distúrbios de ansiedade e esquizofrenia (JAVITT *et al.*, 2004).

As primeiras evidências do envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na fisiopatologia da esquizofrenia vieram da observação dos efeitos de antagonistas de receptores NMDA em humanos. O uso de fenciclidina e cetamina, ambos antagonistas não competitivos do receptor NMDA, é capaz de induzir sintomas de esquizofrenia em indivíduos saudáveis e de exacerbar as crises em pacientes esquizofrênicos e, ao contrário dos estimulantes dopaminérgicos, o quadro induzido por estes compostos apresenta o desenvolvimento tanto de sintomas positivos quanto de sintomas negativos (JENTSCH &

ROTH, 1999; TSAI & COYLE, 2002; PIETRASZEK, 2003; AALTO *et al.*, 2005). Estas observações associadas a dados obtidos em roedores conduziram à hipótese de que distúrbios na neurotransmissão glutamatérgica poderiam contribuir para o desenvolvimento dos sintomas da esquizofrenia. Mais especificamente, uma hipofunção de receptores NMDA estaria envolvida no desenvolvimento dos sintomas psicóticos, especialmente em estruturas como o córtex pré-frontal (TSAI & COYLE, 2002; PIETRASZEK, 2003; MOGHADDAM, 2004).

A partir de então o sistema glutamatérgico passou a ser encarado como um potencial alvo a ser modulado no desenvolvimento de novos antipsicóticos. Moduladores alostéricos positivos do receptor NMDA, inibidores do transportador de glicina, agonistas e moduladores alostéricos positivos de mGluR2/3 e mGluR5, antagonistas AMPA/kainato e inibidores do transporte de glutamato vem sendo avaliados como potenciais novos antipsicóticos com mecanismos de ação inovadores (PIETRASZEK, 2003; GRAY & ROTH, 2007b; MARINO *et al.*, 2008).

Além disso, um grande número de estudos pré-clínicos demonstrou que fármacos antipsicóticos de segunda geração eficazes no tratamento dos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia são capazes de inibir os efeitos e alterações comportamentais e neuroquímicos induzidos por antagonistas NMDA, sendo estes efeitos relacionados a uma modulação da neurotransmissão glutamatérgica envolvendo receptores dopaminérgicos e/ou serotoninérgicos (AGHAJANIAN & MAREK, 1999; ADAMS & MOGHADDAM, 2001; PIETRASZEK, 2003; BECKER & GRECKSCH, 2004). Por exemplo, alguns dos efeitos benéficos sobre a cognição induzidos pela clozapina podem ser explicados por sua capacidade de potenciar a neurotransmissão glutamatérgica no córtex frontal de roedores através de um mecanismo que envolve a ativação de receptores D₁ e este subtipo de receptor dopaminérgico tem sido considerado um alvo terapêutico interessante para o desenvolvimento de novos antipsicóticos com maior eficácia frente aos sintomas cognitivos da desordem (HERESCO-LEVY *et al.*, 2003; CHEN & YANG, 2002; GRAY & ROTH, 2007a). Ainda, o bloqueio de receptores D₂ ocasionado por fármacos antipsicóticos no estriado parece ser capaz de aumentar a neurotransmissão glutamatérgica nesta estrutura, um efeito considerado benéfico para o tratamento de sintomas positivos da desordem (LARUELLE *et al.*, 2005); Desta forma, substâncias capazes de modular indiretamente o sistema glutamatérgico também são interessantes para o desenvolvimento de novos antipsicóticos.

Diversas técnicas podem ser utilizadas na investigação do efeito de fármacos e substâncias protótipos sobre a neurotransmissão glutamatérgica *in vitro*. Dentre elas pode-se destacar as técnicas eletrofisiológicas, capazes de monitorar estimulação ou inibição de

diferentes sistemas neurotransmissores tanto em culturas de células isoladas quanto em fatias cerebrais. Correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura (mEPSCs) são eventos sinápticos causados pela fusão espontânea de uma vesícula sináptica à membrana do neurônio pré-sináptico, ocasionando a liberação de uma pequena quantidade de neurotransmissor (quantum). Elas podem ser observadas através da utilização de técnicas eletrofisiológicas em fixação de voltagem após o bloqueio de potenciais de ação pela adição de tetrodotoxina (TTX), um bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem. O estudo destas correntes fornece informações diretas sobre a natureza da interação entre o neurônio pós-sináptico e o neurotransmissor liberado localmente sobre este (ROPERT *et al.*, 1990; LISMAN *et al.*, 2007).

Os principais parâmetros avaliados neste tipo de análise são a amplitude e a frequência de eventos registrados em um determinado espaço de tempo. A amplitude das mEPSCs é determinada pela densidade de receptores AMPA no neurônio pós-sináptico e geralmente é encarada como uma forma de avaliar atividade pós-sináptica de substâncias. Porém, outros fatores podem alterar a amplitude de mEPSCs como a concentração de glutamato no interior das vesículas, o número de vesículas que se fundem, a forma de liberação de glutamato, distância entre o local da sinapse e o corpo celular, entre outras (ROPERT *et al.*, 1990; BOURON, 2001; LISMAN *et al.*, 2007). Já a frequência de mEPSCs é determinada principalmente pela frequência na fusão de vesículas e pelo número de sinapses existentes. Desta forma, uma alteração neste parâmetro está diretamente relacionada a mecanismos pré-sinápticos que culminem em um aumento ou diminuição da liberação do neurotransmissor, embora algumas alterações no neurônio pós-sináptico (como o número de receptores presentes, dessensibilização) possam alterar este parâmetro (AGHAJANIAN & MAREK, 1999; BOURON, 2001).

5.2. Objetivo

Avaliar o efeito de LASSBio-579 sobre a neurotransmissão glutamatérgica em neurônios isolados de hipocampo de ratos através da técnica de *whole-cell patch clamp*.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Cultura de células

Neurônios de hipocampo de rato foram preparados em cultura primária de células dissociadas como previamente descrito (CASTRO *et al.*, 1999). Ratas Wistar com 18-20 dias de gestação foram sacrificadas em câmara de CO₂, os fetos foram retirados e seus hipocampos rapidamente dissecados. As estruturas foram picadas e tripsinizadas por 25 minutos. A tripsinização foi interrompida por lavagens sucessivas em meio com soro, as células foram imediatamente dissociadas e semeadas em placas de 35 mm previamente recobertas com poli-L-lisina. As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) com sais de Earle (Invitrogen) suplementado com D-glicose 5 g/L (Sigma), glutamina 1 mM (Sigma), bicarbonato de sódio 3,7 g/L (Sigma) e 10% de soro eqüino (Laborclin), em estufa a 35°C com 10% de CO₂. A proliferação de células não neurais foi inibida pela adição de 7 µg/mL de uridina (Sigma) e 14 µg/mL de 5-flúor-desoxiuridina (Sigma) no 7º dia após o plaqueamento. Culturas foram utilizadas de 15 a 30 dias após o plaqueamento.

5.3.2. *Whole-Cell Patch-Clamp*

Os registros de correntes iônicas em neurônios isolados foram realizados em sistemas que incluem amplificador de *patch-clamp* (Axopatch 200A, Axon Instruments, E.U.A.), microscópio invertido (Nikon Diaphot), micromanipuladores, interface A/D, e microcomputador. Todos os registros foram realizados com fixação de voltagem (*voltage clamp*) a -70 mV, com correção do potencial de junção líquida. As correntes foram filtradas a 3 kHz e digitalizadas com utilização do software pClamp 6.0 (Axon Instruments).

A solução externa padrão (SEP) foi composta de NaCl 165 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, D-glicose 10 mM, HEPES 5 mM e ≈2 mM NaOH, pH 7,3. Esta solução substituía o meio de cultura cerca de 20 min antes do início dos registros e era continuamente perfundida na cultura num fluxo de aproximadamente 1 mL/min. Micropipetas foram feitas com capilares de vidro borossilicato em um *puller* horizontal (P-97, Sutter Instruments). A solução interna padrão (SIP) foi composta de CsCl 80 mM, CsF 80 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM e ≈26 mM CsOH, pH 7,3. Os microeletrodos apresentaram resistência entre 2 e 5 MΩ.

Correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura (mEPSCs) foram registradas na presença de bicuculina 20 μM e tetrodotoxina 150 nM, durante 150 s. As soluções teste foram perfundidas durante todo o período de registro, utilizando sistemas de perfusão de drogas ultra-rápidos de tubos paralelos (CASTRO *et al.*, 1999). Cada célula foi perfundida com solução controle (sem nenhuma droga), uma ou duas soluções teste, com intervalo de cerca de 30 s entre si. O efeito de LASSBio-579 10 μM foi avaliado na presença ou ausência dos antagonistas serotoninérgicos ketanserina 1 μM e WAY 100635 1 μM . Os registros foram iniciados 2 min após a obtenção do acesso ao meio intracelular (*whole-cell*). Os esquemas de perfusão podem ser visualizados na figura 1.

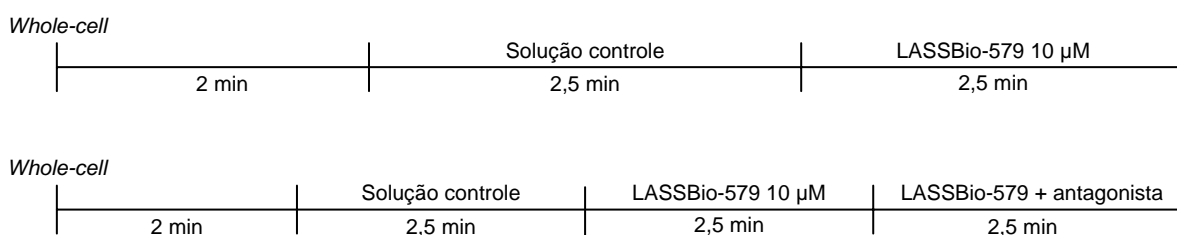


Figura 1. Esquema de perfusão utilizado para avaliar o efeito de LASSBio-579 sobre mEPSCs em neurônios de hipocampo de ratos.

5.3.3. Drogas

LASSBio-579 foi sintetizado, purificado e caracterizado pela equipe do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, UFRJ. Outras drogas utilizadas foram: metiliodeto de bicuculina, tartarato de ketanserina e cloridrato de WAY 100635, de procedência Sigma (São Paulo, SP), e tetrodotoxina (TTX) adquirida junto a Alomone Labs. Todos os compostos inorgânicos utilizados são de grau analítico.

Soluções estoque de bicuculina (10 mM), ketanserina (1 mM), TTX (300 μM) e WAY 100635 (1 mM) foram preparadas em água purificada. LASSBio-579 foi inicialmente dissolvido em DMSO anidro. Todas as soluções foram estocadas em freezer a -20°C . Para perfusão, as soluções estoque foram diluídas em SEP, não ultrapassando a concentração final de DMSO de 0,1%.

5.3.4. Análise dos dados

As amplitudes e frequência de EPSCs em cada registro foram analisadas com a utilização do software Clampfit 9.2 (Axon Instruments). Foram considerados os registros com amplitude superior ao dobro do desvio padrão do ruído da linha de base, e de rápido pico (tempo para o pico não superior a média + 2 desvios padrão do total de eventos do registro). De cada registro individual foi, então, calculada a média dos seguintes parâmetros: amplitude de evento (pA) e intervalo entre eventos (ms). Os efeitos de diferentes tratamentos perfundidos sobre a mesma célula foram analisados através de teste de Wilcoxon ou do teste de Friedman, utilizando o teste de Tukey para avaliação *post-hoc*. Estas análises foram realizadas pelo software SigmaStat 2.1 (Jandel Co.). Foi aceito o nível de significância $P < 0,05$.

5.4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com a perfusão de LASSBio-579 10 μM sobre neurônios de hipocampo de ratos podem ser visualizados na figura 2. LASSBio-579 reduziu significativamente o intervalo de tempo entre os eventos ($P=0,009$) (figura 2E). Esta redução pode ser observada no trecho de registro apresentado (figura 2A), bem como pelo deslocamento para a esquerda do histograma de frequência cumulativa (figura 2C) (dados pertencentes a uma única célula representativa do efeito global obtido). Estas alterações demonstram que LASSBio-579 induziu um aumento na frequência de mEPSCs. Na concentração testada, LASSBio-579 não alterou a amplitude das correntes (figura 2B e 2D). Considerando que um efeito seletivo sobre a frequência sem alteração na amplitude das correntes é um forte indicativo de mecanismo pré-sináptico (BOURON, 2001) pode-se afirmar que LASSBio-579 10 μM é capaz de aumentar a liberação de glutamato nas condições de ensaio especificadas.

Diversos interferentes podem levar a uma alteração na frequência de mEPSCs. Especificamente no hipocampo podemos citar alterações na atividade elétrica dos neurônios (LTP – *long term potentiation* – e LTD – *long term depression*); cátions (especialmente Ca^{2+}) e outras substâncias como ativadores de proteínas cinases, neurotrofinas e outros neurotransmissores (BOURON, 2001). Uma vez que LASSBio-579 é capaz de se ligar a receptores dopaminérgicos (D_2 -like – $\text{K}_i = 110 \text{ nM}$) e serotoninérgicos (5-HT_{1A} – $\text{K}_i = 90 \text{ nM}$,

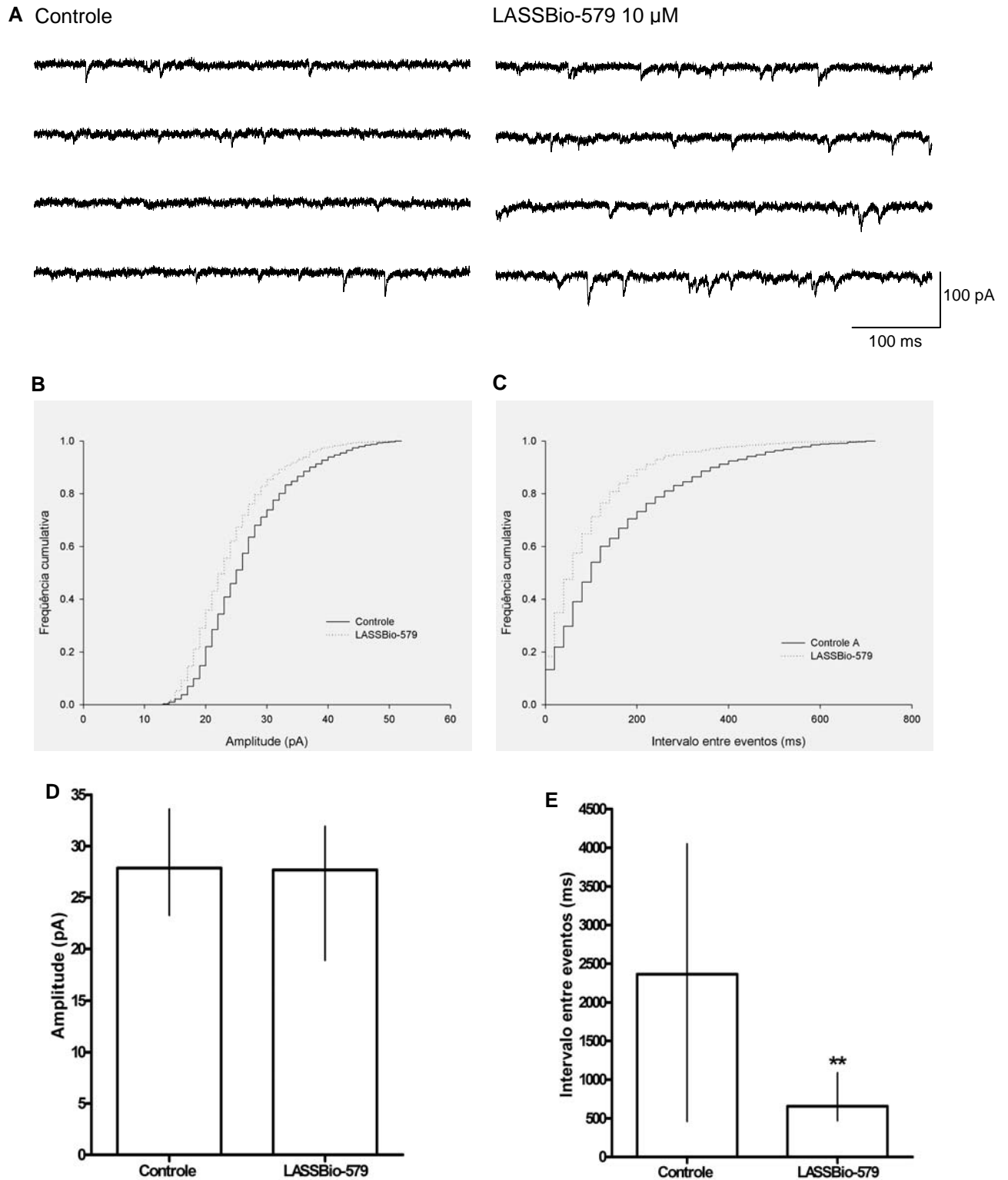


Figura 2. Efeito de LASSBio-579 sobre mEPSC em neurônios isolados de hipocampo de ratos. A) Registro contínuo das correntes glutamatérgicas em miniatura antes e durante a perfusão de LASSBio-579 10 μ M. B) Distribuição cumulativa de amplitudes de mEPSCs antes e durante a perfusão de LASSBio-579 10 μ M. Teste de Kolmogorov-Smirnov, $KS=0,69$, $P<0,001$. C) Distribuição cumulativa do intervalo entre mEPSCs antes e durante a perfusão de LASSBio-579 10 μ M. Os registros correspondem a uma mesma célula representativa do resultado geral obtido. Teste de Kolmogorov-Smirnov, $KS=0,88$, $P<0,001$. D) Amplitude de mEPSCs ($n=14$). Teste de Wilcoxon, $W=-41,0$; $P=0,271$. E) Intervalo entre eventos ($n=14$). Teste de Wilcoxon, $W=-81,0$; $P=0,009$. ** diferença significativa em relação a situação controle.

5-HT_{2A} – Ki = 2,2 µM) (NEVES *et al.*, 2009), é de especial interesse a influência destes sistemas neurotransmissores sobre a liberação de glutamato.

A dopamina é capaz de modular a liberação de glutamato de diferentes formas no sistema nervoso central, de acordo com o subtipo de receptor envolvido. No hipocampo de ratos são encontrados tanto receptores D_{1-like} quanto D_{2-like} em baixa densidade (BOYSON *et al.*, 1986). SKF-38393 (agonista de receptores D_{1-like}) é capaz de aumentar a frequência de mEPSCs em neurônios de hipocampo de rato, sem alterar a amplitude das mesmas. Este mesmo agonista apresenta um efeito diferenciado sobre correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (sEPSC), uma vez que induz um aumento da frequência e uma redução da amplitude das mesmas (BOURON & REUTER, 1999). Assim, pode-se concluir que a ativação de receptores D_{1-like} leva a um aumento da liberação de glutamato em neurônios de hipocampo.

Em experimento realizado em fatias de hipocampo, dopamina em diferentes concentrações foi capaz de reduzir a amplitude de potenciais excitatórios pós-sinápticos evocados (eEPSP) em neurônios da região CA1. Este efeito parece ser mediado pela ativação de receptores D_{2-like} de localização pré-sináptica, uma vez que foi bloqueado pela co-administração de sulpirida e reproduzido pela perfusão de um agonista de receptores D_{2-like} (HSU *et al.*, 1996). Além disso, dopamina é capaz de reduzir a frequência de mEPSCs em neurônios da área tegmentar ventral, sem alterar a amplitude das mesmas, sendo este efeito também mediado pela ativação de receptores D_{2-like} de localização pré-sináptica (KOGA & MOMIYAMA, 2000). Assim, a ativação de receptores D_{2-like} parece possuir um efeito inibitório sobre neurotransmissão glutamatérgica.

Uma vez que LASSBio-579 na concentração testada não é capaz de se ligar a receptores D₁ (MENEGATTI *et al.*, 2003) e que o efeito esperado da ativação receptores D₂ é o oposto do induzido por esta substância neste trabalho, parece improvável que receptores D₁ ou D₂ tenham mediado o aumento de frequência de mEPSCs. Optou-se pela avaliação do potencial envolvimento de receptores serotoninérgicos no efeito observado. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 3.

Receptores 5-HT_{1A} são encontrados em alta densidade no hipocampo de roedores, especialmente no giro denteado e na região CA1 (DUNCAN *et al.*, 1998). A perfusão tanto de serotonina (100 µM) quanto de 8-OH-DPAT (50 µM) é capaz de reduzir a amplitude e eEPSPs em neurônios da região CA1 em fatias. Este efeito é seletivamente bloqueado pela perfusão de WAY 100635, um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, e parece ser mediado por

um mecanismo pré-sináptico (SCHMITZ *et al.*, 1995; PUGLIESE *et al.*, 1998). Além disso, Schmitz e colaboradores (1998) relataram uma diminuição da frequência sem alteração na amplitude de mEPSCs em neurônios do córtex entorrinal de ratos, e Cai e colaboradores (2002) demonstraram uma diminuição tanto da frequência quanto da amplitude de mEPSCs pela presença de 8-OH-DPAT (20 μ M) em cultura de neurônios isolados e em fatias de córtex frontal de ratos. Todos estes resultados demonstram que a ativação de receptores 5-HT_{1A} é capaz de inibir a liberação de glutamato em diferentes estruturas do sistema nervoso central de roedores. Nos experimentos realizados com a co-administração de LASSBio-579 e WAY 100635, não foi observada uma redução significativa no intervalo entre as mEPSCs induzida por LASSBio-579 (Figura 3). Este fato pode ser explicado pela grande variação experimental obtida e provavelmente seria contornado com o aumento do número de células analisadas. Assim, os resultados destes experimentos são inconclusivos, não sendo possível afirmar ou descartar o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no efeito apresentado por LASSBio-579.

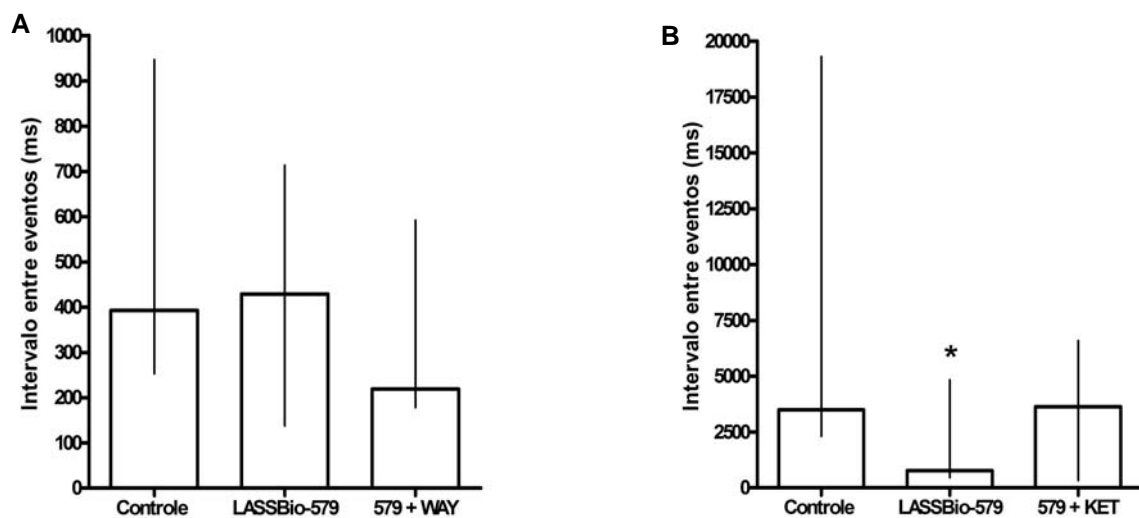


Figura 3. Efeito de antagonistas de receptores de serotonina sobre o aumento na frequência de mEPSCs induzido por LASSBio-579 10 μ M em neurônios isolados de hipocampo de ratos. A) WAY 100635 1 μ M (n=04). Teste de Friedman, Qui-Quadrado₂=3,714; P=0,192. B) Ketanserina 1 μ M (n=07). Teste de Friedman, Qui-Quadrado₂=2,000; P=0,029. * diferença significativa em relação a situação controle (P<0,05)

Por outro lado, uma clara tendência à reversão do efeito de LASSBio-579 foi observada com a co-perfusão de ketanserina 1 μ M, um antagonista de receptores 5-HT_{2A} (Figura 3B). Autorradiografia com um ligante seletivo inicialmente indicou que este subtipo de receptor serotoninérgico é encontrado apenas na região CA3 do hipocampo de ratos e numa densidade relativamente menor em comparação aos receptores 5-HT_{1A} (LOPEZ-GIMENEZ *et al.*, 1997). Posteriormente, a imunomarcagem revelou a presença de receptores

5-HT_{2A} em toda a formação hipocampal do rato, nas células da camada piramidal e nos principais subtipos de interneurônios GABAérgicos (LÜTTGEN *et al.*, 2004). Os aferentes serotoninérgicos da rafe fazem contato principalmente com estes interneurônios GABAérgicos (GULYÁS *et al.*, 1999). Porém, não foram encontrados dados na literatura sobre a influência de receptores 5-HT_{2A} sobre a neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo de roedores. Muitos estudos foram realizados em neurônios de regiões corticais, onde estes receptores são encontrados em alta densidade (LOPEZ-GIMENEZ *et al.*, 1997) e possuem um importante papel em funções cognitivas (HARVEY, 2003; TERRY JR *et al.*, 2008). Aghajanian & Marek (1997) demonstraram um aumento da frequência de sEPSCs induzidas por serotonina (100 µM) em neurônios piramidais de córtex frontal de ratos em fatias, efeito este revertido seletivamente pela co-administração de um antagonista 5-HT_{2A}. Estudos complementares levaram à proposição de um mecanismo através do qual a ativação de receptores 5-HT_{2A} de localização pré-sináptica levaria a um aumento na liberação de glutamato (AGHAJANIAN & MAREK, 1999). Um aumento na frequência de mEPSCs induzido por DOI (10 µM) em neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo foi demonstrado por Ho e colaboradores (2007), enquanto Hasuo e colaboradores (2002) encontraram um aumento na frequência de mEPSPs induzido pela ativação de receptores 5-HT_{2A} em neurônios do núcleo septal de ratos em fatias. Desta forma, é provável que o aumento na liberação de glutamato induzido por LASSBio-579 seja mediado pela ativação de receptores 5-HT_{2A}.

Ensaio *in vivo* demonstraram que LASSBio-579 (15, 30 e 60 mg/kg *i.p.*) não induz o desenvolvimento de *head-twitches* e *ear-scratches* em roedores (NEVES *et al.*, 2008), dois comportamentos diretamente relacionados a ativação de receptores 5-HT_{2A} (DARMANI *et al.*, 1990a; 1990b). Ao contrário, esta substância é capaz de bloquear a indução destes comportamentos pelo tratamento com (±)-DOI, um agonista 5-HT_{2A/C} (NEVES *et al.*, 2008). Estes resultados aparentemente conflitantes podem ser explicados pela interação funcional existente entre receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e que geralmente resulta em efeitos antagônicos. Por exemplo, a ativação de receptores 5-HT_{1A} em ratos leva a uma diminuição da temperatura corporal (MILLAN *et al.*, 1993), enquanto um efeito hipertérmico pode ser observado pela ativação de receptores 5-HT_{2A} (MAZZOLA-POMIETO *et al.*, 1995). Neste contexto, além de antagonistas de receptores 5-HT_{2A}, agonistas 5-HT_{1A} também são capazes de inibir o desenvolvimento de *head-twitches* (DARMANI *et al.*, 1990a). Além disso, LASSBio-579 é capaz de induzir hipotermia em camundongos que é completamente bloqueada pela pré-administração de WAY 100635 (NEVES *et al.*, 2008). Considerando a maior afinidade apresentada por LASSBio-579 para receptores 5-HT_{1A} do que 5-HT_{2A} (NEVES *et al.*, 2009) é possível afirmar que *in vivo* a ativação de receptores 5-HT_{1A} seja

superior e que os efeitos advindos desta acabem sobrepujando e/ou mascarando qualquer efeito comportamental induzido pela ativação de receptores 5-HT_{2A}.

Trabalhos anteriores demonstraram que LASSBio-579 10 µM induziu uma diminuição tanto da frequência quanto da amplitude de sEPSCs em neurônios isolados de hipocampo de rato (MENEGATTI *et al.*, 2003). A principal diferença entre o ensaio realizado por Menegatti e colaboradores (2003) e o realizado neste trabalho consiste na utilização de TTX para o bloqueio dos potenciais de ação. Na ausência de TTX, as EPSCs podem sofrer a influência de um número maior de neurônios que não façam sinapse diretamente com o neurônio que está sendo registrado. Assim, o efeito encontrado resulta da ação da substância em questão sobre o circuito neural da cultura como um todo. Por exemplo, um efeito potenciador direto nas sinapses glutamatérgicas localizadas sobre interneurônios GABAérgicos pode levar a uma diminuição paradoxal da frequência de sEPSCs de todo o circuito. Além disso, neurônios mais distantes daquele no qual se está realizando o registro não se encontram em fixação de concentração, ou seja, não há como garantir que estes estejam sofrendo a ação de uma concentração fixa das substâncias perfundidas. Desta forma, é possível que se encontre efeitos diferenciados entre os registros de sEPSCs e mEPSCs, especialmente quando avaliado o efeito de uma substância com perfil multireceptor, como é o caso de LASSBio-579. A elucidação de qual o efeito predominante desta substância sobre a liberação de glutamato no hipocampo merece ser mais profundamente investigada.

Além disso, Menegatti e colaboradores (2003) concluem que o efeito inibitório apresentado por LASSBio-579 sobre a frequência e a amplitude de sEPSCs seria mediado pela ativação de receptores D₂, uma vez que este foi completamente revertido pela co-administração de espiperona 10 µM. Porém, a espiperona na concentração utilizada é capaz de bloquear não apenas a receptores D₂ (K_i = 0,5 nM), mas também 5-HT_{2A} (K_i = 1,8 nM) e atua como um agonista inverso de receptores 5-HT_{1A} (K_i = 58 nM) (METWALLY *et al.*, 1998; MCLOUGHLIN & STRANGE, 2000). Considerando a alta densidade de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo (DUNCAN *et al.*, 1998), a afinidade (K_i = 90 nM) e a provável ação agonista de LASSBio-579 sobre receptores 5-HT_{1A} (NEVES *et al.*, 2008; NEVES *et al.*, 2009), bem como os dados anteriormente discutidos a respeito da influência deste subtipo de receptor serotoninérgico sobre a neurotransmissão glutamatérgica, não se pode descartar que o efeito observado seja mediado pela ativação de receptores 5-HT_{1A} e não D₂. Experimentos adicionais são necessários para melhor elucidar esta questão.

Por fim, a ausência de demonstração de um efeito de LASSBio-579 mediado por receptores 5-HT_{1A} *in vitro* em nossas condições experimentais não invalida a observação da

ação agonista 5-HT_{1A} desta substância *in vivo* anteriormente demonstrada (NEVES *et al.*, 2008). Receptores 5-HT_{1A} apresentam localização tanto pré-sináptica, atuando como autorreceptores, como pós-sináptica. Os ensaios eletrofisiológicos realizados com LASSBio-579 são capazes de detectar apenas atividade de substâncias sobre receptores serotoninérgicos de localização pré-sináptica, enquanto que o efeito hipotérmico induzido 8-OH-DPAT e outros agonistas 5-HT_{1A} ocorre via ativação de receptores pós-sinápticos no hipotálamo de roedores (MILLAN *et al.*, 1993).

O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico diretamente envolvida em processos de memória e aprendizagem. Estudos têm demonstrado que esta estrutura pode estar envolvida no desenvolvimento de prejuízos cognitivos relacionados à esquizofrenia. Estudos histopatológicos apontam diferentes alterações no hipocampo de pacientes esquizofrênicos, incluindo uma diminuição no volume e alterações do formato desta estrutura. Estudos *postmortem* também revelaram uma diminuição no número de neurônios piramidais nas regiões CA1 e CA3 e na densidade de receptores AMPA/kainato (BOYER *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento crônico com antipsicóticos atípicos leva a uma diminuição no número de receptores NMDA e a um aumento do número de receptores D₂ nesta estrutura (TARAZI *et al.*, 2001; 2003). Alterações nos níveis de dopamina e acetilcolina no hipocampo ventral parecem contribuir para a eficácia superior da clozapina no tratamento de sintomas cognitivos quando comparada a antipsicóticos de primeira geração, como o haloperidol (CHUNG *et al.*, 2004). Porém, tanto o papel do hipocampo quanto o envolvimento de alterações nos níveis de glutamato nesta estrutura no mecanismo de ação de antipsicóticos necessitam de maiores estudos.

Por outro lado, um aumento nos níveis de glutamato no hipocampo de roedores e não-roedores tem sido relacionado aos efeitos pró-cognitivos de diferentes ligantes de receptores serotoninérgicos. Lecozotan, um antagonista de receptores 5-HT_{1A} atualmente em fase II de desenvolvimento clínico para o tratamento de distúrbios de memória associados a doença de Alzheimer, é capaz de induzir um aumento na liberação de glutamato no giro denteado e esta ação contribui para os efeitos benéficos desta substância sobre processos cognitivos (SCHECHTER *et al.*, 2005; CHILDERS *et al.*, 2007, TERRY JR *et al.*, 2008). Assim como lecozotan, a administração sistêmica de outros antagonistas 5-HT_{1A} é capaz de facilitar a performance cognitiva de animais por um mecanismo que envolve a estimulação da neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo (MADJID *et al.*, 2006; TERRY JR *et al.*, 2008).

Neste contexto, a elucidação do efeito predominante de LASSBio-579 *in vivo* sobre a liberação de glutamato no hipocampo e em outras estruturas do sistema nervoso central de roedores (especialmente o córtex frontal) pode fornecer subsídios a respeito da potencial eficácia desta substância no tratamento de déficits cognitivos.

5.5. Conclusão

LASSBio-579 é capaz de induzir um aumento na liberação sináptica espontânea de glutamato em neurônios de hipocampo de rato em cultura. Este aumento parece ser mediado pela ativação de receptores 5-HT_{2A}. Estudos complementares são necessários para melhor elucidar o provável efeito de LASSBio-579 sobre a neurotransmissão glutamatérgica, bem como seu potencial envolvimento num perfil farmacológico pré-clínico promissor para o tratamento de sintomas cognitivos da esquizofrenia.

5.6. Referências bibliográficas

AALTO, S.; IBALAINEN, J.; HIRVONEN, J.; KAJANDER, J.; SCHEININ, H.; TANILA, H.; NAGREN, K.; VILKMAN, H.; GUSTAFSSON, L.L.; SYVÄLAHTI, E.; HIETALA, J. Cortical glutamate-dopamine interaction and ketamine-induced psychotic symptoms in man. **Psychopharmacology** 182 (3): 375-383, 2005.

ADAMS, B.W. & MOGHADDAM, B. Effect of clozapine, haloperidol or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. **Biological Psychiatry** 50: 750-7, 2001.

AGHAJANIAN, G.K. & MAREK, G.J. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. **Neuropharmacology** 36: 589-599, 1997.

AGHAJANIAN, G.K. & MAREK, G.J. Serotonin-glutamate interactions: a new target for antipsychotic drugs. **Neuropsychopharmacology** 21 (S6): S122-S133, 1999.

BECKER, A. & GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible model of schizophrenia. Test of predictive validity. **Progress in Neuropharmacology and Biological Psychiatry** 28 (8): 1267-77, 2004.

BOURON, A. & REUTER, H. The D1 dopamine receptor agonist SKF-38393 stimulates the release of glutamate in the hippocampus. **Neuroscience** 94 (4): 1063-1070, 1999.

BOURON, A. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. **Progress in Neurobiology** 63: 613-635, 2001.

BOYER, P.; PHILLIPS, J.L.; ROUSSEAU, F.L.; ILIVITSKY, S. Hippocampal abnormalities and memory deficits: new evidence of a strong pathophysiological link in schizophrenia. **Brain Research Reviews** 54: 92-112, 2007.

BOYSON, S.J.; MCGONIGLE, P.; MOLINOFF, P.B. Quantitative autoradiographic localization of the D₁ and D₂ subtypes of dopamine receptors in rat brain. **The Journal of Neuroscience** 6 (11): 3177-3188, 1986.

BROWN, T.H.; WONG, R.K.S.; PRINCE, D.A. Spontaneous miniature synaptic potentials in hippocampal neurons. **Brains Research** 177: 194-199, 1979.

CAI, X.; GU, Z.; ZHONG, P.; REN, Y.; YAN, Z. Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate AMPA receptor channels through inhibiting Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in prefrontal cortical pyramidal neurons. **Journal of Biological Chemistry** 277: 36553, 2002.

CASTRO, N.G.; MELLO M.C.; MELLO F.G.; ARACAVA Y. Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by dopamine and (+)-SKF38393. **British Journal of Pharmacology** 126 (8): 1847-1855, 1999.

CHEN, L. & YANG, C.R. Interaction of dopamine D1 and NMDA receptors mediates acute clozapine potentiation of glutamate EPSPs in rat prefrontal cortex. **Journal of Neurophysiology** 87: 2324-2336, 2002.

CHILDERS, W.E.; HARRISON, B.L.; AGOU-GHARBIA, M.A.; RAJE, S.; PARKS, V.; PANGALOS, M.N.; SCHECHTER, L.E. Lecozotan hydrochloride. **Drugs of the Future** 32 (5): 399, 2007.

CHUNG, Y.; LI, Z.; DAI, J.; MELTZER, H.Y.; ICHIKAWA, J. Clozapine increases both acetylcholine and dopamine release in rat ventral hippocampus: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. **Brain Research** 1023: 54-63, 2004.

DARMANI, N.A.; MARTIN, B.R.; PANDEY, U.; GLENNON, R.A. Do functional relationships exist between 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 36: 901-906, 1990.

DARMANI, N.A.; MARTIN, B.R.; PANDEY, U.; GLENNON, R.A. Pharmacological characterization of ear-scratch response in mice as a behavioral model for selective 5-HT₂-receptor agonists and evidence for 5-HT_{1B}- and 5-HT₂-receptor interactions. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 37: 95-99, 1990b.

DUNCAN, G.E.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R.; CREWS, F.T.; LITTLE, K.Y. Species differences in regional patterns of ³H-8-OH-DPA and ³H-zolpidem binding in the rat and human brain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 60 (2): 439-448, 1998.

GRAY, J.A. & ROTH, B.L. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** 33 (5): 1100-1119, 2007a.

GRAY, J.A. & ROTH, B.L. The pipeline and future of drug development in schizophrenia. **Molecular Psychiatry** 12: 904-922, 2007b.

GULYÁS, A.I.; ACSÁDY, L.; FREUND, T.F. Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in hippocampus. **Neurochemistry International** 34(5): 359-372, 1999

HARVEY, J.A. Role of serotonin 5-HT_{2A} receptor in learning. **Learning & Memory** 10 (5): 355-362, 2003.

HASUO, H.; MATSUOKA, T.; AKASU, T. Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine 2A receptors facilitates excitatory synaptic transmission via protein kinase C in the dorsolateral septal nucleus. **The Journal of Neuroscience** 22: 7509-7517, 2002.

HERESCO-LEVY, U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 27: 1113-1123, 2003.

HO, S.S.N.; CHOW, B.K.C.; YUNG, W. Serotonin increases the excitability of the hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons. **European Journal of Neuroscience** 25 : 2991-3000, 2007.

HSU, K.S. Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice. **Journal of Neurophysiology** 76: 1887-1895, 1996.

JAVITT, D.C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry** 9 (11): 984-997, 2004.

JENTSCH, J.D. & ROTH, R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 20 (3): 201-25, 1999.

KOGA, E. & MOMIYAMA, T. Presynaptic dopamine D₂-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. **Journal of Physiology** 523 (1): 163-173, 2000.

LARUELLE, M.; FRANKLE, G.; NARENDRAN, R.; KEGELES, L.S. ; ABI-DARGHAM, A. Mechanism of action of antipsychotic drugs : from dopamine D₂ receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. **Clinical Therapeutics** 27: S16-S24, 2005.

LISMAN, J.E.; RAGHAVACHARI, S.; TSIEN, R.W. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. **Nature Reviews Neuroscience** published on line 18 July 2007.

LÓPEZ-GIMÉNEZ, J.F.; MENGOD, G.; PALACIOS, J.M.; VILARÓ, M.T. Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]-MDL 100,907. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives on Pharmacology** 356: 446-454, 1997.

LÜTTGEN, M.; OVE OGREN, S.; MEISTER, B. Chemical identity of 5-HT_{2A} receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. **Brain Research** 1010: 156-165, 2004.

MADJID, N.; TOTTIE, E.E.; LÜTTGEN, M.; MEISTER, B.; SANDIN, J.; KUZMIN, A. ; STIEDL, O.; OGREN, S.O. 5-Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates aversive learning in mice: interaction with cholinergic and glutamatergic mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 316 (2): 581-591, 2006.

MARINO, M.J.; KNUTSEN, L.J.S.; WILLIAMS, M. Emerging opportunities for antipsychotic drug discovery in the postgenomica era. **Journal of Medicinal Chemistry** 51 (5): 1077-1107, 2008.

MAZZOLA-POMIETTO, P.; AULAKH, C.S.; WOZNIAK, K.M.; HILL, J.L.; MURPHY, D.L. Evidence that 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)-induced hyperthermia in rats is mediated by stimulation of 5-HT_{2A} receptors. **Psychopharmacology** 117 (2): 193-199, 1995.

MCLOUGHLIN, D.J. & STRANGE, P.G. Mechanisms of agonism and inverse agonism at serotonin 5-HT_{1A} receptors. **Journal of Neurochemistry** 74 (1): 347-357, 2000.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition** 130 (4S Suppl.): 1007S-15S, 2000.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; PERREIRA, E.F.R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A.T.; ALBUQUERQUE, E.X.; NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D₂ receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 11: 4807-13, 2003.

METWALLY, K.A.; DUKAT, M.; EGAN, C.T.; SMITH, C.; DUPRE, A.; GAUTHIER, C.B.; HERRICK-DAVIS, K.; TEITLER, M.; GLENNON, R.A. Spiperone: influence of spiro ring substituents on 5-HT_{2A} serotonin receptor binding. **Journal of Medicinal Chemistry** 41 (25): 5084-5093, 1998.

MILLAN, M.J.; RIVET, J.; CANTON, H.; MAROUILLE-GIRARDON, S.L.; GOBERT, A. Induction of hypothermia as a model of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated activity in the rat: a pharmacological characterization of the actions of novel agonists and antagonists. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 264 (3): 1364-1376, 1993.

MOGHADDAM, B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. **Neuron** 40 (5): 881-4, 2004.

NEVES, G.; KLIEMANN, M.; BETTI, A.H.; CONRADO, D.J.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; RATES, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 89: 23-30, 2008.

NEVES, G.; BETTI, A.H.; ANTONIO, C.B.; PRANKE, M.A.; KLIEMANN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; NOËL, F.; RATES, S.M.K. LASSBio-579: a new antipsychotic lead compound active on models of schizophrenia positive symptoms. **Psychopharmacology** (submitted), 2009.

PIETRASZEK, M. Significance of dysfunctional glutamatergic transmission for the development of psychotic symptoms. **Polish Journal of Pharmacology** 55:133-54, 2003.

PUGLIESE, A.M.; PASSANI, M.B.P.; CORRADETTI, R. Effect of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 on the inhibition of e.p.s.ps produced by 50HT in the CA1 region of rat hippocampal slices. **British Journal of Pharmacology** 124: 93-100, 1998.

ROPERT, N; MILES, R.; KORN, H. Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. **Journal of Physiology** 428: 707-722, 1990.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improve therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews Drug Discovery** 7: 426-437, 2008.

SCHECHTER, L.E.; SMITH, D.L.; ROSENZWEIG-LIPSON, S.; SUKOFF, S.J.; DAWSON, L.A.; MARQUIS, K.; JONES, D.; PIESLA, M.; ANDREE, T.; NAWOSCHIL, S.; HARDER, J.A.; WOMACK, M.D.; BUCCAFUSCO, J.; TERRY, A.V.; HOEBEL, B.; RADA, P.; KELLY, M.; ABOU-GHARBIA, M.; BARRET, J.E.; CHILDERS, W. Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 341 (3): 1274-1289, 2005.

SCHMITZ, D.; EMPSON, R.M.; HEINEMANN, U. Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. **Brain Research** 701: 249-254, 1995.

SCHMITZ, D.; GLOVELI, T.; EMPSON, R.M.; DRAGUHN A.; HEINEMANN, U. Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. **Journal of Physiology** 508: 119-129, 1998.

TARAZI, F.I.; ZHANG, K.; BALDESSARINI, R.J. Long-term effects of olanzapine, risperidone, and quetiapine on dopamine receptor types in regions of rat brain: implications for antipsychotic drug treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 297: 711-717, 2001.

TARAZI, F.I.; BALDESSARINI, R.J.; KULA, N.S.; ZHANG, K. Long-term effects of olanzapine, risperidone and quetiapine on ionotropic glutamate receptor types: implications for antipsychotic drug treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 306: 1145-1151, 2003.

TERRY JR, A.V.; BUCCAFUSCO, J.J.; WILSON, C. Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. **Behavioural Brain Research** 195 (1): 30-38, 2008.

TSAI, G. & COYLE, J.T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology** 42: 165-79, 2002.

6. TRIAGEM FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS HETEROCÍCLICOS

6. TRIAGEM FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS *N*-FENILPIPERAZÍNICOS HETEROCÍCLICOS

Os dados referentes a este capítulo encontram-se publicados:

NEVES, G., MENEGATTI, R., ANTONIO, C. B., GRAZZIOTIN, L. R., VIEIRA, R. O., RATES, S. M. K., NOEL, F. G., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic *N*-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1925-1935, 2010.

7. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE SINTOMAS DA ESQUIZOFRENIA

7.1. Introdução

Modelos animais são ferramentas importantes tanto para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos nas mais diversas doenças humanas, quanto para o desenvolvimento e descoberta de novas terapias farmacológicas (LIPSKA & WEINBERGER, 2000). Todo modelo animal deve ser avaliado quanto à sua validade preditiva, validade de face, validade de construto e validade etiológica (MCKINNEY & BUNNEY, 1969). Modelos comportamentais devem, no mínimo, apresentar validade preditiva, ou seja, o modelo animal deve ser capaz de prever a ação dos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da desordem alvo, com o mínimo possível de falsos positivos e falsos negativos (VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005).

A validade de face de um modelo animal está relacionada à similaridade fenomenológica entre o comportamento exibido pelo animal e o sintoma específico a ser mimetizado. Como é difícil esperar um comportamento similar entre um animal, por exemplo, um roedor, e um ser humano, é mais importante a busca por equivalências em regiões cerebrais e/ou sistemas neurotransmissores possivelmente envolvidos na doença em questão. A validade de construto é mais específica e de maior relevância, uma vez que se refere à similaridade entre as causas de determinado sintoma, o que nem sempre irá levar à observação de um mesmo comportamento em diferentes espécies animais. Este parâmetro envolve a simulação/reprodução de alterações em níveis de neurotransmissores e padrões de ativação de sistemas neuronais que resultam em um sintoma e/ou grupo de sintomas (BECKER *et al.*, 2003; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005).

Uma extensão da validade de construto é a validade etiológica, que se refere ao grau de similaridade da etiologia da doença com a etiologia do comportamento observado no animal. Quando se trabalha com psicofarmacologia, este nível de validação nem sempre é alcançado. Porém, o desenvolvimento de um modelo animal pode ser utilizado como ferramenta para testar uma hipótese sobre a etiologia de determinada doença (VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005).

Quando consideramos as desordens psiquiátricas, grande parte dos protocolos utilizados é limitada ou controversa, dando margem a amplas discussões na comunidade científica (LIPSKA & WEINBERGER, 2000). Contudo, apesar da impossibilidade de modelar o espectro sintomático completo de uma doença psiquiátrica em animais, determinados sintomas ou grupos de sintomas podem ser mimetizados com sucesso (POWELL & MIYAKAWA, 2006).

A esquizofrenia é caracterizada como uma das doenças mais desafiantes em relação ao desenvolvimento de modelos animais, por se tratar de uma desordem complexa, de origem desconhecida, caracterizada por anormalidades em diversos comportamentos e sentimentos humanos. Os esforços iniciais para o desenvolvimento de modelos animais de esquizofrenia se voltaram para o uso de agentes dopaminérgicos para modelar um ou um grupo de sintomas da doença, a maioria concentrados nos sintomas positivos (ELLENBROEK & COOLS, 2000; LIPSKA & WEINBERGER, 2000, VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005, POWELL & MIYAKAWA, 2006; CARPENTER & KOENIG, 2008).

A partir da observação de que antagonistas não competitivos de receptores NMDA são capazes de induzir sintomas psicóticos em voluntários saudáveis, bem como exacerbar as crises em pacientes esquizofrênicos, vêm sendo desenvolvidos modelos animais que tentam mimetizar sintomas da esquizofrenia em roedores através da administração destes agentes, especialmente fenciclidina, cetamina e dizocilpina (MK-801). Ao contrário dos estimulantes dopaminérgicos, o conjunto de alterações induzido por estes compostos apresenta analogia com sintomas positivos, negativos e cognitivos. Assim, as alterações comportamentais induzidas pela administração destes agentes em roedores passaram a ser consideradas úteis para o desenvolvimento de novos antipsicóticos (JENTSCH & ROTH, 1999; ADAMS & MOGHADDAM, 2001; TSAI & COYLE, 2002; PIETRASZEK, 2003; BECKER & GRECKSCH, 2004; AALTO *et al.*, 2005; MOURI *et al.*, 2007; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008).

Em roedores, a administração sistêmica aguda de antagonistas NMDA induz alterações comportamentais relacionadas com diferentes sintomas da esquizofrenia, como hiperlocomoção e comportamento estereotipado (sintomas positivos) (ADAMS & MOGHADDAM, 1998; IMRE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006), interação social diminuída (sintomas negativos) (POWELL & MIYAKAWA, 2006; MOURI *et al.*, 2007; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008), prejuízo de memória de trabalho e de reconhecimento (ADAMS & MOGHADDAM, 1998; IMRE *et al.*, 2006; PITSIKAS *et al.*, 2008) e prejuízo no protocolo de inibição de pré-pulso (sintomas cognitivos) (PIETRASZEK *et al.*, 1998; LEVIN *et al.*, 2007; CHAN *et al.*, 2008; KANABARA *et al.*, 2008). Os mecanismos através dos quais antagonistas NMDA induzem este amplo espectro de modificações no comportamento de roedores são bastante estudados e discutidos na literatura. Quando administradas agudamente, estas substâncias induzem um aumento dos níveis extracelulares de glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina e uma diminuição dos níveis de GABA no córtex frontal de roedores. Em regiões sub-corticais foi demonstrado um aumento da produção de dopamina no núcleo accumbens e no estriado (ADAMS & MOGHADDAM, 1998; JENTSCH *et al.*, 1998a; ADAMS & MOGHADDAM, 2001; LOPEZ-GIL *et al.*, 2007; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008). Estas alterações

neuroquímicas e comportamentais parecem ter sua origem em uma desinibição da neurotransmissão glutamatérgica especialmente no córtex frontal de roedores, mediada pelo bloqueio de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos. Este bloqueio resulta na diminuição da liberação de GABA no córtex frontal, diminuindo o estímulo inibitório sobre neurônios glutamatérgicos, o que leva ao aumento da liberação de glutamato nesta região do cérebro. A ligação do glutamato liberado a receptores AMPA e kainato resulta nas alterações nos níveis de outros neurotransmissores tanto em regiões corticais quanto sub-corticais (KRYSTAL *et al.*, 2003; LARGE, 2007). Esta hipótese é fortalecida pela observação de que a administração de muscimol (agonista GABA_A) e de CNQX (antagonista AMPA) no córtex frontal de ratos bloqueia o aumento nos níveis de dopamina induzidos pela administração de antagonistas NMDA (MOGHADAM *et al.*, 1997; YONEZAWA *et al.*, 1998). Além disso, a administração sistema de antagonistas AMPA é capaz reverter prejuízos cognitivos induzidos pela administração aguda de doses sub-anestésicas de cetamina em roedores (MOGHADAM *et al.*, 1997).

A administração repetida de antagonistas NMDA induz mudanças comportamentais similares às observadas com o tratamento agudo, porém as alterações neuroquímicas são distintas. Uma diminuição nos níveis extracelulares de glutamato e da produção e utilização de dopamina no córtex frontal de roedores foi observada em animais tratados durante 7 a 14 dias com estas substâncias (JENTSCH *et al.*, 1998b; NODA *et al.*, 2000). Estas alterações se assemelham àquelas encontradas em pacientes esquizofrênicos (AALTO *et al.*, 2005; POWELL & MIYAKAWA, 2006; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008). Quanto às alterações comportamentais, o tratamento repetido com antagonistas NMDA é capaz de aumentar o desenvolvimento de comportamento estereotipado e hiperatividade (RODVELT *et al.*, 2008), reduzir a interação social (SNIGDA & NEILL, 2008) e induzir prejuízos cognitivos em diferentes tarefas (WANG *et al.*, 2006; DIDRIKSEN *et al.*, 2007; GRAYSON *et al.*, 2007; BERAKI *et al.*, 2008). Um aumento da sensibilidade dos animais a ação de agentes dopaminomiméticos também é observada (BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008)

Modelos animais que envolvem a administração aguda ou repetida de antagonistas NMDA apresentam validade de face e são considerados ferramentas úteis na detecção de novas substâncias com potencial ação antipsicótica. Os modelos com administração aguda são os mais utilizados, devido a maior simplicidade e menor tempo de realização dos ensaios. Porém, os modelos que fazem uso da administração repetida destas substâncias apresentam também validade de construto, uma vez que induzem em roedores alterações neuroquímicas análogas as observadas em pacientes esquizofrênicos, tais como redução dos níveis de glutamato e dopamina no córtex pré-frontal (LARGE, 2007; BUBENIKOVA-

VALESOVA *et al.*, 2008). A utilidade destes modelos farmacológicos é reforçada pelo fato de que camundongos expressando apenas 5% dos níveis normais da subunidade NR1 do receptor NMDA apresentam alterações de comportamento, como aumento da atividade locomotora, estereotipia e prejuízo de interação social e sexual. Estas alterações são similares às observadas com a administração de antagonistas NMDA e são atenuadas pelo tratamento com antipsicóticos de primeira e segunda geração (MOHN *et al.*, 1999).

Em 1995, Noda e colaboradores relataram que a administração de fenciclidina 10 mg/kg/dia s.c. a camundongos durante 14 dias é capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos animais quando expostos a natação forçada até 21 dias após a interrupção do tratamento. Segundo os autores, este comportamento é análogo aos sintomas negativos da esquizofrenia, como falta de iniciativa e apatia. Estes sintomas também são associados à depressão e simulados em modelos animais de depressão, como natação forçada (*behavioral despair*) e desamparo aprendido (*learned helplessness*) (WILLNER, 1991). Porém, a observação de que antipsicóticos atípicos, como clozapina e risperidona, é capaz de reverter o efeito pró-imobilidade induzido pela administração repetida de fenciclidina, conduziu à proposta de que este modelo possa ser utilizado para detecção de moléculas com ação similar aos antipsicóticos de segunda geração (NODA *et al.* 1995; NODA *et al.*, 1997; CORBETT *et al.*, 1999, MOURI *et al.*, 2007).

Quando administradas agudamente, diversos antagonistas NMDA, incluindo cetamina e dizocilpina, diminuem o tempo de imobilidade de roedores expostos à natação forçada (GARCIA *et al.*, 2008a; MAENG *et al.*, 2008; POPIK *et al.*, 2008). O efeito anti-imobilidade de induzido pela administração aguda ou crônica de doses sub-anestésicas de cetamina tem sido interpretado predominantemente como um provável efeito antidepressivo (GARCIA *et al.*, 2008a; GARCIA *et al.*, 2008b; MAENG *et al.*, 2008; POPIK *et al.*, 2008), em analogia ao efeito de fármacos antidepressivos no modelo da natação forçada (*behavioral despair*) desenvolvido por Porsolt (1977). Esta interpretação é reforçada por ensaios clínicos que demonstram um potencial para a utilização de cetamina no tratamento de sintomas depressivos (ZARATE *et al.*, 2007).

Por outro lado, a utilização da cetamina também tem sido associada ao desenvolvimento de comportamentos relacionados à esquizofrenia em seres humanos (KRYSZAL *et al.*, 2003; BUBENIKOVA-VALESOVA *et al.*, 2008) e roedores (SWERDLOW *et al.*, 1998; JENTSCH & ROTH, 1999; BECKER *et al.*, 2003; BECKER & GRECKSCH, 2004; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005; PIETERSEN *et al.*, 2007; PITSIKAS *et al.*, 2008; BECKER *et al.*, 2009). Neste contexto pode-se destacar o trabalho de Becker e colaboradores (2003), no qual foi

demonstrado que o tratamento com cetamina 30 mg/kg/dia por cinco dias resulta na diminuição do comportamento não-agressivo em roedores em protocolos de interação social, sendo considerado um modelo para estudo dos sintomas negativos da esquizofrenia. Esta diminuição é revertida por antipsicóticos de segunda geração e benzodiazepínicos, mas não por antipsicóticos de primeira geração, sugerindo que este modelo pode ser útil na detecção de fármacos antipsicóticos com ação ansiolítica (BECKER & GRECKSCH, 2004). Ainda, Pietersen e colaboradores (2007) demonstraram que a administração aguda de cetamina 16 mg/kg s.c. é capaz de bloquear o comportamento de congelamento (*freezing*) em ratos submetidos ao protocolo de medo condicionado. Este efeito foi interpretado pelos autores como embotamento afetivo e novamente é revertido pelo tratamento com antipsicóticos de segunda geração.

7.2. Objetivo

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito da administração repetida de cetamina sobre natação forçada em camundongos, com vistas ao desenvolvimento de um modelo animal de esquizofrenia.

7.3. Material e Métodos

7.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos CF1 machos adultos pesando de 20 a 30g provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS/RS. Antes dos experimentos, os animais foram adaptados por um período mínimo de 72h no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS. A temperatura ambiente foi mantida em $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais tiveram livre acesso à água e alimentação (ração certificada Nuvital®). Nos experimentos realizados com administração das substâncias teste por via oral, os animais passaram por um período de 6 horas de jejum antes do teste.

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos enunciados pelo Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS, 1985), pela legislação nacional (BRASIL, 2008) e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2002). Imediatamente após a finalização dos experimentos, camundongos foram sacrificados por

deslocamento cervical. Após a eutanásia, o material biológico foi acondicionado em embalagem plástica branca e conservado em freezer a -20°C até ser recolhido por empresa especializada. Os protocolos experimentais aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (processo n°. 2006541, aprovado na reunião 04/2006, ata n° 70 – Anexo I).

7.3.2. Fármacos e Tratamentos

Os fármacos utilizados foram cloridrato de cetamina (gentilmente cedido pelo Sr. Roberto De Bom – Cristália®), clozapina (Galena®) e cloridrato de imipramina (Galena®). LASSBio-579 foi sintetizado, purificado e caracterizado pela equipe do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, UFRJ. Para utilização nos ensaios biológicos, cetamina e imipramina foram solubilizadas diretamente em solução salina, enquanto que a clozapina foi solubilizada em NaCl 0,9% acrescida de 1% de ácido acético 0,1 M. LASSBio-579 foi suspenso em solução salina acrescida de 1% de polissorbato 80. Os camundongos foram tratados com volume igual a 1mL/100g de massa corporal pelas vias oral e intraperitoneal.

7.3.3. Natação forçada

Em cada uma das exposições à natação forçada os animais foram transferidos para a sala de experimentação no mínimo uma hora antes do início do procedimento experimental para ambientação. A sala foi mantida com iluminação artificial, a uma temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Camundongos foram submetidos a sessões de natação forçada de três minutos de duração, em recipientes de acrílico transparente (15 x 15 x 30 cm) contendo água até 15 cm de profundidade a uma temperatura de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A determinação do tempo de imobilidade (s) dos animais foi realizada por observadores devidamente treinados e cegos ao esquema de tratamento. Todas as exposições ao nado forçado foram realizadas entre 10h e 15h.

7.3.4. Experimento 1: Investigação do efeito da manipulação animal sobre o tempo de imobilidade dos animais expostos a natação forçada repetida

No primeiro dia de experimentação (dia 1), camundongos foram expostos à natação forçada conforme as condições descritas no item 6.3.3. No dia seguinte, os animais foram aleatoriamente divididos em dois diferentes grupos de acordo com a manipulação a ser realizada: grupo SHAM (não recebeu nenhum tratamento durante 14 dias) e grupo SAL

(animais tratados com salina 1 mL/100g i.p. durante 14 dias). Os tratamentos, quando presentes, foram administrados uma vez ao dia, do dia 2 ao dia 15 de experimentação. Após o término deste período, os animais foram novamente expostos à natação forçada nos dias 16, 18, 22, 29 e 36, ou seja, um, três, sete, quatorze e vinte e um dias após a interrupção do tratamento. A determinação do tempo de imobilidade (s) foi realizada por observadores devidamente treinados e cegos ao esquema de tratamento.

7.3.5. Experimento 2: Investigação do efeito de diferentes períodos de tratamento com cetamina sobre o tempo de imobilidade dos animais expostos à natação forçada repetida

No primeiro dia de experimentação (dia 1), camundongos foram expostos a natação forçada conforme as condições descritas no item 6.3.3. No dia seguinte, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro diferentes grupos de acordo com o tratamento a ser administrado: grupo SAL (salina 1 mL/100g i.p. durante 14 dias), cetamina 1 dia (13 dias de tratamento com salina 1 mL/100g i.p., um dia de tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p.), cetamina 5 dias (9 dias de tratamento com salina 1 mL/100g i.p., 5 dias de tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p.), cetamina 14 dias (14 dias de tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p.). Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, do dia 2 ao dia 15 de experimentação. Após o término do período de tratamento, os animais foram novamente expostos à natação forçada nos dias 16, 18, 22, 29 e 36, ou seja, um, três, sete, quatorze e vinte e um dias após a interrupção do tratamento. O esquema de tratamento utilizado pode ser melhor visualizado no quadro 1.

7.3.6. Experimento 3: Investigação do efeito de diferentes doses de cetamina sobre o tempo de imobilidade dos animais expostos à natação forçada repetida

No primeiro dia de experimentação (dia 1), camundongos foram expostos a natação forçada conforme as condições descritas no item 6.3.3. No dia seguinte, os animais foram divididos, aleatoriamente, em três diferentes grupos de acordo com o tratamento a ser administrado: cetamina 15 mg/kg i.p., cetamina 30 mg/kg i.p. e cetamina 45 mg/kg i.p. O tratamento foi administrado uma vez por dia durante cinco dias consecutivos (dia 2 a dia 6). Após o término do período de tratamento, os animais foram novamente expostos à natação forçada nos dias 7, 9, 13, 20 e 27, ou seja, um, três, sete, quatorze e vinte e um dias após a interrupção do tratamento.

Quadro 1: Esquema de tratamento utilizado para avaliação do efeito de diferentes períodos de administração (1, 5 e 14 dias) de cetamina 30 mg/kg i.p. na natação forçada repetida em camundongos. *NAT* – exposição a natação forçada, *SAL* – tratamento com salina 1 mL/100g i.p.; *CET* – tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p.

Dias Grupos	Período de Tratamento														
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
SAL	<i>NAT</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>
Cetamina 1 dia	<i>NAT</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>CET</i>
Cetamina 5 dias	<i>NAT</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>SAL</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>
Cetamina 14 dias	<i>NAT</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>	<i>CET</i>

7.3.7. Experimento 4: Teste de natação forçada de Porsolt (*Behavioral despair*)

Camundongos foram tratados com cetamina (30 mg/kg v.o.), clozapina (10 mg/kg v.o.), imipramina (20 mg/kg v.o.), LASSBio-579 (30 mg/g v.o.) ou solução salina (1 mL/100 g v.o.). Sessenta minutos após o tratamento os animais foram submetidos a sessões de natação forçada de seis minutos de duração, em recipientes de acrílico transparente (15 x 15 x 30 cm) contendo água em 15 cm de profundidade a uma temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.3.8. Experimento 5: Investigação do efeito de clozapina, imipramina e LASSBio-579 sobre o aumento de imobilidade na natação forçada repetida

No primeiro dia de experimentação (dia 1), camundongos foram expostos a natação forçada conforme as condições descritas no item 6.3.3. No dia seguinte, os animais foram divididos em dois diferentes grupos de acordo com o tratamento a ser administrado: grupo SAL (salina 1 mL/100g i.p. durante 14 dias) e grupo cetamina (14 dias de tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p.). Os tratamentos foram administrados uma vez ao dia, do dia 2 ao dia 15 de experimentação. Após o término do período de tratamento, os animais foram novamente expostos à natação forçada nos dias 16 e 18, ou seja, um e três dias após a interrupção do tratamento. No dia 22 (sete dias após a interrupção do tratamento repetido),

os animais foram tratados com um dos fármacos teste: clozapina 10 mg/kg v.o., imipramina 20 mg/kg v.o., LASSBio-579 30 mg/kg v.o. ou salina 1 mL/100g v.o. Uma hora após este tratamento os animais foram novamente submetidos a natação forçada.

7.3.9. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos 1, 2 e 3 foram analisados através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls para avaliação *post-hoc*. Os resultados obtidos no experimento 4 e 5 foram avaliados através de ANOVA, utilizando o teste de Student-Newman-Keuls para avaliação *post-hoc*. Em todas as análises foi utilizado o programa Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®). Foi aceito o nível de significância $P < 0,05$.

7.4. Resultados e Discussão

A proposta inicial para o desenvolvimento de um modelo animal de sintomas da esquizofrenia utilizando a exposição ao nado forçado baseou-se nos experimentos realizados por Noda e colaboradores (1995; 1997; 2000), os quais propuseram o efeito pró-imobilidade de fenciclidina 10 mg/kg/dia s.c. durante 14 dias, como modelo animal relacionado aos sintomas negativos da esquizofrenia; e por Becker e colaboradores (2003) e Becker & Grescsch (2004), que demonstraram que cetamina 30 mg/kg/dia 5 dias i.p. em induz alterações no comportamento de interação social de roedores, comportamento também relacionado aos sintomas negativos.

Os primeiros experimentos foram delineados com os seguintes objetivos: determinar a dose de trabalho de cetamina, definir qual a melhor duração de tratamento e avaliar a persistência do efeito de cetamina sobre o comportamento de imobilidade na natação. Uma vez que para alcançar estes objetivos necessitava-se de um protocolo experimental relativamente longo (36 dias), optou-se por verificar se a manipulação animal, especialmente o estresse da administração pela via intraperitoneal, exerceria alguma influência sobre o comportamento dos animais quando expostos à natação forçada. Para tanto, comparou-se o tempo de imobilidade de camundongos tratados com solução salina durante 14 dias com aquele de camundongos SHAM, ou seja, que não foram expostos ao estresse da administração. Os dois grupos de animais apresentaram comportamento idêntico, como pode ser visualizado na Figura 1.

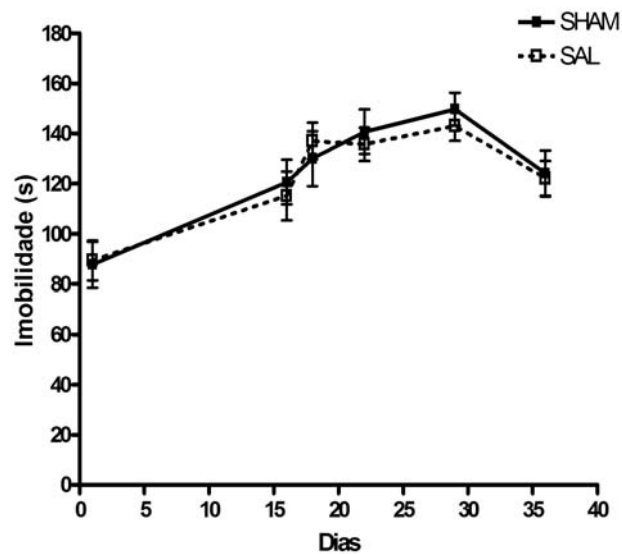


Figura 1. Efeito da manipulação animal sobre a natação forçada repetida em camundongos (n=12). Resultados expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fator manipulação: $F_{1,143}=0,045$ $P=0,834$; fator dia: $F_{5,143}=20,190$ $P<0,001$; interação dia x manipulação: $F_{1,179}=0,333$ $P=0,892$).

Uma vez descartada a interferência dos procedimentos de administração *per se*, o segundo experimento buscou avaliar o efeito de diferentes períodos de tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p. sobre a natação forçada repetida. A escolha da dose foi baseada no efeito da cetamina sobre o modelo de interação social (BECKER *et al.*, 2003; BECKER & GRECKSCH, 2004). Neste experimento foi possível observar um aumento de imobilidade ao longo dos dias, independente do tratamento (salina e cetamina) e do tempo de administração (1, 5 ou 14 dias) (Figura 2), não havendo diferença significativa entre os diferentes tratamentos em nenhum dos dias avaliados, diferentemente dos resultados relatados por Noda e colaboradores (1995) para fenciclidina. Porém, um retardo na aquisição do aumento de imobilidade pode ser observado nos animais tratados com cetamina 30 mg/kg/dia i.p. durante 5 e 14 dias, uma vez que o tempo de imobilidade na segunda exposição à natação forçada (Dia 16) não é estatisticamente diferente da imobilidade apresentada na primeira exposição (Dia 1). Foi possível observar ainda que em todos os grupos o maior tempo de imobilidade é alcançado na quarta exposição à natação forçada, ou seja, sete dias após a última administração (D22).

Becker e colaboradores (2003) demonstraram que um período de tratamento de cinco dias com cetamina 30 mg/kg/dia i.p. é suficiente para indução de prejuízos no modelo de interação social em camundongos. Assim, visando uma redução no tempo de tratamento e quantidade total de fármaco a ser utilizada, optou-se pelo tempo mais curto de

administração repetida para realização de uma curva dose-efeito de cetamina. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 3.

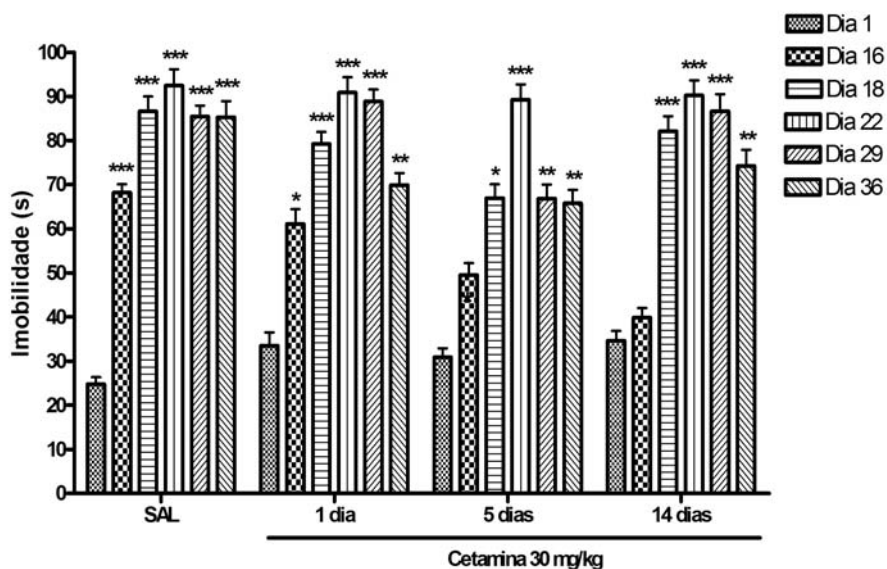


Figura 2. Efeito do tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 1, 5 ou 14 dias sobre a natação forçada repetida em camundongos (n=12). Resultados expressos em média + erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fator tratamento: $F_{3,287}=0,489$ $P=0,691$; fator dia: $F_{5,287}=29,411$ $P<0,001$; interação dia x tratamento: $F_{15,287}=0,796$ $P=0,618$). Diferente do dia 1 dentro do mesmo grupo: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

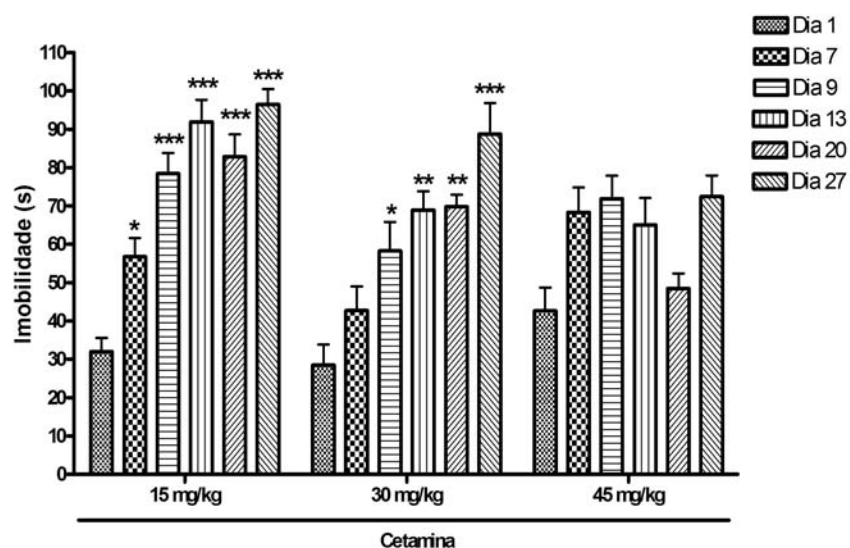


Figura 3. Efeito do tratamento com cetamina 15, 30 e 45 mg/kg i.p. durante 5 dias sobre a natação forçada repetida em camundongos (n=06-08). Resultados expressos em média + erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fator tratamento: $F_{2,131}=0,571$ $P=0,574$; fator dia: $F_{5,131}=11,611$ $P<0,001$; interação dia x tratamento: $F_{10,131}=1,508$ $P=0,148$). Diferente do dia 1 dentro do mesmo grupo: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Neste experimento, dois efeitos podem ser observados: I) houve um aumento de imobilidade ao longo dos dias nos animais tratados com cetamina 15 ou 30 mg/kg. No entanto, no grupo tratado com cetamina 30 mg/kg este aumento de imobilidade demora mais a se estabelecer, sendo significativamente diferente da primeira exposição apenas na terceira exposição à natação forçada; II) com cetamina 45 mg/kg o tempo de imobilidade não aumentou significativamente ao longo dos dias. Nesse experimento foi caracterizado, portanto, um efeito dose-dependente de cetamina sobre a aquisição do comportamento de imobilidade. Quanto maior a dose, menor ou mais retardado é o aumento de imobilidade observado nas sessões de natação subseqüentes ao término dos tratamentos.

Avaliando em conjunto os resultados dos experimentos 2 (Fig. 2) e 3 (Fig. 3), o efeito da cetamina poderia ser interpretado de três maneiras: efeito do tipo antidepressivo, efeito estimulante ou prejuízo de aprendizado. Estes efeitos são mais notáveis com administração prolongada (5 e 14 dias), onde percebe-se uma forte tendência de redução de imobilidade em relação ao tratamento com salina, no segundo dia de exposição à natação (dia 16); ou de altas doses (30 e 45 mg/kg), onde o aumento da imobilidade é retardado ou abolido.

Efeito do tipo antidepressivo já foi relatado para a cetamina em outros regimes de tratamento. Doses sub-anestésicas de cetamina (2,5 – 50 mg/kg i.p.) administradas agudamente diminuem o tempo de imobilidade dos animais (GARCIA *et al.*, 2008a; MAENG *et al.*, 2008; POPIK *et al.*, 2008), um efeito também demonstrado para a administração de dizocilpina (TRULLAS & SKOLNICK, 1990; MAENG *et al.*, 2008). Maeng e colaboradores (2008) demonstraram que o efeito induzido pela administração de cetamina 2,5 mg/kg i.p. 30 min antes de uma única exposição ao nado forçado é prevenido pela pré-administração de NBQX (10 mg/kg i.p.), um antagonista de receptores AMPA. Considerando que a estimulação de receptores AMPA tem um tônus estimulatório sobre a liberação de dopamina, é possível que o aumento na neurotransmissão dopaminérgica em regiões sub-corticais (núcleo accumbens e estriado), que está relacionado a hiperlocomoção induzida pela administração aguda de antagonistas NMDA (JENTSCH *et al.*, 1998a), possua um papel importante no efeito anti-imobilidade de cetamina. Hipótese similar já foi proposta para explicar o mecanismo do efeito anti-imobilidade da dizocilpina no modelo de suspensão pela cauda (PANCONI *et al.*, 1993). Assim, não se pode descartar uma relação entre este efeito comportamental de cetamina e a simulação de sintomas de esquizofrenia em roedores, mais especificamente sintomas positivos.

A administração repetida de cetamina (5 – 15 mg/kg/dia durante 14 dias ou 50 mg/kg duas vezes ao dia por 16 dias) também resulta num efeito anti-imobilidade em roedores

(GARCIA *et al.*, 2008b; POPIK *et al.*, 2008). A administração de cetamina 25 mg/kg/dia i.p. por sete dias é capaz de induzir alterações neuroquímicas caracterizadas por um aumento da neurotransmissão serotoninérgica e dos níveis basais de dopamina no córtex frontal de roedores (LINDEFORS *et al.*, 1997). Sabe-se que substâncias capazes de estimular a neurotransmissão dopaminérgica apresentam efeito anti-imobilidade na natação forçada (VAUDEOIS *et al.*, 1996; VIANA *et al.*, 2005). Assim, a capacidade da cetamina em ativar o sistema dopaminérgico mesmo quando administrada repetidamente pode estar envolvida no efeito anti-imobilidade deste fármaco relatado na literatura (GARCIA *et al.*, 2008b; POPIK *et al.*, 2008).

A diferença entre os efeitos da administração repetida da fenciclidina e da cetamina demonstrados por Noda e colaboradores (1995; 1997; 2000) e neste trabalho, respectivamente pode ter sua base em diferentes perfis de ação sobre os sistemas neurotransmissores mais comumente associados às respostas comportamentais observadas na natação forçada. Apesar da similaridade farmacológica entre estas duas substâncias, algumas distinções importantes são relatadas. Ambas atuam como antagonistas não-competitivos de receptores NMDA, são agonistas parciais de receptores D₂ e apresentam atividade inibidora da recaptção de dopamina. Porém, apresentam diferenças quanto à afinidade por diferentes tipos de receptores, como NMDA, D₂ e 5-HT₂, resultando em perfis de seletividade diferenciados. A cetamina apresenta afinidade semelhante frente a receptores D₂ e NMDA (K_i = 0,5 µM), e uma menor afinidade por receptores 5-HT_{2A} (K_i = 15 µM). Já a fenciclidina apresenta maior afinidade por receptores NMDA e 5-HT_{2A} (K_i = 2 µM e 5 µM, respectivamente), e uma menor capacidade de se ligar a receptores D₂ (K_i = 37 µM) (DERSCH *et al.*, 1994; NISHIMURA *et al.*, 1998; KAPUR & SEEMAN, 2002; SEEMAN *et al.*, 2005).

Animais tratados durante 14 dias com fenciclidina (10 mg/kg/dia s.c.), além do aumento no tempo de imobilidade na natação forçada, apresentam um desequilíbrio dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico no córtex frontal caracterizado por um estímulo da neurotransmissão serotoninérgica e uma inibição da neurotransmissão dopaminérgica (JENTSCH *et al.*, 1998b; NODA *et al.*, 2000). A estimulação da neurotransmissão serotoninérgica parece ter um papel importante no efeito pró-imobilidade induzido pelo tratamento repetido com fenciclidina, uma vez que apenas antipsicóticos de segunda geração (com considerável afinidade por receptores 5-HT_{2A}) são capazes de reverter este efeito. Além disso, a administração de DOI é capaz de bloquear a ação destes antipsicóticos sobre a imobilidade induzida por fenciclidina (NODA *et al.*, 2000).

Com relação a um possível efeito sobre cognição, diversos estudos demonstram que a administração aguda de cetamina (1 – 30 mg/kg) é capaz de induzir prejuízos cognitivos em vários modelos de memória e aprendizagem, incluindo memória de trabalho, espacial e de reconhecimento (UCHIHASHI *et al.*, 1994; MOGHADDAM *et al.*, 1997; IMRE *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2008; PITSIKAS *et al.*, 2008). Alguns autores propoem que este efeito é mediado pelo bloqueio de receptores NMDA no hipocampo, resultando na inibição do LTP (*long term potentiation*) (COLLINGRIDGE & BLISS, 1995), outros demonstram o envolvimento de receptores D₂ (UCHIHASHI *et al.*, 1994). Assim, não se pode descartar que o efeito encontrado para cetamina 45 mg/kg/dia i.p. esteja demonstrando um prejuízo de aprendizado nos animais que não aprendem a ficar imóveis quando submetidos à natação forçada.

O comportamento de imobilidade na natação forçada foi inicialmente interpretado por Porsolt e colaboradores (1977) como desespero comportamental e deu origem a um dos mais conhecidos e utilizados modelos animais para triagem de novos potenciais antidepressivos. Em outro contexto, a exposição à natação forçada é considerada um potente modelo de estresse psicossocial (CONNOR *et al.*, 1997; DAL-ZOTTO *et al.*, 2000), no qual o comportamento do animal durante o experimento (especialmente o tempo de imobilidade) é uma importante ferramenta de estudo, com significado amplamente discutido por diversos pesquisadores. Além da sua associação com sintomas depressivos, um aumento no tempo de imobilidade é considerado uma bem sucedida estratégia de adaptação ao estresse (BORSINI *et al.*, 1986; WEST, 1990). O desconforto experienciado por roedores forçados a nadar faz com que, nos primeiros minutos, estes animais busquem uma fuga, um meio de escapar desta condição, através de um aumento na movimentação bem como por tentativas de escalar a parede do recipiente. Porém, com a exposição repetida os animais aprendem que esta movimentação é inútil, e tornam-se imóveis mais rapidamente e por um maior período de tempo, o que também é considerado uma estratégia de economia de energia. Assim, pode-se dizer que os animais aprendem que a imobilidade é a melhor estratégia de sobrevivência nesta circunstância, não podendo ser descartado o envolvimento de aspectos cognitivos (memória e aprendizado) no desenvolvimento deste comportamento (BORSINI *et al.*, 1986; WEST, 1990; PARRA *et al.*, 1999, MASUDA *et al.*, 2001).

Neste estágio de nosso estudo, o comportamento de imobilidade apresentado pelos animais foi assumido como análogo aos sintomas negativos da esquizofrenia (apatia, anedonia) e/ou desespero comportamental, da mesma forma que Noda e colaboradores (1995), que demonstraram a reversão deste comportamento pelo tratamento com antipsicóticos de segunda geração. Desta maneira, foi priorizado, neste momento, o estudo

do efeito de antipsicóticos e antidepressivos sobre o comportamento de aumento da imobilidade ocasionado pela exposição repetida à natação forçada, em animais tratados com salina e cetamina. O aprofundamento da avaliação do possível efeito do tratamento repetido com cetamina 45 mg/kg sobre o aprendizado está previsto para uma outra fase do estudo.

Foi selecionado o regime de tratamento de 30 mg/kg/dia durante 14 dias com cetamina para o estudo do efeito do antipsicótico de segunda geração clozapina, do antidepressivo tricíclico imipramina e do candidato a antipsicótico de segunda geração LASSBio-579 sobre a imobilidade, considerando a magnitude e a persistência deste comportamento. Além disso, foi também avaliado o efeito dessas substâncias, e também de cetamina, no paradigma de exposição única à natação forçada visando replicar dados de literatura e, com isso, validar as condições experimentais utilizadas.

Para avaliação do efeito agudo, foi utilizada a metodologia clássica do teste de natação forçada de Porsolt. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4. É possível observar que nossas condições experimentais reproduzem os dados da literatura que demonstraram o efeito anti-imobilidade tanto de imipramina (PORSOLT *et al.*, 1977, GÓRKA & JANUS, 1985) quanto de cetamina (GARCIA *et al.*, 2008a; MAENG *et al.*, 2008) e de clozapina (GÓRKA & JANUS, 1985; ASAKURA *et al.*, 1995).

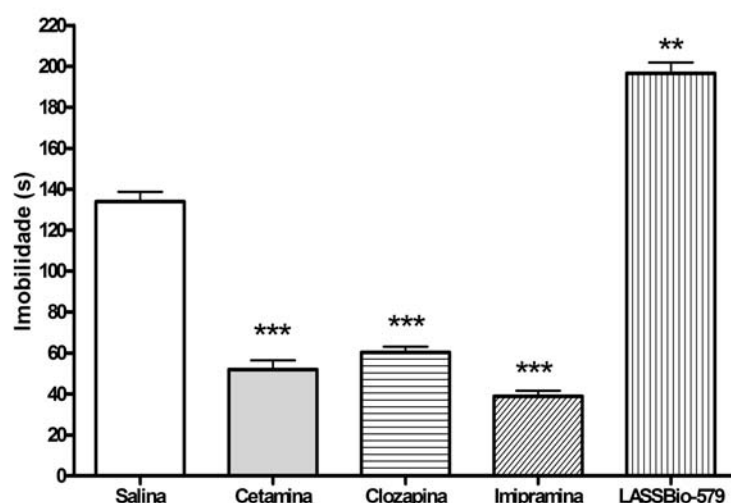


Figura 4. Efeito de cetamina (30 mg/kg v.o.), clozapina (10 mg/kg v.o.), imipramina (20 mg/kg v.o.) e LASSBio-579 (30 mg/kg v.o.) no teste de natação forçada de Porsolt (n=10). Resultados expressos em média + erro padrão. ANOVA ($F_{4,50}=25,770$ $P<0,001$). Diferente do grupo SAL+SAL: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Resultados anteriores demonstraram a ausência de qualquer efeito induzido por LASSBio-579 (15, 30 e 60 mg/kg i.p.) no protocolo clássico da natação forçada de Porsolt em ratos (NEVES, 2003). Neste trabalho, porém, o tratamento com LASSBio-579 (30 mg/kg v.o.) induziu um aumento significativo no tempo de imobilidade de camundongos (Figura 4), um efeito distinto do apresentado pelo antipsicótico de segunda geração clozapina.

Para avaliação do efeito de clozapina, imipramina e LASSBio-579 sobre a aquisição do comportamento de imobilidade na natação forçada repetida, os animais foram tratados 60 minutos antes da quarta exposição ao nado (dia 22). Este dia foi selecionado para a manipulação farmacológica, pois, como já discutido anteriormente, todos os grupos experimentais alcançaram o maior tempo de imobilidade neste dia.

O tratamento com clozapina foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade dos animais, independente do tratamento repetido anteriormente administrado (salina ou cetamina 30 mg/kg/dia i.p. – 14 dias) (Figura 5). Este resultado pode ser considerado uma primeira evidência de que o aumento do comportamento de imobilidade desenvolvido pelos animais quando expostos à natação forçada repetida é alterado seletivamente pelo tratamento com antipsicóticos de segunda geração e pode ter alguma relação com sintomas de esquizofrenia.

Novamente a substância LASSBio-579 (30 mg/kg v.o.) apresentou um efeito distinto da clozapina, induzindo um aumento no tempo de imobilidade dos animais submetidos à natação forçada repetida independente do pré-tratamento administrado (Figura 5). Diferenças entre LASSBio-579 e clozapina também foram encontrados em ensaios farmacológicos *in vitro*. Por exemplo, a clozapina se liga com alta afinidade a receptores 5-HT_{2A} (K_i = 14 nM) e apresenta afinidades similares para receptores D_{2-like} e 5-HT_{1A} (K_i = 120 nM e 380 nM respectivamente), enquanto que LASSBio-579 liga-se mais fortemente a receptores D_{2-like} e 5-HT_{1A} (K_i = 110 nM e 93 nM respectivamente) em relação a sua ligação a receptores 5-HT_{2A} (K_i = 2200 nM) (NEVES *et al.*, 2009). Ainda, clozapina é capaz de modular a atividade de outros receptores, como colinérgicos (muscarínic K_i = 34 nM) e o receptor D₁ (K_i = 540 nM) (SCHOTTE *et al.*, 1996), aos quais LASSBio-579 não apresenta afinidade (MENEGATTI *et al.*, 2003). Desta forma, é plausível que LASSBio-579 apresente efeitos diferentes dos induzidos pela clozapina e seus análogos em modelos comportamentais relacionados aos sintomas da esquizofrenia. Estudos adicionais são necessários para elucidar as bases deste efeito.

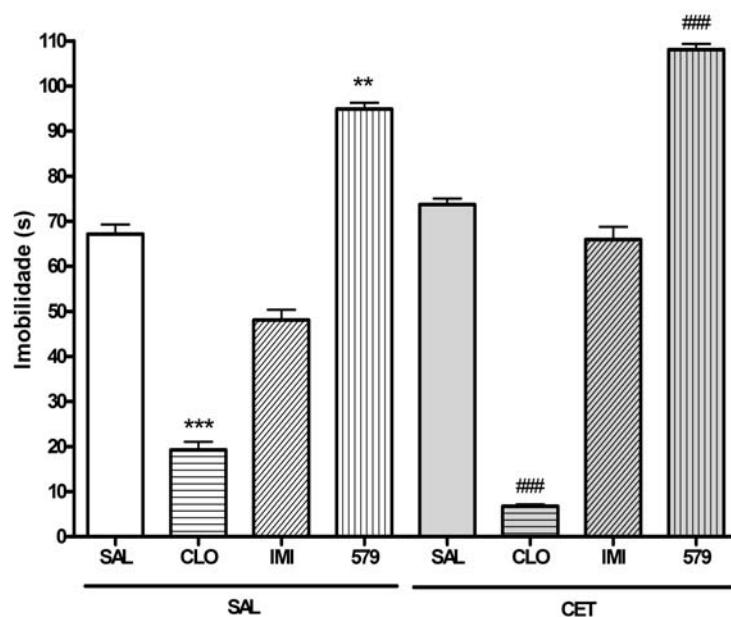


Figura 5. Efeito do tratamento com clozapina (10 mg/kg v.o.), imipramina (20 mg/kg v.o.) e LASSBio-579 (30 mg/kg v.o.) sobre o aumento do comportamento de imobilidade induzido pela natação forçada repetida no dia 22 (quarta exposição ao nado forçado) em camundongos tratados ou não com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 14 dias (n=10). Resultados expressos em média + erro padrão. ANOVA ($F_{7,91}=32,369$ $P<0,001$). Diferente do grupo SAL+SAL: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$. Diferente do grupo CET+SAL: # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$.

Por fim, com o objetivo de esclarecer o retardo na aquisição de imobilidade observado com cetamina 30 mg/kg/dia nos experimentos 2 e 3, foram reunidos os dados de imobilidade induzida pela natação repetida em animais tratados com salina ou cetamina dos experimentos 2 e 5 até o dia 18 (período no qual os animais podem ser considerados como uma amostra única). Através da utilização desta estratégia pode-se observar claramente que o perfil de aquisição do comportamento de imobilidade é virtualmente igual para os dois tratamentos (Figura 6), evidenciando de forma inequívoca que o tratamento com cetamina não interfere ou, visto de outra maneira, não é necessário para o desenvolvimento de imobilidade observado ao longo dos dias. Estes dados demonstram, portanto, que cetamina 30 mg/kg/dia i.p. 14 dias não apresenta efeito sobre cognição ou do tipo antidepressivo/estimulante nas condições avaliadas. Este resultado é condizente com a observação de Popik e colaboradores (2008) que sugere tolerância ao efeito do tipo antidepressivo induzido por cetamina com o tratamento repetido.

A exposição a natação forçada repetida é capaz de causar diferentes alterações comportamentais, fisiológicas, neuroquímicas, endócrinas e imunológicas nos animais. Entre elas, pode-se citar o aumento dos níveis séricos de corticosterona, lactato, glicose,

prolactina, bem como de indicativos de acidose metabólica e diminuição dos níveis de dióxido de carbono circulantes (ABEL, 1991; ABEL & HANNIGAN, 1992; ABEL, 1993; ABEL, 1994; CONNOR *et al.*, 1997; DAL-ZOTTO *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2000). Considerando medidas neuroquímicas, foi demonstrado um aumento da neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo, córtex frontal, amígdala e hipotálamo de animais expostos a duas sessões (24 horas de intervalo) de nado forçado. (CONNOR *et al.*, 1997; DROSSOPOULOU *et al.*, 2000; BRIONES-ARANDA *et al.*, 2005). Mais especificamente, animais expostos às mesmas condições de estresse apresentaram um aumento da densidade de receptores 5-HT_{1A} em regiões como hipotálamo e amígdala, enquanto que a densidade deste mesmo receptor encontrou-se diminuída no hipocampo e núcleos dorsal e medial da rafe (BRIONES-ARANDA *et al.*, 2005). Foi ainda detectado um aumento da liberação de noradrenalina no hipotálamo de roedores expostos a natação forçada (DELBENDE *et al.*, 1992).

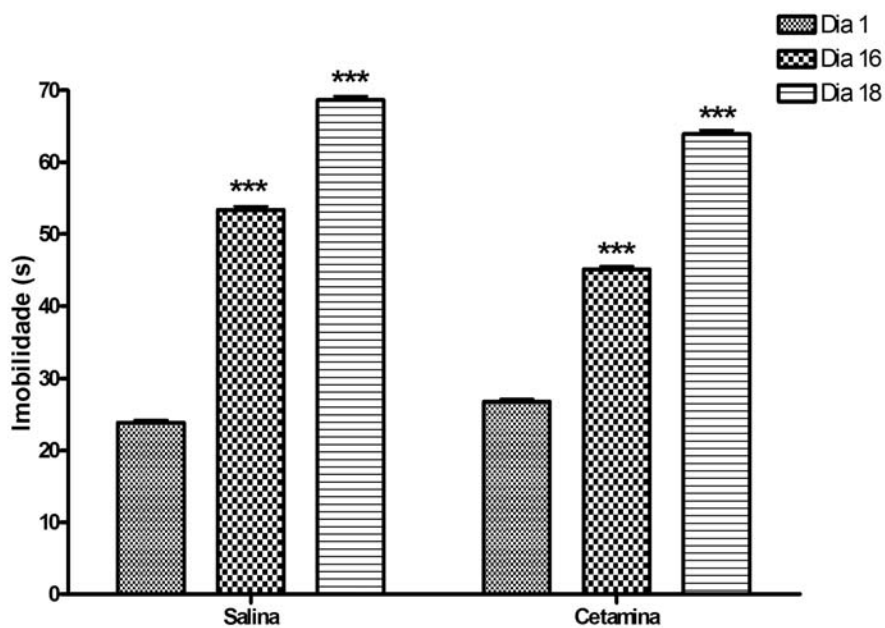


Figura 6. Efeito do tratamento com cetamina 30 mg/kg i.p. durante 14 dias sobre o aumento de imobilidade induzido pela natação forçada repetida em camundongos (n=75). Resultados expressos em média + erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fator tratamento: $F_{1,443}=0,464$ $P=0,497$; fator dia: $F_{2,443}=95,054$ $P<0,001$; interação dia x tratamento: $F_{2,443}=1,690$ $P=0,186$). Diferente do dia 1 dentro do mesmo grupo: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

A exposição à natação forçada acarretou um aumento da utilização de dopamina no estriado e uma redução da densidade de transportadores vesiculares de dopamina no núcleo accumbens e estriado de ratos (CONNOR *et al.*, 1997; ZUCKER *et al.*, 2005). Duas sessões consecutivas (24 horas de intervalo) de nado forçado induziram um aumento da

neurotransmissão dopaminérgica no córtex frontal e hipocampo de ratos machos (DALLA *et al.*, 2008). Este aumento está relacionado com a melhoria da performance de animais submetidos a diferentes tarefas cognitivas após a exposição a diversas formas de estresse agudo (REAGAN *et al.*, 2008). De forma análoga, roedores expostos cronicamente ao estresse induzido pelo nado forçado apresentam prejuízo de aprendizagem e memória espacial (ABEL & HANNIGAN, 1992; RATES, 1998), estando este prejuízo relacionado a uma diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no córtex frontal (MIZOGUCHI *et al.*, 2000). Uma vez que a diminuição na neurotransmissão dopaminérgica na via mesocortical está relacionada aos déficits cognitivos apresentados por pacientes esquizofrênicos (PEUSEKENS *et al.*, 2005; GRAY & ROTH, 2007), estas observações associadas ao efeito apresentado pela clozapina em nosso modelo reforçam a possibilidade do desenvolvimento de um modelo animal relacionado a sintomas cognitivos/negativos da esquizofrenia baseados na exposição à natação forçada repetida. A utilização de outros fármacos (antipsicóticos de primeira e segunda geração – risperidona, aripiprazol, haloperidol, clorpromazina – e antidepressivos – amitriptilina, fluoxetina, bupropiona –, por exemplo) neste protocolo experimental é necessária para confirmar a potencial validade preditiva deste modelo.

7.5. Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o aumento do comportamento de imobilidade observado ao longo dos dias é resultado unicamente da exposição repetida dos animais à natação forçada. O tratamento com cetamina (15 e 30 mg/kg/dia i.p.) não interfere na aquisição de imobilidade dos animais submetidos à natação forçada repetida.

A administração de clozapina (10 mg/kg v.o.), mas não de imipramina (20 mg/kg v.o.) é capaz de reverter o aumento de imobilidade induzido pela natação forçada repetida, o que pode ser indicativo de que este seja um modelo animal com validade preditiva para a detecção de novos antipsicóticos.

LASSBio-579 (30 mg/kg vo.o) induz um efeito pró-imobilidade tanto nos animais submetidos a exposição única (teste de Porsolt) quanto repetida à natação forçada, um efeito distinto do induzido por clozapina. Estudos adicionais são necessários para elucidar as bases deste efeito.

7.6. Referências bibliográficas

AALTO, S.; IBALAINEN, J.; HIRVONEN, J.; KAJANDER, J.; SCHEININ, H.; TANILA, H.; NAGREN, K.; VILKMAN, H.; GUSTAFSSON, L.L.; SYVÄLAHTI, E.; HIETALA, J. Cortical glutamate-dopamine interaction and ketamine-induced psychotic symptoms in man. **Psychopharmacology** 182 (3): 375-383, 2005.

ABEL, E.L. Behavior and corticosteroid response of Maudsley reactive and nonreactive rats in the open field and forced swimming test. **Physiology & Behavior** 50: 151-3, 1991.

ABEL, E.L. Physiological correlates of the forced swim test in rats. **Physiology & Behavior** 54: 309-17, 1993.

ABEL, E.L. A further analysis of physiological changes in rats in the forced swim test. **Physiology & Behavior** 56 (4): 795-800, 1994.

ABEL, E.L. & HANNIGAN, J.H. Effects of chronic forced swimming and exposure to alarm substance: Physiological and behavioural consequences. **Physiology & Behavior** 52: 781-5, 1992.

ADAMS, B & MOGHADDAM, B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. **The Journal of Neuroscience** 18 (14): 5545-5554, 1998.

ADAMS, B.W. & MOGHADDAM, B. Effect of clozapine, haloperidol or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. **Biological Psychiatry** 50 (10): 750-757, 2001.

ASAKURA, W.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. REM sleep deprivation treatment enhances the effect of clozapine in the forced swimming test. **General Pharmacology** 26 (6): 1225-1228, 1995.

BECKER, A.; PETERS, B.; SCHOROEDER, H.; MANN, T.; HUETHER, G.; GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible model of schizophrenia. **Progress in Neuropharmacology and Biological Psychiatry** 27: 687-700, 2003.

BECKER, A. & GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible model of schizophrenia. Test of predictive validity. **Progress in Neuropharmacology and Biological Psychiatry** 28 (8): 1267-77, 2004.

BECKER, A.; GRECKSCH, G.; ZERNIG, G.; LADSTAETTER, E.; HIEMKE, C.; SCHMITT, U. Haloperidol and risperidone have specific effects on altered pain sensitivity in the ketamine model of schizophrenia. **Psychopharmacology** 202 (4): 579-587, 2009.

BERAKI, S.; KUZMIN, A.; TAI, F.; OGREN, S.O. Repetead low dose of phencyclidine administration impairs spatial learning in mice : blockade by clozapine but not by haloperidol. **European Neuropsychopharmacology** 18: 486-497, 2008.

BORSINI, F.; VOLTERRA, G.; MELI, A. Does the behavioral "despair" test measure "despair"? **Physiology & Behavior** 38: 385-6, 1986.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução n 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 jun. 2002.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei n. 11.794. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. D.O.U, Brasília, 08 de outubro de 2008.

BRIONES-ARANDA, A.; ROCHA, L.; PICAZO, O. Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 29: 275-281, 2005.

BUBENIKOVA-VALESOVA, V.; HORACEK, J.; VRAJOVA, M.; HOSCHL, C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 32 (5): 1014-1023, 2008.

CARPENTER, W.T. & KOENIG, J.I. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. **Neuropsychopharmacology** 33: 2061-2079, 2008.

CHAN, M.; CHIU, P.; SOU, J.; CHEN, H. Attenuation of ketamine-evoked behavioral responses by mGluR5 positive modulators in mice. **Psychopharmacology** 198: 141-148, 2008.

CIOMS. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Council for International Organizations of Medical Sciences, 1985.

COLLINGRIDGE, G.L. & BLISS, T.V. Memories of NMDA receptors and LTP. **Trends in Neuroscience** 18: 54-56, 1995.

CONNOR, T.J.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Forced swim test-induced neurochemical, endocrine and immune changes in rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 58 (4): 961-7, 1997.

CORBETT, R.; ZHOU, L.; SORENSEN, S.M.; MONDADORI, C. Animal models of negative symptoms: M100907 antagonizes PCP-induced immobility in a forced swim test in mice. **Neuropsychopharmacology** 21 (S6): S211-8, 1999.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; KOKRAS, N.; DROSSOPOULOU, G.; PAPATHANASIOU, G.; BEKRIS, S.; DASKAS, S.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiology & Behavior** 93: 595-605, 2008.

DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behavioural Brain Research** 114 (1-2): 175-81, 2000.

DELBENDE, C.; DELARUE, H.; LEFECVRE, D.T.; SZAFARCZYK, A.; MOCAER, E.; KAMOUN, A.; JÉGOU, S.; VAUDRY, H. Glucocorticoids, transmitters and stress. **British Journal of Psychiatry** 160 (15): 24-34, 1992.

DERSCH, C.M.; AKUNNE, H.C.; PARTILLA, J.S.; CHAR, G.U.; DE COSTA, B.R.; RICE, K.C.; CARROLL, F.I.; ROTHMAN, R.B. Studies of the biogenic amine transporters: 1. Dopamine reuptake blockers inhibit [³H]-mazindol binding to the dopamine transporter by competitive mechanism: preliminary evidence for different binding domains. **Neurochemical Research** 19 (2): 201-208, 1994.

DIDRIKSEN, M.; SKARSELDT, T.; ARNT, J. Reversal of PCP-induced learning and memory deficits in the Morris' water maze by sertindole and other antipsychotics. **Psychopharmacology** 193: 225-233, 2007.

DROSSOPOULOU, G.; ANTONIOU, K.; KITRAKI, E.; PAPATHANASIOU, G.; PAPALEXI, E.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. **Neuroscience** 126: 849-857, 2004.

ELLENBROEK, B.A. & COOLS, A.R. Animal models for negative symptoms of schizophrenia. **Behavioural Pharmacology** 11 (3 & 4): 223-33, 2000.

GARCIA, L.S.B.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; BARBOSA, L.M.; ANDREAZZA, A.C.; STERTZ, L.; FRIES, G.R.; GAVIOLI, E.C.; KAPCKINSKI, F.; QUEVEDO, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 32: 140-144, 2008a.

GARCIA, L.S.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; ANDREAZZA, A.C.; STERTZ, L.; FRIES, G.R.; GAVIOLI, E.C.; KAPCKINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 103: 502-506, 2008b.

GÓRKA, Z. & JANUS, K. Effects of neuroleptics displaying antidepressant activity on behavior of rats in the forced swimming test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 23: 203-206, 1985.

GRAY, J.A. & ROTH, B.L. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** 33: 1100-1119, 2007.

GRAYSON, B.; IDRIS, N.F.; NEILL, J.C. Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. **Behavioral Brain Research** 184: 31-38, 2007.

HU, Y.; GURSOY, E.; CARDOUNEL, A.; KALIMI, M. Biological effects of single and repeated swimming stress in male rats - Beneficial effects of glucocorticoids. **Endocrine** 13 (1): 123-9, 2000.

IMRE, G.; FOKKEMA, D.S.; DEN BOER, J.A.; TER HORST, G.J. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. **Brain Research Bulletin** 69: 338-345, 2006.

JENTSCH, J.D.; TRAN, A.; TAYLOR, J.R.; ROTH, R.H. Prefrontal cortical involvement in phencyclidine-induced activation of the mesolimbic dopamine system: behavioral and neurochemical evidence. **Psychopharmacology** 138: 89-95, 1998a.

JENTSCH, J.D.; DAZZI, L.; CHHATWAL, J.P.; VERRICO, C.D.; ROTH, R.H. Reduced prefrontal cortical dopamine, but not acetylcholine, release in vivo after repeated, intermittent phencyclidine administration to rats. **Neuroscience Letters** 258: 175-178, 1998b.

JENTSCH, J.D. & ROTH, R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 20 (3): 201-25, 1999.

KANABARA, N.; SHIMIZU, E.; OHGAKE, S.; FUJITA, Y.; KOHNO, M.; HASHIMOTO, T.; MATSUZAWA, D.; SHIRAYAMA, Y.; HASHIMOTO, K.; IYO, M. Glycine and D-serine, but not D-cycloserine, attenuate prepulse inhibition deficits induced by NMDA receptor antagonist MK-801. **Psychopharmacology** 198: 363-374, 2008.

KAPUR, S. & SEEMAN, P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D₂ and serotonin 5-HT₂ receptors-implicated for models of schizophrenia. **Molecular Psychiatry** 7 (8): 837-44, 2002.

KRYSTAL, J.H.; D'SOUZA, D.C.; MATHALON, D.; PERRY, E.; BELGER, A.; HOFFMAN, R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. **Psychopharmacology** 169: 215-233, 2003.

LARGE, C. Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs? **Journal of Psychopharmacology** 21 (3): 283-301, 2007.

LEVIN, E.D.; CALDWELL, D.P.; PERRAUT, C. Clozapine treatment reverses dizocilpine-induced deficits of pre-pulse inhibition of tactile startle response. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 86: 597-605, 2007.

LINDEFORS, N.; BARATI, S.; O'CONNOR, W.T.O. Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. **Brain Research** 759: 205-12, 1997.

LIPSKA, B.K. & WEINBERGER, D.R. To model a psychiatry disorder in animals: schizophrenia as a reality test. **Neuropsychopharmacology** 23 (3): 223-39, 2000.

LOPEZ-GIL, X.; BABOT, Z.; AMORGOS-BOSCH, M.; SUNOL, C.; ARTIGAS, F.; ADELI, A. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. **Neuropsychopharmacology** 32: 2087-2097, 2007.

MAENG, S.; ZARATE, C.A.; DU, J.; SCHLOESSER, R.J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G.; MANJI, H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological Psychiatry** 63: 349-352, 2008.

MASUDA, Y.; ISHIGOOKA, S.; MATSUDA, Y. Behaviors of mice given forced-swimming. **Experimental Animals** 50 (4): 331-335, 2001.

MCKINNEY, W.T. & BUNNEY, W.E. Animal models of depression: review of evidence and implications for research. **Archives in General Psychiatry** 21: 240-248, 1969.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; PERREIRA, E.F.R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A.T.; ALBUQUERQUE, E.X.; NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D₂ receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 11: 4807-13, 2003.

MIZOGUCHI, K.; YUZURIHARA, M.; ISHIGE, A.; SASAKI, H.; CHUI, D.; TABIRA, T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. **The Journal of Neuroscience** 20 (4): 1568-1574, 2000.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DARRON, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade

to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience** 17 (8): 2921-7, 1997.

MOHN, A.R.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G.; KOLLER, B.H. Mice with NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell** 98: 247-436, 1999.

MOURI, A.; NODA, Y.; ENOMOTO, T.; NABESHIMA, T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. **Neurochemistry International** 51: 173-184, 2007.

NEVES, G. **Avaliação Farmacológica de Novos Derivados N-Fenilpiperazínicos – LASSBio579 e LASSBio581 – Candidatos a Protótipos de Fármacos Dopaminérgicos.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.

NEVES, G.; BETTI, A.H.; ANTONIO, C.B.; PRANKE, M.A.; KLIEMANN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; NOËL, F.; RATES, S.M.K. LASSBio-579: a new antipsychotic lead compound active on models of schizophrenia positive symptoms. **Psychopharmacology** (submitted), 2009.

NISHIMURA, M.; SATO, K.; OKADA, T.; YOSHIYA, I.; SCHLOSS, P.; SHIMADA, S.; TOHYAMA, M. Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. **Anesthesiology** 88 (3): 768-744, 1998.

NODA, Y.; YAMADA, K.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology** 116 (5): 2531-7, 1995.

NODA, Y.; MAMIYA, T.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Effects of antidepressants on phencyclidine-induced enhancement of immobility in a forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology** 324 (2-3): 135-40, 1997.

NODA, Y.; KAMEI, H.; MAMIYA, T.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Repeated phencyclidine treatment induces negative symptom-like behavior in forced swimming test in mice: imbalance of prefrontal serotonergic and dopaminergic functions. **Neuropsychopharmacology** 23 (4): 375-87, 2000.

PANCONI, E.; ROUX, J.; ALTENBAUMER, M.; HAMPE, S.; PORSOLT, R.D. MK-801 and enantiomers: potential antidepressants or false positives in classical screening models? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 46 (1): 15-20, 1993.

PARRA, A.; VINADER-CAEROLS, C.; MONLEON, S.; SIMON, V.M. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice. **Psicothema** 11 (2): 239-246, 1999.

PEUSEKENS, J.; DEMILY, C.; THIBAUT, F. Treatment of cognitive dysfunction in schizophrenia. **Clinical Therapeutics** 27: S25-S37, 2005.

PIETERSEN, C.Y.; BOSKER, F.J.; DOORDUIN, J.; JONQSMA, M.E.; POSTEMA, F.; HAAS, J.V.; JOHNSON, M.P.; KOCH, T.; VLADUSICH, T. DE BOER, J.A. An animal model of emotional blunting in schizophrenia. **Plos One** 2 (12): 1360, 2007.

PIETRASZEK, M.; OSSOWSKA, K. Chronic treatment with haloperidol diminishes the phencyclidine-induced sensorimotor gating deficit in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 357: 466-471, 1998.

- PIETRASZEK, M. Significance of dysfunctional glutamatergic transmission for the development of psychotic symptoms. **Polish Journal of Pharmacology** 55:133-54, 2003.
- PITSIKAS, N.; BOULTADAKIS, A.; SAKELLARIDIS, N. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. **Neuroscience** 154: 454-460, 2008.
- POPIK, P.; KOS, T.; SOWA-KUÉMA, M.; NOWAK, G. Lack of persistent effects of ketamine in rodent models of depression. **Psychopharmacology** 198: 421-430, 2008.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie** 229 (2): 327-336, 1977.
- POWELL, C.M. & MIYAKAWA, T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? **Biological Psychiatry** 59: 1198-1207, 2006.
- RATES, S.M.K. Efeitos comportamentais em ratos Wistar de diferentes regimes de estresse relacionados com modelos animais de depressão. **Caderno de Farmácia** 14 (1-2): 31-1, 1998.
- REAGAN, L.P.; GREILLO, C.A.; PIROLI, G.G. The as and ds of stress: metabolic, morphological and behavioral consequences. **European Journal of Pharmacology** 585 (1): 64-75, 2008.
- RODVELT, K.R.; KRACKE, G.R.; SCHACHTMAN, T.R.; MILLER, D.K. Ketamine induces hyperactivity in rats and hypersensitivity to nicotine in rat striatal slices. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 91: 71-76 (2008).
- SCHOTTE, A.; JANSSEN, P.F.; GOMMEREN, W.; LUYTEN, W.H.; VAN GOMPEL, P.; LESAGE, A.S.; DE LOORE, K.; LEYSEN, J.E. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. **Psychopharmacology** 124 (1-2): 57-73, 1996.
- SEEMAN, P.; KO, F.; TALLERICO, T. Dopamine receptor contribution to the action of PCP, LSD and ketamine psychomimetics. **Molecular Psychiatry** 10 (9): 877-883, 2005.
- SNIGDA, S & NEILL, J.C. Improvement of phenciclidine-induced social behaviour deficits in rats: involvement of 5-HT_{1A} receptors. **Behavioral Brain Research** 191 (1): 26-31, 2008.
- SWERDLOW, N.R.; BAKSHI, V.; WAIKAR, M.; TAAID, N.; GEYER, M.A. Seroquel, clozapine and chlorpromazine restore sensorimotor gating in ketamine-treated rats. **Psychopharmacology** 140: 75-80, 1998.
- TRULLAS, R. & SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant action. **European Journal of Pharmacology** 185 (1): 1-10, 1990.
- TSAI, G. & COYLE, J.T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology** 42: 165-79, 2002.
- UCHIHASHI, Y.; KURIBARA, H.; ISA, Y.; MORITA, T.; SATO, T. The disruptive effects of ketamine on passive avoidance learning in mice: involvement of dopaminergic mechanism. **Psychopharmacology** 116 (1): 40-44, 1994.

VAN DEN BUUSE, M.; GARNER, B.; GOGO, A.; KUSLJIC, S. Importance of animal models in schizophrenia research. **Australian and New Zeland Journal of Psychiatry**, 39 (7): 550-7, 2005.

VAUDEOIS, J.; POUHÉ, D.; ZUCCARO, F.; COSTENTIN, J. Indirect dopamine agonists effects on despais test : dissociation from hyperactivity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 54 (1): 235-239, 1996.

VIANA, A.; REGO, J.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology** 49: 1042-1052, 2005.

WANG, J.H.; FU, Y.; WILSON, F.A.W.; MA, Y.Y. Ketamine affects memory consolidation: differential effects in t-maze and passive avoidance paradigmes in mice. **Neuroscience** 140: 993-1002, 2006.

WEST, A.P. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 14 (6): 863-877, 1990.

WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends in Pharmacological Sciences** 12 (4): 131-6, 1991.

YONEZAWA, Y.; KUROKI, T.; KAWAHARA, T.; TASHIRO, N.; UCHIMURA, H. Involvement of γ -aminobutiric acid neurotransmission in phencyclidine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. **European Journal od Pharmacology** 341: 45-56, 1998.

ZARATE, C.A.; SINGH, J.B.; CARLSON, P.J.; BRUTSCHE, N.E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D.A.; CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archieves in General Psychiatry** 63 (8): 856-864, 2007.

ZUCKER, M.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. Repeated swim stress leads to down-regulaion of vesicular monoamine transporter 2 in rat brain nucleus accumbens and striatum. **European Neuropharmacology** 15: 199-201, 2005.

8. DISCUSSÃO GERAL

8. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo árduo, longo e multidisciplinar, sendo necessária a integração entre profissionais especialistas em diversas áreas das ciências químicas, biológicas e da saúde para a identificação de substâncias promissoras. Segundo Wermuth (2003a), a Química Medicinal cobre três passos críticos dentro do complexo e multidisciplinar caminho até a introdução de um novo fármaco ao arsenal terapêutico:

Passo I – Descoberta: consiste da identificação e produção de novas substâncias ativas, geralmente denominadas compostos protótipos ou moléculas líderes. Estes protótipos podem ser originados através de síntese orgânica, da extração de fontes naturais ou de processos biotecnológicos.

Passo II – Otimização: defronta-se principalmente com a modificação estrutural do protótipo a fim de aumentar sua potência, seletividade e diminuir sua toxicidade. É caracterizado pelo estabelecimento e análise de relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos candidatos a fármaco.

Passo III – Desenvolvimento: consiste da otimização da rota sintética para a produção em grande escala e da modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacêuticas da substância ativa a fim de torná-la adequada para uso clínico.

No presente trabalho a estratégia de hibridação molecular dos protótipos clozapina e L-741 (planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante) se mostrou bem sucedida, levando à identificação de um novo protótipo para o desenvolvimento de antipsicóticos de segunda geração: LASSBio-579. Assim, pode-se afirmar que este trabalho encontra-se na interface entre os passos I e II propostos por Wermuth (2003a), uma vez que uma substância que apresenta a atividade farmacológica pretendida *in vivo* foi identificada e algumas informações sobre a relação estrutura-atividade foram geradas visando a proposição de modificações na estrutura protótipo para otimização de seu perfil farmacológico.

O objetivo primário deste projeto foi a obtenção de ligantes de receptores dopaminérgicos *D₂-like*. LASSBio-579 é capaz de se ligar a estes receptores com uma afinidade de 0,11 μ M, cumprindo a meta inicial. Soma-se a isto a comprovação da ação antidopaminérgica *in vivo* para esta substância quando administrada tanto pela via

intraperitoneal quanto pela via oral, demonstrada em três modelos animais preditivos de atividade antipsicótica (sintomas positivos): inibição da estereotipia anfetamínica (NEVES *et al.*, 2003), bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina e hipotermia apomorfínica.

Além disso, a cuidadosa observação dos efeitos *in vivo* induzidos por LASSBio-579 (especialmente o efeito sobre a temperatura corporal) levou a proposição do envolvimento de outros sistemas neurotransmissores no mecanismo de ação desta substância, especialmente do sistema serotoninérgico (NEVES *et al.*, 2008). A investigação desta hipótese levou à demonstração do perfil multireceptor de LASSBio-579, com afinidade por receptores 5-HT_{1A} ($K_i = 0,09 \mu\text{M}$) similar a apresentada por receptores D_{2-like} e afinidade um pouco inferior por receptores 5-HT_{2A} ($K_i = 2,2 \mu\text{M}$). A ativação de receptores 5-HT_{1A} *in vivo* por esta substância foi claramente demonstrada através de ensaios de aferição da temperatura corporal, onde a pré-administração de WAY 100635 bloqueia completamente o efeito hipotérmico de LASSBio-579 (NEVES *et al.*, 2008). Já a capacidade desta substância de modular a atividade de receptores 5-HT_{2A} *in vivo* permanece incerta, uma vez que ensaios eletrofisiológicos preliminares *in vitro* indicam uma potencial ação agonista sobre este receptor, não demonstrada *in vivo* nos ensaios realizados e nas doses testadas.

Desta forma, este trabalho avançou na elucidação do mecanismo de ação de LASSBio-579, demonstrando a capacidade desta substância de modular três diferentes sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia: dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico. A ação antidopaminérgica de LASSBio-579 parece ser a responsável pela potencial utilidade desta substância para o tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia, demonstrada em modelos animais. Já a modulação do sistema serotoninérgico, especificamente de receptores 5-HT_{1A} pode estar relacionada a uma redução na probabilidade de indução de reações adversas, especialmente a ausência de catatonia em doses comprovadamente antidopaminérgicas em roedores. O envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos já demonstrados para LASSBio-579 ainda precisa ser esclarecido.

O perfil farmacológico *in vitro* demonstrado para LASSBio-579 parece ser capaz de explicar algumas de suas ações *in vivo*. Porém, estudos de farmacocinética em ratos demonstraram que esta substância apresenta uma biodisponibilidade por via oral limitada (0,6%) e uma baixa penetração no sistema nervoso central (6,3%) (CONRADO *et al.*, 2008). Considerando estes dados, quando da administração de uma dose de 60 mg/kg a um rato de 250 g, pode-se inferir que apenas 90 μg de substância atinge a circulação sistêmica

deste animal. Ainda, segundo Conrado e colaboradores (2008), o pico de concentração plasmática obtido após a administração oral de LASSBio-579 60 mg/kg foi de 74 ng/mL, ou aproximadamente 210 nM. Desta forma é possível que, nas doses testadas, não seja possível atingir a concentração de LASSBio-579 necessária para ocupar um número significativo de receptores dopaminérgicos e/ou serotoninérgicos no sistema nervoso central para induzir os efeitos comportamentais relatados. Esta observação aponta para outras hipóteses que seriam capazes de explicar os efeitos de LASSBio-579 em roedores, como uma distribuição diferenciada da substância em regiões específicas do sistema nervoso central. Por outro lado, o envolvimento de outros alvos moleculares (receptores, canais iônicos) ou outros sistemas neurotransmissores não pode ser descartado.

Uma segunda hipótese a ser trabalhada é a existência de metabólitos ativos que possam contribuir com os efeitos observados quando da administração de LASSBio-579 em roedores. Ensaios de bioconversão utilizando fungos filamentosos foram realizados levando a identificação de dois potenciais metabólitos para LASSBio-579 (GOMES, 2007). A elucidação estrutural bem como a avaliação farmacológica dos mesmos encontra-se em andamento.

É importante lembrar que os dados referentes ao perfil farmacocinético de LASSBio-579 foram obtidos em ratos, enquanto que a maior parte dos dados de efetividade pré-clínica são oriundos de experimentos realizados em camundongos. Por se tratarem de espécies diferentes, apresentando especialmente metabolismo de xenobióticos diferenciados, nada exclui a possibilidade de que em camundongos a biodisponibilidade bem como a penetração central de LASSBio-579 sejam diferentes dos valores encontrados em ratos.

Considerando ainda o perfil farmacológico demonstrado para LASSBio-579, novas hipóteses de trabalho podem ser postuladas. A atividade agonista sobre receptores 5-HT_{1A} associada a um aumento da liberação de glutamato no hipocampo podem resultar em efeitos pró-cognitivos interessantes para um novo antipsicótico. Assim, a avaliação do efeito de LASSBio-579 em tarefas de aprendizagem e memória ou que envolvam parâmetros cognitivos sabidamente prejudicados em pacientes esquizofrênicos é uma perspectiva interessante. Neste contexto destaca-se na literatura o modelo e inibição de pré-pulso, caracterizado como uma medida operacional do gatilho sensorial e motor. Este modelo baseia-se no paradigma de que indivíduos normais não mais respondem a um estímulo relevante (pulso) quando, precedente a este, é fornecido um estímulo de menor intensidade (pré-pulso). Diversos estudos demonstram que pacientes esquizofrênicos apresentam uma

disfunção na inibição de pré-pulso, caracterizada pela manutenção da resposta motora ao pulso (BRAFF *et al.*, 2001), e a simulação deste déficit em roedores tem sido amplamente empregada como ferramenta para desenvolvimento de novos antipsicóticos (SWERDLOW & GEYER, 1998; GEYER *et al.*, 2001). Esse modelo está sendo validado no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental (Faculdade de Farmácia – UFRGS) e a investigação do efeito de LASSBio-579 neste modelo está prevista. Além do teste de inibição de pré-pulso, prevê-se ainda a avaliação do efeito de LASSBio-579 nos modelos de reconhecimento de objeto novo e no labirinto de água de Morris, duas outras ferramentas para a avaliação de parâmetros cognitivos em roedores.

Ainda, a capacidade de LASSBio-579 em modular a neurotransmissão serotoninérgica, especificamente sua ação agonista 5-HT_{1A}, pode fornecer para esta substância um perfil promissor para o tratamento de sintomas negativos da esquizofrenia (SNIGDHA & NEIL, 2008). Para tanto, é necessária a seleção de um modelo animal onde esta hipótese possa ser avaliada. A literatura demonstra uma grande carência por modelos animais relacionados aos sintomas negativos da esquizofrenia, uma vez que anedonia, isolamento social e apatia são comportamentos difíceis de serem avaliados em roedores (ELLENBROEK & COOLS, 2000; POWELL & MIYAKAWA, 2006; MOURI *et al.*, 2007). Este trabalho apresenta resultados promissores neste sentido.

Os resultados obtidos apontam para a possibilidade do desenvolvimento de um modelo animal relacionado a sintomas negativos/cognitivos da esquizofrenia baseados na exposição à natação forçada repetida. Foi demonstrado que apenas clozapina e não imipramina reverteu o aumento de imobilidade ao longo dos dias acarretado pela exposição repetida à natação forçada em roedores. Este dado demonstra uma potencial validade preditiva, o primeiro grau de validação necessário para um novo modelo animal. Estudos complementares estão em andamento para confirmar estas observações.

Embora um perfil promissor tenha sido identificado para LASSBio-579, algumas limitações também são claras. Apesar de ser considerada adequada para moléculas protótipo com perfil multi-receptor (PATRICK, 2005), a afinidade desta substância por receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos é da faixa de μM , diferentes de antipsicóticos de segunda geração, como aripiprazol (K_i D₂-like = 1 nM; 5-HT_{1A} = 0,4 nM, 5-HT_{2A} = 7 nM), que apresentam afinidade por estes receptores na faixa de nM. Considerando efeitos indesejáveis, LASSBio-579 induziu um prejuízo na coordenação motora em roedores, porém em magnitude menor que clozapina e haloperidol nas mesmas condições experimentais. Estes dados, em conjunto com seu perfil farmacocinético (CONRADO *et al.*, 2008), encorajam

a busca de substâncias com um perfil farmacológico superior ao de LASSBio-579 através da introdução de modificações em sua estrutura química.

Neste sentido, uma triagem farmacológica de 18 derivados *N*-fenilpiperazínicos análogos a LASSBio-579 buscando um novo candidato a antipsicótico de segunda geração com perfil multireceptor foi realizada. Os resultados obtidos nos ensaios de radioligação a receptores *D*₂-*like*, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} foram utilizados na proposição de relações qualitativas entre estrutura química das substâncias e a afinidade apresentada pelos diferentes receptores. Na comparação da substituição bioisostérica entre os núcleos pirazol e 1,2,3-triazol, é clara a maior afinidade dos derivados pirazólicos por todos os receptores estudados. A introdução do sistema imidazopiridínico resultou em substâncias que não apresentam o perfil multi-receptor pretendido.

Um efeito importante sobre o perfil de seletividade das substâncias foi identificado para os substituintes adicionados a posição *para* do grupamento *N*-fenilpiperazínico. Substâncias com uma maior afinidade por receptores *D*₂-*like* do que por 5-HT_{1A} podem ser obtidas através da introdução de pequenos grupamentos doadores de elétrons nesta posição. Já uma maior seletividade por receptores 5-HT_{2A} frente aos demais receptores estudados pode ser alcançada pela introdução de substituintes que sejam ao mesmo tempo volumosos e eletronegativos.

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, cinco outras substâncias foram selecionadas para avaliação da potencial atividade frente a sintomas positivos da esquizofrenia no modelo de bloqueio do comportamento de escalada induzido por apomorfina. Neste ensaio, apenas LASSBio-664 15 mg/kg v.o. apresentou atividade e, nesta mesma dose, este derivado não induziu catatonia nos animais. Porém, um prejuízo sobre a coordenação motora de camundongos também foi induzido pela administração deste derivado *N*-fenilpiperazínico. Assim, LASSBio-664 apresenta um perfil farmacológico similar ao de LASSBio-579. Ensaio adicionais estão previstos a fim de encontrar diferenças farmacológicas entre estes dois compostos.

As informações geradas neste trabalho irão servir de base, em conjunto com dados da literatura, para a proposição de novas modificações moleculares buscando otimizar o perfil farmacológico de LASSBio-579.

9. CONCLUSÕES GERAIS

9. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho caracterizou LASSBio-579 como um novo protótipo de fármaco antipsicótico, capaz de modular o sistemas dopaminérgico e serotoninérgico *in vitro* e *in vivo* e o sistema glutamatérgico *in vitro*, ativo em modelos de sintomas positivos de esquizofrenia, com baixo potencial de indução de efeitos motores, baixa toxicidade aguda e ausência de toxicidade hematológica.

O *screening* farmacológico de outros derivados *N*-fenilpiperazínicos heterocíclicos resultou na identificação de LASSBio-664 como uma substância promissora para o desenvolvimento de novos antipsicóticos.

A exposição à natação forçada repetida parece ser um modelo animal com validade preditiva para a detecção de novos antipsicóticos. Estudos adicionais são necessários para completa caracterização e utilização do mesmo como ferramenta na busca de novos fármacos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMZEL, L.M. Structure-based drug design. **Current Opinion in Biotechnology**. 9: 366-9, 1998.
- BARREIRO, E.J. & FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008.
- BECKER, A. & GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible model of schizophrenia. Test of predictive validity. **Progress in Neuropharmacology and Biological Psychiatry** 28 (8): 1267-77, 2004.
- BRAFF, D.L.; GETER, M.A.; SWERDLOW, N.R. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups and pharmacological studies. **Psychopharmacology** 156 (2-3): 234-258, 2001.
- BUBENIKOVA-VALESOVA, V.; HORACEK, J.; VRAJOVA, M.; HOSCHL, C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 32 (5): 1014-1023, 2008.
- CARPENTER, W.T. & KOENIG, J.I. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. **Neuropsychopharmacology** 33: 2061-2079, 2008.
- CHAPERON, F.; TRICKLEBANK, M.D.; UNGER, L.; NEIJT, H.C. Evidence for regulation of body temperature in rats by dopamine D₂ receptor and possible influence of D₁ but not D₃ and D₄ receptors. **Neuropharmacology** 44: 1047-53, 2003.
- CONRADO, D.J.; VERLI, H.; NEVES, G.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; DALLA COSTA, T.C. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N-phenylpiperazine antipsychotic prototype. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60: 699-707, 2008.
- ELLENBROEK, B.A. & COOLS, A.R. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. **Behavioral Pharmacology** 11 (3-4): 223-233, 2000.
- GANE, P.J. & DEAN, P.M. Recent advances in structure-based rational drug design. **Current Opinion in Structural Biology** 10: 401-4, 2000.
- GANELLIN, C.R. General approaches to discovering new drugs: An historical perspective. In: GANELLIN, C.R. & ROBERTS, S.M. (Ed.) **Medicinal Chemistry – The Role of Organic Chemistry in Drug Research**. Londres: Academic Press, 1991.
- GEYER, M.A.; KREBS-THOMSON, K.; BRAFF, D.L.; SWERDLOW, N.R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. **Psychopharmacology** 156 (2-3): 117-154, 2001.
- GOMES, T.C.F. **Produção de Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos N-Fenilpiperazínicos Via Bioconversão**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 2007.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; ZUARDI, A.W. Medicamentos antipsicóticos. In: GRAEFF, F.G. & GUIMARÃES, F.S. (Ed.) **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Ateneu, 1999.

KILTS, C.D. The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. **Biological Psychiatry** 50: 845-55, 2001.

KULAGOWSKI, J.J.; BROUGHTON, H.B.; CURTIS, N.R.; MAWER, I.A.; RIDGILL, M.P.; BAKER, R.; EMMS, F.; FREEDMAN, S.B.; MARWOOD, R.; PATEL, S.; RAGAN, C.I.; LEESON, P.D. 3-[[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1*H*-pyrrolo[2,3]pyridine: An antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D₄ receptor. **Journal of Medicinal Chemistry** 39: 1941-2, 1996.

MACCHI JR, I.L. **Elaboração de Modelos 3D de Receptores Dopaminérgicos D₂ e D₄ Utilizando a Modelagem Molecular**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; PERREIRA, E.F.R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A.T.; ALBUQUERQUE, E.X.; NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D₂ receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 11: 4807-13, 2003.

MENON, M.K.; GORDON, L.I.; KODAMA, C.K.; FITTEN, J. Influence of D₁ receptor system on the D₂ receptor-mediated hypothermic response in mice. **Life Sciences** 43 (10): 871-81, 1988.

MOORE, N.C. & GERSHON, S. Which atypical antipsychotics are identified by screening tests? **Clinical Neuropharmacology** 12 (3): 167-84, 1989.

MOURI, A.; NODA, Y.; ENOMOTO, T.; NABESHIMA, T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. **Neurochemistry International** 51: 173-184, 2007.

NEVES, G. **Avaliação Farmacológica de Novos Derivados *N*-Fenilpiperazínicos – LASSBio579 e LASSBio581 – Candidatos a Protótipos de Fármacos Dopaminérgicos**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.

NEVES, G.; FENNER, R.; HECKLER, A.P.; VIANA, A.F.; TASSO, L.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA-COSTA, T.C.; RATES, S.M.K. Dopaminergic profile of new heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivatives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36: 625-9, 2003.

NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova** 27 (6): 949-957, 2004.

NEVES, G.; KLIEMANN, M.; BETTI, A.H.; CONRADO, D.J.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; RATES, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 89: 23-30, 2008.

PATRICK, G.L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 3.ed. London: Oxford University Press, 2005.

PAZINI, F.; OLIVEIRA, V.; MENEGATTI, R.; PAULA, A.F.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Preparação de metabólitos de fase I e II do derivado *N*-fenilpiperazínico LASSBio 581 via bioconversão por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 e *Mortierella isabelina* NRRL 1757. **Revista Eletrônica de Farmácia** 2 (2): 157-160, 2005.

POWELL, C.M. & MIYAKAWA, T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? **Biological Psychiatry** 59: 1198-1207, 2006.

RASMUSSEN, S.G.; CHOI, H.J.; ROSENBAUM, D.M.; KOBICA, T.S.; THIAN, F.S.; EDWARDS, P.C.; BURGHAMMER, M.; RATNALA, V.L.; SANISHVII, R.; FISCHETTI, R.F.; SCHERTLER, G.F.; WEIS, W.I.; KOBILKA, B.K. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. **Nature** 450 (7168): 383-387, 2007.

SALMI, P. Independent roles of dopamine D₁ and D_{2/3} receptors in rat thermoregulation. **Brain Research** 781: 188-93, 1998.

SALMI, P.; JIMENEZ, P.; AHLENIUS, S. Evidence for specific involvement of dopamine D₁ and D₂ receptors in the regulation of body temperature in the rat. **European Journal of Pharmacology** 236: 395-400, 1993.

SNIGDHA, S. & NEILL, J.C. Improvement of phencyclidine-induced social behaviour deficits in rats: involvement of 5-HT_{1A} receptors. **Behavioural Brain Research** 191 (1): 26-31, 2008.

SWEDLOW, N.R. & GEYER, M.A. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** 24 (2): 285-301, 1998.

TASSO, L.; NEVES, G.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.; EIFLER-LIMA, V.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 26 (2): 194-202, 2005.

VAN DEN BUUSE, M.; GARNER, B.; GOGO, A.; KUSLJIC, S. Importance of animal models in schizophrenia research. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, 39 (7): 550-7, 2005.

VERMA, A. & KULKARNI, S.K. Differential role of dopamine receptor subtypes in thermoregulation and stereotypic behavior in naive and reserpinized rats. **Archives in Pharmacodynamics** 324: 17-32, 1993.

WEISS, J.M. & KILTS, C.D. Animal models of depression and schizophrenia. In: SCHATZBERG, A.F. & NEMEROFF, C.B. **Textbook of Psychopharmacology** 2.ed. Washington: American Psychiatric Press, 1998.

WERMUTH, C.G.; GANELLIN, C.R.; IMHOF, P.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. Glossary of terms used in medicinal chemistry, **IUPAC Recommendations**, 1996.

WERMUTH, C.G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: WERMUTH, C.G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2.ed. New York: Academic Press, 2003a.

WERMUTH, C.G. Medicinal chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: WERMUTH, C.G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2.ed. New York: Academic Press, 2003b.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; HORISAKA, K. Serotonin₂ (5-HT₂) receptor agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) inhibits chlorpromazine- and haloperidol-induced hypothermia in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 18 (11): 1580-3, 1995.

11. ANEXOS

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro-pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2006541

Título : Estudo de novos derivados N-Fenilpiperazínicos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos atípicos

Pesquisador (es) :

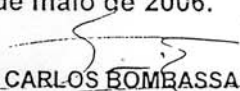
<u>NOME</u>	<u>PARTICIPACÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
STELA MARIS KUZE RATES	PESQ RESPONSÁVEL	ratessmk@farmacia.ufrgs.br	33165313
GILDA ANGELA NEVES	PESQUISADOR	gildaneves@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado , com recomendações, especificadas abaixo, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, na reunião nº 4 , ata nº 70 , de 18/05/2006 .

Recomendação(ões):

Apresentar nova cópia do projeto com inclusão do item 4 da resposta à diligência..

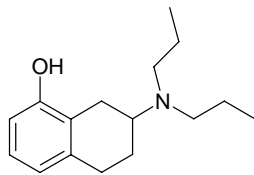
Porto Alegre, 24 de maio de 2006.


LUIZ CARLOS BOMBASSARO
Coordenador do CEP-UFRGS

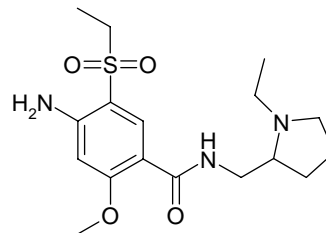
ANEXO II

Estruturas Químicas de Fármacos e Drogas
Utilizados e/ou Citados ao longo do Trabalho

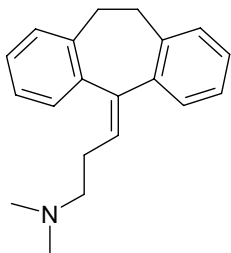
8-OH-DPAT



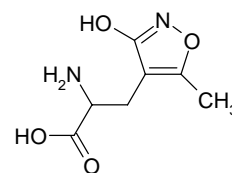
AMISULPRIDA



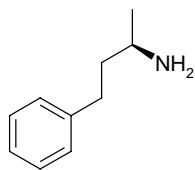
AMITRIPTILINA



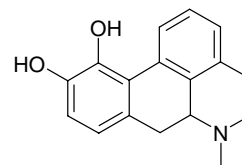
AMPA



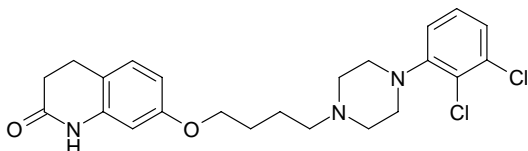
ANFETAMINA



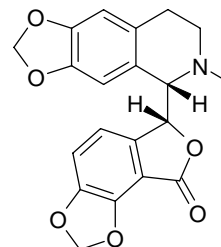
APOMORFINA



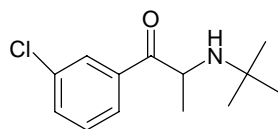
ARIPIPRAZOL



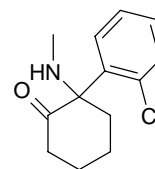
BICUCULINA



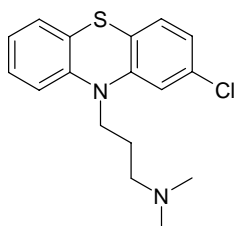
BUPROPIONA



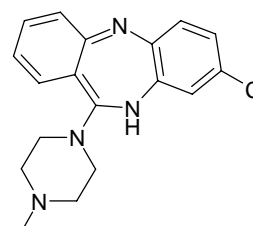
CETAMINA

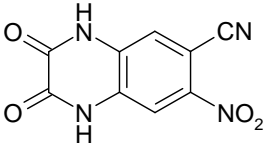
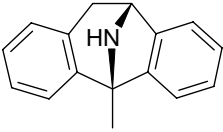
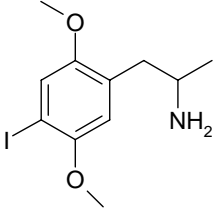
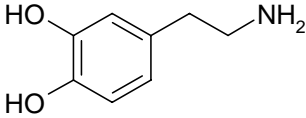
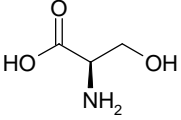
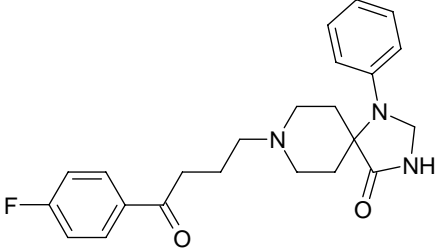
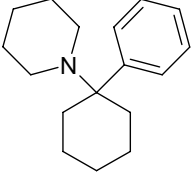
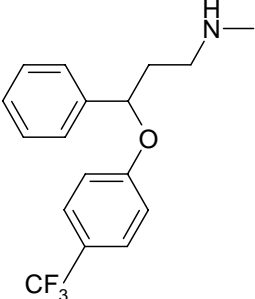
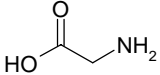
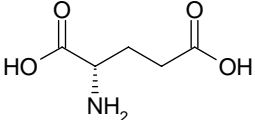
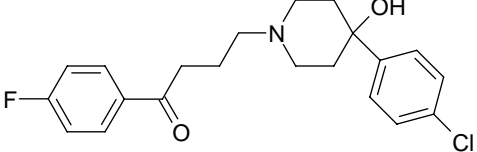
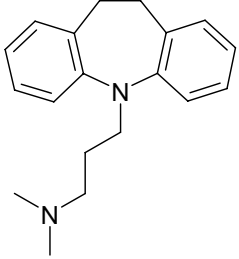


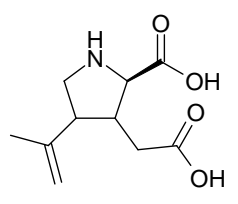
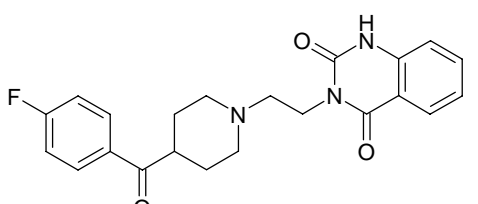
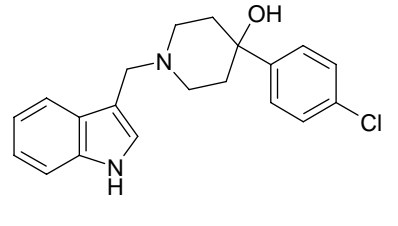
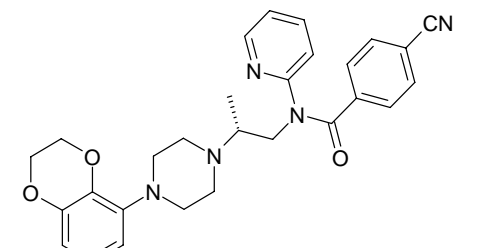
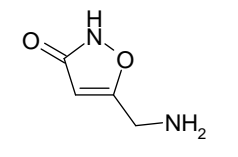
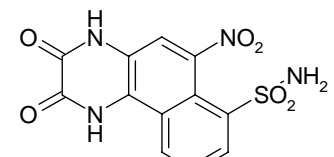
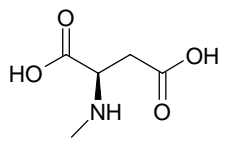
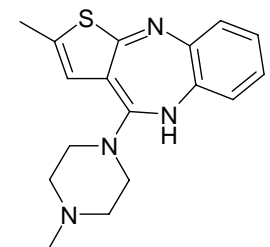
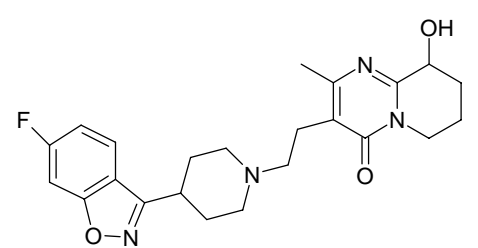
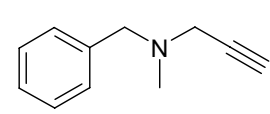
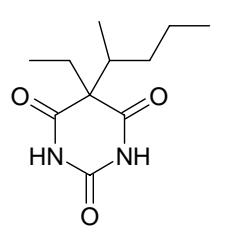
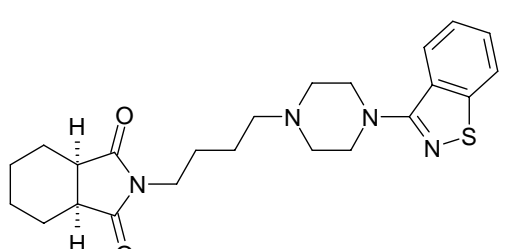
CLORPROMAZINA

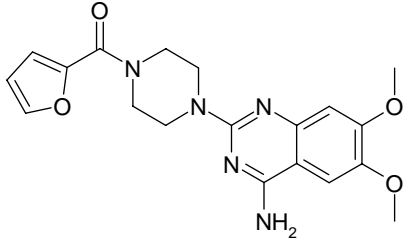
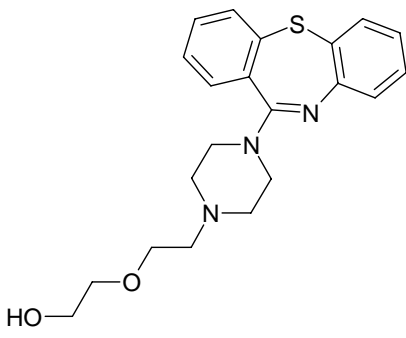
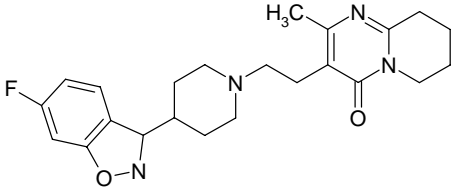
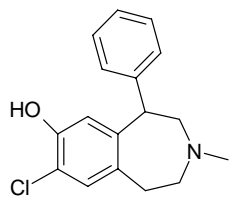
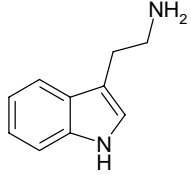
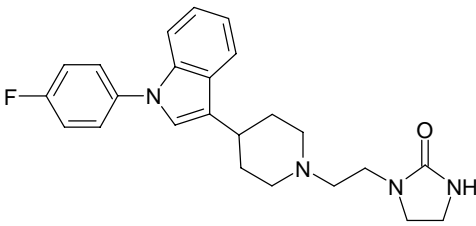
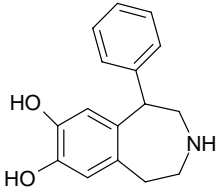
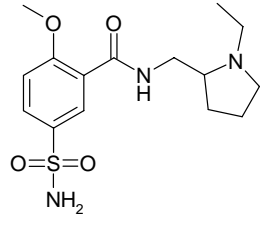
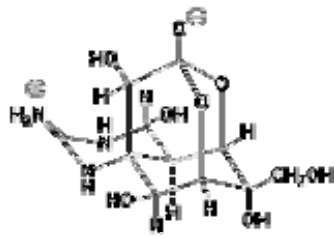
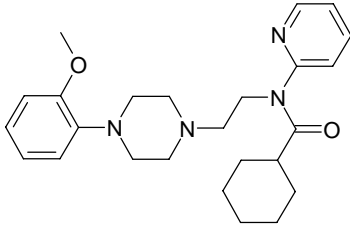


CLOZAPINA

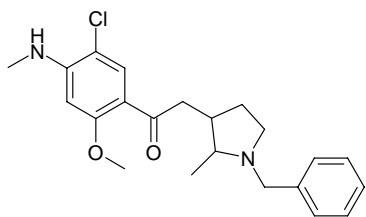


<p>CNQX</p> 	<p>DIZOCILPINA (MK-801)</p> 
<p>DOI</p> 	<p>DOPAMINA</p> 
<p>D-SERINA</p> 	<p>ESPIPERONA</p> 
<p>FENCICLIDINA</p> 	<p>FLUOXETINA</p> 
<p>GLICINA</p> 	<p>GLUTAMATO</p> 
<p>HALOPERIDOL</p> 	<p>IMIPRAMINA</p> 

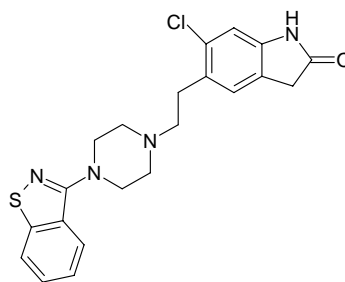
<p>KAINATO</p> 	<p>KETANSERINA</p> 
<p>L-741</p> 	<p>LECOZOTAN</p> 
<p>MUSCIMOL</p> 	<p>NBQX</p> 
<p>NMDA</p> 	<p>OLANZAPINA</p> 
<p>PALIPERIDONA</p> 	<p>PARGILINA</p> 
<p>PENTOBARBITAL</p> 	<p>PEROSPIRONA</p> 

<p>PRAZOSINA</p> 	<p>QUETIAPINA</p> 
<p>RISPERIDONA</p> 	<p>SCH 23390</p> 
<p>SEROTONINA</p> 	<p>SERTINDOL</p> 
<p>SKF 38393</p> 	<p>SULPIRIDA</p> 
<p>TETRODOTOXINA</p> 	<p>WAY 100.635</p> 

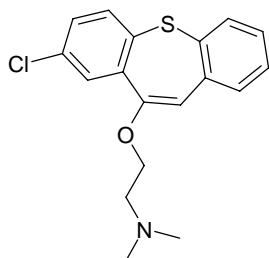
YM-09151-2 (NEMONAPRIDA)



ZIPRASIDONA



ZOTEPINA



ANEXO III

FRAGA, C.A.M.; MENEGATTI, R.; BARREIRO, E.J.; NEVES, G.; BETTI, A.H.; KLIEMANN, M.; RATES, S.M.K.; TASSO, L.; CONRADO, D.J.; DALLA COSTA, T.; OLIVEIRA, V.; NOËL, F. Descoberta de novos protótipos *N*-fenilpiperazínicos candidatos a fármacos antipsicóticos atípicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2010.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Gilda Angela Neves

Filiação: Luiz Sérgio Neves e Nadia Silvana Neves

Data de Nascimento: 26 de julho de 1979

Naturalidade: Caxias do Sul - RS

Nacionalidade: Brasileira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Período: dezembro de 2005 a julho de 2009.

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Período: setembro de 2001 a setembro de 2003.

Farmácia Industrial

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Período: dezembro de 2001 a julho de 2005.

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Período: março de 1997 a julho de 2001.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Universidade de Caxias do Sul – UCS

Professor Assistente I

Disciplinas ministradas: Farmacologia, Química Farmacêutica e Síntese Orgânica de Fármacos

Período: março de 2005 até o presente

Pró-Vida Farmácia Ltda.

Farmacêutico Responsável Técnico

Período: março a setembro de 2004.

ARTIGOS PUBLICADOS

ANTONIO, C.B.; COSTA, T.D.; NEVES, G.; RATES, S.M.K. Métodos de transposição de doses obtidas em farmacologia pré-clínica para ensaios clínicos fase 1: antipsicóticos como estudo de caso. **Latin American Journal of Pharmacy** (*in press*), 2009.

FRAGA, C.A.M.; MENGATTI, R.; BARREIRO, E.J.; NEVES, G.; BETTI, A.H.; KLIEMANN, M.; RATES, S.M.K.; TASSO, L.; CONRADO, D.J.; DALLA COSTA, T.; OLIVEIRA, V.; NOEL,

F. Descoberta de novos protótipos *N*-fenilpiperazínicos heteroarilazóicos candidatos a fármacos antipsicóticos atípicos. **Revista Virtual de Química** (*in press*), 2009.

NEVES, G.; BETTI, A.H.; ANTONIO, C.B.; PRANKE, M.A.; KLIEMANN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; NOËL, F.; RATES, S.M.K. LASSBio-579: a new antipsychotic lead compound active on models of schizophrenia positive symptoms. **Psychopharmacology** (submetido), 2009.

NEVES, G.; MENEGATTI, R.; ANTONIO, C.B.; GRAZZIOTTIN, L.R.; VIEIRA, R.O.; RATES, S.M.K.; NOËL, F.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Searchin multiple ligands for schizphrenia treatment: Discovery of orally active heterocyclic *N*-phenylpiperazine prototypes acting at D₂-like, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** (submetido), 2009.

NEVES, G.; KLIEMANN, M.; BETTI, A.H.; CONRADO, D.J.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA COSTA, T.; RATES, S.M.K. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the *N*-phenylpipezine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 89: 23-30, 2008.

CONRADO, D.J.; VERLI, H.; NEVES, G.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; DALLA COSTA, T.C. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototype. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60: 699-707, 2008.

FENNER, R.; ZIMMER, A.R.; NEVES, G.; KLIEMANN, M.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Hypnotic effect of ecdysterone isolated from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18: 170-176, 2008.

TASSO, L.; NEVES, G.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.; EIFLER-LIMA, V.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 26 (2): 194-202, 2005.

NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova** 27 (6): 949-957, 2004.

AMARAL, P.A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V.L. Química combinatória: Moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 39 (4): 351-363, 2004.

NEVES, G.; FENNER, R.; HECKLER, A.P.; VIANA, A.F.; TASSO, L.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; DALLA-COSTA, T.; RATES, S.M.K. Dopaminergic profile of new heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivatives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36 (5): 625-9, 2003.

TASSO, L.; NEVES, G.; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.; EIFLER-LIMA, V.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Validated HPLC method for determination of LASSBio-581, a new heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivative, in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 33 (5): 1127-1133, 2003.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRO, V.F.; PERREIRA, E.F.R.; AL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A.T.; ALBUQUERQUE, E.X.; NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D₂ receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 11: 4807-13, 2003.

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 73: 261-9, 2000.

DAUDT, R.; VON POSER, G.L.; NEVES, G.; RATES, S.M.K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from south Brazil. **Phytotherapy Research**, 14: 344-6, 2000.

PROPRIEDADE INTELECTUAL

BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; NEVES, G.; DALLA-COSTA, T.C.T.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; EIFLER-LIMA, V.L.; MENEGATTI, R. **Uso de Derivados N-Fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos**. INPI, PI PI0405418-0, 2004.

BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; NEVES, G.; DALLA-COSTA, T.C.T.; TASSO, L.; FRAGA, C.A.M.; EIFLER-LIMA, V.L.; MENEGATTI, R. **Novos Derivados N-Fenilpiperazínicos e Composições Farmacêuticas Contendo os Mesmos**. INPI, PI 0303465-8, 2003.