

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

**Busca de novas entidades químicas para o desenvolvimento de novos fármacos  
antipsicóticos: avaliação pré-clínica de derivados *N*-fenilpiperazínico, *N*-  
benziltiazolidínico e imidazolidínico**

**ANDRESA HEEMANN BETTI**

**PORTO ALEGRE, 2013**



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

**Busca de novas entidades químicas para o desenvolvimento de novos fármacos  
antipsicóticos: avaliação pré-clínica de derivados *N*-fenilpiperazínico, *N*-  
benziltiazolidínico e imidazolidínico**

Tese apresentada por **Andresa Heemann Betti**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2013

Tese de Doutorado 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 aprovado em 31.07.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Nadja Schröder

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rosane Gomez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Betti, Andresa Heemann

Busca de novas entidades químicas para o desenvolvimento de novos fármacos antipsicóticos: avaliação pré-clínica de derivados *N*-fenilpiperazínico, *N*-benziltiazolidínico e imidazolidínico / Andresa Heemann Betti. – 2013. 197 f.

Orientador: Stela Maris Kuze Rates.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR - RS, 2013.

1. Esquizofrenia. 2. Antipsicóticos. 3. Derivados *N*-fenilpiperazínicos. 4. Derivados *N*-benziltiazolidínicos. 5. Derivados imidazolidínicos. I. Rates, Stela Maris Kuze, orient. II. Título.

*Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, no Brasil e na França, e aos Laboratórios de Psicofarmacologia Experimental (UFRGS), Laboratório de Farmacologia Molecular e Bioquímica (UFRJ), Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (UFRJ), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (UFPE), Service Commun d'Analyse Comportementale (França) e INSERM U982 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 982) (França), que disponibilizaram todos os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.*



## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates por ter me ensinado acima de tudo a ser ética nos meus experimentos e que despertou em mim esse enorme interesse pela Ciência.

À CAPES pelo apoio financeiro através de bolsa de doutorado e bolsa de doutorado para estudo no exterior.

Aos Dr. David Vaudry, Dr. Jean-Luc do Rego e Dr. Jean-Claude do Rego pelo acolhimento na França.

Aos Prof. Dr. François Noel, Dr. Andréia Buffon, Dr. Eliane Dallegrave, Dr. David Driemeier pelos ensinamentos e colaborações.

Aos Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga e Eliezer Barreiro pela síntese e caracterização das moléculas da série LASSBio-UFRJ.

Aos Prof. Dr. Ivan Pitta, Suely Galdino (*i.m.*) e Maria do Carmo Lima pela síntese e caracterização das moléculas da série NUPIT-UFPE.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia, UFRGS: Camila, Ana Cristina, Vivian, Diego, Eveline, Liz, Milene, Fernanda, Andressa e Gilda pela amizade e ajuda.

A minha mãe Maria Bernardete, minha eterna incentivadora e exemplo de vida!

Ao meu esposo Luciano pela compreensão, tolerância e presença nos momentos fundamentais.





## RESUMO

### **Busca de novas entidades químicas para o desenvolvimento de novos fármacos antipsicóticos: avaliação pré-clínica de derivados *N*-fenilpiperazínico, *N*-benziltiazolidínico e imidazolidínico**

A esquizofrenia é uma doença que acomete cerca de 1% da população mundial. Existem mais de vinte fármacos antipsicóticos disponíveis no mercado, entretanto, pelo menos um terço dos pacientes é refratário ao tratamento ou descontinua a terapia devido à baixa tolerabilidade ou eficácia incompleta desses medicamentos. No âmbito desta Tese de Doutorado, inserida em um Programa de Desenvolvimento de Novos Fármacos, novas moléculas com padrões moleculares distintos (LASSBio-1422, derivado *N*-fenilpiperazínico; FPY-3, derivado *N*-benziltiazolidínico; PT-31, derivado imidazolidínico) foram estudadas, visando à descoberta de novos agentes terapêuticamente úteis no tratamento da esquizofrenia. Essas moléculas foram avaliadas em modelos animais preditivos de sintomas positivos da esquizofrenia (escalada induzida por apomorfina e hiperlocomoção induzida por cetamina), modelo que avalia o estado pré-atencional (inibição de sobressalto por pré-pulso), modelo de memória (reconhecimento de objeto novo), e modelos animais que avaliam sintomas extrapiramidais, efeitos motores e sedação (catatonia, locomoção, rota-rod e tempo de sono barbitúrico). LASSBio-1422, um antagonista de receptores do tipo D<sub>4</sub>, mostrou-se eficaz em modelos animais preditivos de sintomas positivos da esquizofrenia, sem causar prejuízo motor nem sedação. Além disso, preveniu o prejuízo pré-atencional induzido por apomorfina, (±)-DOI e cetamina. Ainda, não comprometeu as memórias de curta e longa duração, além de proteger a última contra o prejuízo induzido pela cetamina. FPY-3 também foi efetivo nos modelos animais preditivos de sintomas positivos da esquizofrenia, sem causar efeitos extrapiramidais, motores e sedação. A maior contribuição dessa molécula foi a ausência de toxicidade após 14 dias de tratamento, sugerindo uma melhora no metabolismo lipídico, com menor incidência de síndrome metabólica, um dos principais efeitos adversos da segunda geração de antipsicóticos. FPY-3 também protegeu neurônios primários cerebelares contra a toxicidade induzida pelo glutamato. PT-31, por sua vez, possui um padrão molecular inédito, nunca antes

estudado para atividade antipsicótica. PT-31, um agonista  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico, mostrou-se eficaz no tratamento de sintomas positivos e, principalmente, cognitivos, que ainda representam um dos principais desafios no tratamento da esquizofrenia. Ainda mostrou um efeito neuroprotetor em cultura primária de neurônios. Por fim, sugerimos que LASSBio-1422, FPY-3 e PT-31 possam representar moléculas promissoras para inclusão em estratégias de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquizofrenia.

**Palavras-chave:** esquizofrenia, antipsicóticos, derivado *N*-fenilpiperazínico, derivado *N*-beziltiazolidínico, derivado imidazolidínico, inibição de sobressalto por pré-pulso, reconhecimento de objeto novo, ensaios de radioligação, excitotoxicidade, síndrome metabólica.

## ABSTRACT

### **Searching for new chemical entities for the development of new antipsychotic drugs: preclinical evaluation of *N*-phenylpiperazine, *N*-benziltiazolidine and imidazolidine derivatives**

Schizophrenia is a disease that affects around 1% of the world population. There are more than twenty antipsychotic drugs available on the market, however, at least one third of patients are refractory to the treatment or discontinuing therapy due to the poor tolerability or incomplete efficacy of these drugs. In the present Thesis, inserted into a New Drugs Development Program, new molecules with distinct molecular patterns (LASSBio-1422, *N*-phenylpiperazine derivative; FPY-3, *N*-benziltiazolidine derivative; PT-31, imidazolidine derivative) were studied, aiming to discover new agents therapeutically useful in the treatment of schizophrenia. These molecules were evaluated in animal models predictive of schizophrenia positive symptoms (apomorphine-induced climbing and ketamine-induced hyperlocomotion), a model that evaluates the preattentive process (prepulse inhibition), a memory model (novel object recognition task), and models that assess extrapyramidal symptoms, sedation and motor effects (catalepsy, locomotion, rota-rod and barbiturate sleeping time). LASSBio-1422, a D<sub>4</sub> antagonist, was effective in animal models predictive of schizophrenia positive symptoms without inducing motor impairment or sedation. Furthermore, it prevented the preattentive injury induced by apomorphine, (±)-DOI and ketamine. Still, it did not compromise short neither long-term memories, and protected the latter against the deficit induced by ketamine. FPY-3 was also effective in animal models predictive of schizophrenia positive symptoms without inducing extrapyramidal symptoms, motor impairment and sedation. The major contribution of this molecule was the lack of toxicity after 14 days of treatment, suggesting an improvement in the lipid metabolism and lower incidence of metabolic syndrome, a major adverse effect of the second generation antipsychotics. FPY-3 also protected cerebellum primary cells against the toxicity induced by glutamate. PT-31, in turn, has a distinct molecular pattern, never before studied for the antipsychotic activity. PT-31, an α<sub>2A</sub>-adrenoceptor agonist, was effective in treating positive symptoms, and especially in treating cognitive symptoms, which remains a major challenge in the treatment of schizophrenia. It still showed a

neuroprotective effect in primary cell cultures. Finally, we suggest that LASSBio-1422, FPY-3 and PT-31 may represent promising molecules for inclusion in strategies for the development of new drugs for treating schizophrenia.

**Keywords:** schizophrenia, antipsychotics, *N*-phenylpiperazine derivative, *N*-benziltiazolidine derivative, imidazolidine derivative, prepulse inhibition, novel object recognition task, binding assays, excitotoxicity, metabolic syndrome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química de LASSBio-1422, FPY-3 e PT-31.....	22
<b>Figura 1.1</b> Planejamento molecular de LASSBio-1422.....	10
<b>Figura 1.2</b> Rota de síntese molecular de LASSBio-1422.....	11
<b>Figura 1.3</b> Ensaio de GTP-shift: curvas de competição aos receptores D <sub>4</sub> de dopamine e LASSBio-1422.....	23
<b>Figura 1.4</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de escalada induzido por apomorfina.....	24
<b>Figura 1.5</b> Efeito combinado de LASSBio-1422 com antipsicóticos no teste de escalada induzida por apomorfina.....	25
<b>Figura 1.6</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de hiperlocomoção induzida por cetamina.....	26
<b>Figura 1.7</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de inibição de sobressalto por pré-pulso.....	28
<b>Figura 1.8</b> Efeito de LASSBio-1422 sobre a memória de curta e longa duração no modelo de reconhecimento de objeto novo.....	29
<b>Figura 1.9</b> Efeito do tratamento pré-treino de LASSBio-1422 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	30
<b>Figura 1.10</b> Efeito do tratamento pós-treino de LASSBio-1422 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	31
<b>Figura 1.11</b> Efeito do tratamento pré-MLD de LASSBio-1422 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	32
<b>Figura 2.1</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no modelo de escalada induzida por apomorfina.....	86
<b>Figura 2.2</b> Efeito de FPY-3 no modelo de escalada induzida por apomorfina.....	86
<b>Figura 2.3</b> Efeito de FPY-3 no teste de hiperlocomoção indizida por cetamina.....	87
<b>Figura 2.4</b> Efeito de FPY-3 no teste de inibição de sobressalto por pré-pulso.....	88

<b>Figura 2.5</b> Controle de ganho de massa corporal durante 14 dias após tratamento agudo com FPY-3.....	89
<b>Figura 2.6</b> Controle de ganho de massa corporal durante 14 dias dos camundongos tratados diariamente com FPY-3.....	89
<b>Figura 2.7</b> Estrutura química dos compostos sintetizados, FPT-2, FPT-4 e FPY-3.....	90
<b>Figura 3.1</b> Circuito básico das vias neuroquímicas envolvidas na esquizofrenia.....	102
<b>Figura 3.2</b> Efeito de FPY-3 em cultura primária de neurônios cerebelares indiferenciados.....	110
<b>Figura 3.3</b> Efeito de FPY-3 em cultura primária de neurônios cerebelares em 24h de tratamento na ausência ou na presença de glutamato.....	112
<b>Figura 3.4</b> Efeito de FPY-3 em cultura primária de neurônios cerebelares em 48h de tratamento na ausência ou na presença de glutamato.....	113
<b>Figura 3.5</b> Efeito de FPY-3 em cultura primária de neurônios cerebelares em 72h de tratamento na ausência ou na presença de glutamato.....	114
<b>Figura 3.6</b> Efeito de FPY-3 em cultura primária de neurônios cerebelares em 48h de tratamento com MK-801, EGLU e MPEP.....	115
<b>Figura 4.1</b> Estrutura molecular de PT-31.....	133
<b>Figura 4.2</b> Efeito de PT-31 no teste de escalada induzida por apomorfina.....	140
<b>Figura 4.3</b> Efeito de PT-31 no teste de hiperlocomoção induzida por cetamina.....	141
<b>Figura 4.4</b> Efeito de PT-31 no teste de inibição de sobressalto por pré-pulso.....	142
<b>Figura 4.5</b> Efeito de PT-31 sobre a memória de curta e longa duração no modelo de reconhecimento de objeto novo.....	144
<b>Figura 4.6</b> Efeito do tratamento pré-treino de PT-31 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	145
<b>Figura 4.7</b> Efeito do tratamento pós-treino de PT-31 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	146

<b>Figura 4.8</b> Efeito do tratamento pré-MLD de PT-31 no modelo de reversão do prejuízo de memória induzido por cetamina.....	147
<b>Figura 4.9</b> Efeito de PT-31 no teste de campo aberto.....	149
<b>Figura 4.10</b> Efeito de PT-31 em cultura primária de neurônios cerebelares.....	151
<b>Figura 4.11</b> Efeito de PT-31 em cultura primária de neurônios cerebelares na presença de glutamato.....	152





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Afinidade de LASSBio-1422 pelos receptores <i>D<sub>2</sub>-like</i> , <i>D<sub>4</sub></i> , <i>5-HT<sub>1A</sub></i> , <i>5-HT<sub>2A</sub></i> .....	21
<b>Tabela 1.2</b> Tempo total de exploração dos objetos no modelo de reconhecimento de objeto novo.....	33
<b>Tabela 1.3</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de campo aberto.....	34
<b>Tabela 1.4</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de catatonía.....	35
<b>Tabela 1.5</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de rota-rod.....	36
<b>Tabela 1.6</b> Efeito de LASSBio-1422 no teste de tempo de sono barbitúrico.....	36
<b>Tabela 2.1</b> Afinidades de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 por receptores do tipo <i>D<sub>2</sub>-like</i> , <i>5-HT<sub>1A</sub></i> e <i>5-HT<sub>2A</sub></i> .....	67
<b>Tabela 2.2</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de indução de catatonía.....	70
<b>Tabela 2.3</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	71
<b>Tabela 2.4</b> Efeito de FPY-3 no teste de exposição ao campo aberto.....	72
<b>Tabela 2.5</b> Efeito de FPY-3 no teste de potenciação do sono barbitúrico.....	73
<b>Tabela 2.6</b> Massa relativa corporal dos órgãos rins, adrenais, baço, fígado, coração, pulmão e cérebro dos camundongos tratados por 14 dias com FPY-3.....	76
<b>Tabela 2.7</b> Análises Bioquímicas após 14 dias de tratamento com FPY-3.....	77
<b>Tabela 2.8</b> Análises Hematológicas após 14 dias de tratamento com FPY-3.....	78
<b>Tabela 4.1</b> Tempo total de exploração dos objetos no modelo de reconhecimento de objeto.....	148
<b>Tabela 4.2</b> Efeito de PT-31 no teste de indução de catatonía.....	150
<b>Tabela 4.3</b> Efeito de PT-31 no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	151



## ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
ANOVA	Análise de Variância
APO	Apomorfina
CATIE	Clinical Antipsychotic Trials in Intervention Effectiveness
CIOMS	Council for International Organizations of Medicinal Sciences
CFCM	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CLO	Clozapina
CNEM	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DA	Dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
(±)-DOI	1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride
EGLU	(2S)-α-Ethylglutamic acid
EPS	Sintomas Extrapiramidais
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FPT-2	3-(4-Cloro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3 <i>H</i> -[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona
FPT-4	3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3 <i>H</i> -[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona
FPY-3	3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-(1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona
Glu	Glutamato
NIH	National Institutes of Health
NUPIT	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
HAL	Haloperidol
CI <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50
i.p.	Intra-peritoneal
KET	cetamina

K <sub>i</sub>	Constante de Dissociação
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LASSBio-579	1-[1-(4-chlorophenyl)-1 <i>H</i> -4-pyrazolylmethyl]-4-phenylhexahydropyperazine
LASSBio-1422	1-((5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methyl)-4-(4-fluorophenyl)piperazine
mGluR	Receptores Metabotrópicos de Glutamato
MK-801	(+)-MK-801 hydrogen maleate
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCP	Fenciclidina
p.o.	<i>per os</i>
POP	2,5-diphenyloxazole
POPOP	1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene
PT-31	(3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona)
RMN-C <sup>13</sup>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN-H <sup>1</sup>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotações por Minuto
s.c.	Sub-cutâneo
SAL	Solução Salina 0,9%
SNC	Sistema Nervoso Central
Veh	Vehicle
v.o.	Via oral
WAY100635	(S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	01
<b><i>CAPÍTULO I</i></b>	
LASSBio-1422: a new D <sub>4</sub> ligand with efficacy in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia.....	05
<b><i>CAPÍTULO II</i></b>	
Relatório Descritivo de Patente de Invenção: Derivados benziltiazolidinônicos úteis no tratamento da esquizofrenia.....	49
<b><i>CAPÍTULO III</i></b>	
Avaliação do potencial efeito neuroprotetor de FPY-3, um derivado benziltiazolidinônico.....	95
<b>RESUMO</b> .....	97
<b>ABSTRACT</b> .....	98
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	99
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	115
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	101
3.1 Excitotoxicidade.....	101
3.2 Interneurônios GABAérgicos.....	101
3.3 Hipofunção de receptores NMDA.....	103
3.4. Cultura primária de neurônios cerebelares como uma ferramenta de estudo da excitotoxicidade .....	104
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	105
4.1 Preparação de FPY-3.....	106
4.2 Animais.....	106
4.3 Ética.....	106

4.4 Drogas e Fármacos.....	107
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> .....	107
4.5.1 <i>Cultura primária de neurônios cerebelares</i> .....	107
4.5.2 <i>Estudo do efeito de FPY-3 sobre culturas primárias de neurônios cerebelares e do seu efeito neuroprotetor em um modelo de morte neuronal induzida por glutamato</i> .....	108
4.5.3 <i>Efeito de FPY-3 em associação com diferentes antagonistas glutamatérgicos no modelo de excitotoxicidade em cultura primária de neurônios diferenciados</i> .....	108
4.5.4 <i>Avaliação da viabilidade celular</i> .....	109
4.6 Análise estatística.....	109
<b>5. RESULTADOS</b> .....	110
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	110
5.1.1 <i>Efeito de diferentes concentrações de FPY-3 em cultura primária de neurônios indiferenciados</i> .....	110
5.1.2 <i>Efeito de diferentes concentrações de FPY-3 em cultura primária de neurônios diferenciados em presença de glutamato</i> .....	111
5.1.3 <i>Efeito de FPY-3 em associação com diferentes antagonistas glutamatérgicos no modelo de excitotoxicidade em cultura primária de neurônios diferenciados</i> .....	115
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	116
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	119
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	119
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<i>PT-31, a new <math>\alpha_2</math>-adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice</i> .....	127
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	165
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	173

## APRESENTAÇÃO

A presente tese foi desenvolvida em parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFRGS), o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal (UFRJ) e o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (UFPE), iniciada no âmbito do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - PROCAD - CAPES (projeto nº 0092/05-1), e é apoiada pelo INCT de Fármacos e Medicamentos - INCT-INOVAR - CNPq. Representa a continuidade de um grande projeto, iniciado em 1999 que contempla o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novas substâncias protótipo candidatas a fármacos neuroativos. Este projeto teve como marco o desenho estrutural de uma nova família de derivados *N*-fenilpiperazínicos, propostos como ligantes de receptores dopaminérgicos candidatos a fármacos úteis no tratamento da esquizofrenia (Menegatti, 2001).

Parte deste trabalho foi desenvolvido na França, na Université de Rouen, no INSERM Unité 982, no laboratório de Facteurs Neurotrophiques et Différenciation Neuronale, e na Faculté de Médecine et Pharmacie, no laboratório Service Commun d'Analyse Comportementale, através de bolsa CAPES-PDEE (Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior).

A arquitetura molecular dos novos derivados *N*-fenilpiperazínicos foi planejada pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) através da técnica de hibridação molecular entre o antipsicótico atípico clozapina, devido ao seu alto grau de restrição conformacional e interessante perfil farmacológico (alta afinidade por receptores D<sub>4</sub>) (Graeff et al., 1999) e o composto L-741, ligante seletivo de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (Kulagowski et al., 1996), de modo a manter os grupamentos farmacofóricos necessários para interação com o bioreceptor-alvo, os receptores dopaminérgicos.

O emprego da estratégia de hibridação molecular da estrutura dos protótipos deu origem a três derivados: LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581 (Menegatti et al., 2003). Entre eles, destacou-se LASSBio-579, o qual apresentou um perfil farmacológico pré-clínico, em roedores, compatível com o esperado para um antipsicótico atípico. Em setembro de 2003, foi realizado um depósito de pedido de patente para esta série de

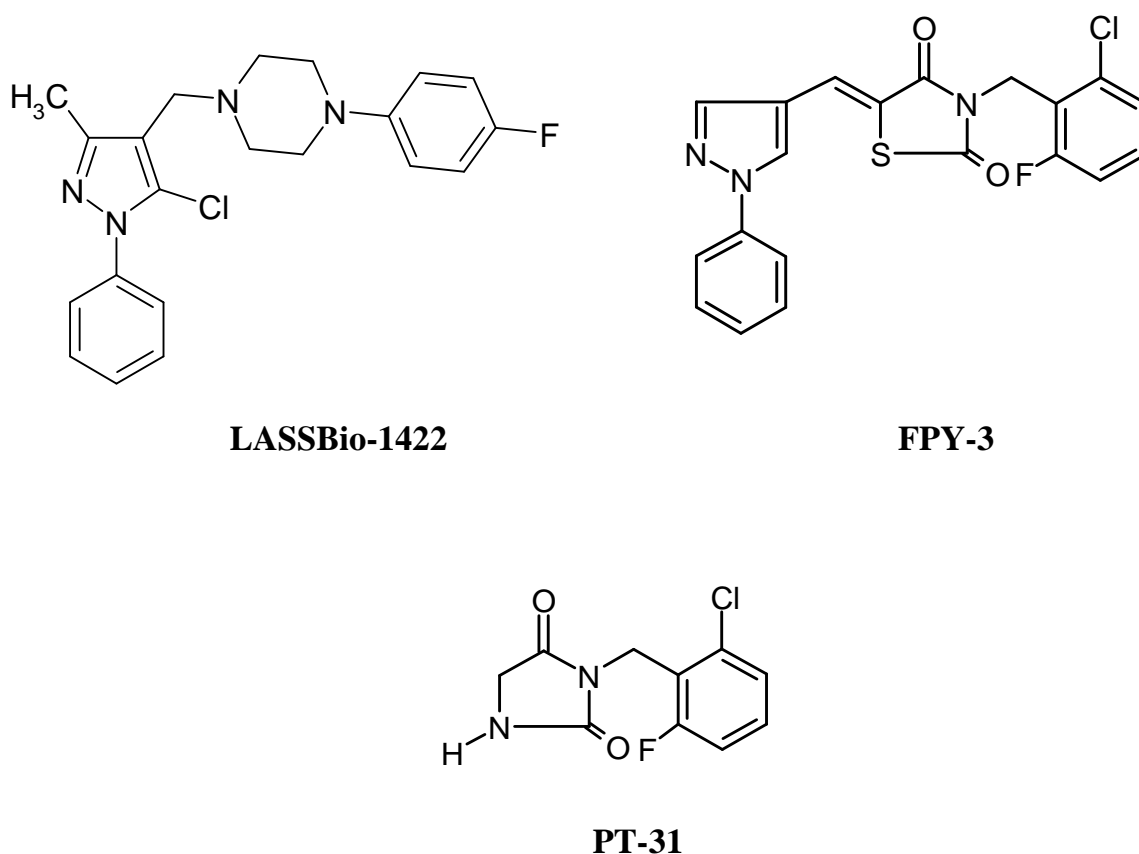
moléculas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (PI0303465-8). Neves e colaboradores (2003; 2008; 2009) verificaram que esse composto age em três diferentes sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia da esquizofrenia: a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e glutamatérgica, conforme verificado em estudos de radioligação para receptores  $D_2$ -like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, e estudos de eletrofisiologia para canais do tipo NMDA. Além disso, apresenta ação antidopaminérgica *in vivo*, demonstrada em três modelos animais preditivos de atividade antipsicótica (sintomas positivos): inibição da estereotipia anfetamínica, bloqueio de escalada induzida por apomorfina e hipotermia anfetamínica. Estes efeitos ocorreram em doses que não induzem catatonia, um comportamento análogo aos sintomas extrapiramidais, indesejável e decorrente do tratamento com antipsicóticos típicos. Também foi demonstrada *in vivo* uma ação antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> e agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Porém, algumas limitações também foram verificadas em seu perfil farmacológico. LASSBio-579 induziu um prejuízo na coordenação motora em roedores e apresentou um perfil farmacocinético pouco adequado à utilização clínica (Conrado et al., 2008).

Assim, visando uma otimização farmacológica, através do aumento da diversidade estrutural, a equipe do LASSBio – UFRJ sintetizou novos análogos orto-substituídos de LASSBio-579: LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 e LASSBio-1422. Essas moléculas foram avaliadas no âmbito da minha Dissertação de Mestrado. LASSBio-1412, LASSBio-1413 e LASSBio-1422 foram ativos no modelo de escalada induzida por apomorfina (15 mg/kg, v.o.) sem induzir catatonia.

O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT – UFPE), por sua vez, trocou o núcleo piperazínico dos compostos LASSBio por um núcleo tiazolidínico, dando origem a nove derivados *N*-benziltiazolidínicos: FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPW-1. Estes compostos também foram avaliados farmacologicamente através de estudos *in vivo* e *in vitro* na minha Dissertação de Mestrado. De todas as substâncias avaliadas, apenas FPT-2, FPT-4 e FPY-3 inibiram o comportamento de escalada induzido por apomorfina sem induzir catatonia em roedores. Por fim, o NUPIT sintetizou um derivado imidazolidinona, PT-31, cujo padrão molecular nunca havia sido avaliado para a atividade antipsicótica.



Para dar continuidade à busca de um potencial antipsicótico, três dessas moléculas, com padrões moleculares diferentes, foram eleitas levando em consideração seus resultados anteriores: LASSBio-1422 e FPY-3 (Figura 1). A terceira molécula, PT-31 (Figura 1) foi escolhida por seu padrão molecular diferenciado das demais, para o qual foi proposta atividade agonista de receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico. O receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico tem sido visto como um novo alvo para a atividade antipsicótica e neuroprotetora (Ma et al., 2004; Dong et al., 2008).



**Figura 1.** Estrutura química de LASSBio-1422, FPY-3 e PT-31.

Este trabalho será apresentado na forma de quatro capítulos. No primeiro capítulo, serão abordados os resultados obtidos para LASSBio-1422 na forma de manuscrito submetido ao periódico *Neuropharmacology*. No segundo capítulo, será apresentado o Relatório de Invenção de FPY-3, encaminhado ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) para pedido de depósito de patente (Protocolo BR 10 2013 022402 2, em 02/09/2013). No terceiro capítulo, abordaremos o efeito de FPY-3 sobre culturas primárias de neurônios cerebelares. Por fim, no quarto capítulo, será abordado o estudo do efeito de PT-31 em modelos animais de sintomas positivos e cognitivos da

esquizofrenia, e seu efeito em culturas primárias de neurônios cerebelares. Esse último capítulo será apresentado na forma de manuscrito a ser submetido ao periódico *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, após solicitação de pedido de depósito de patente.

## ***CAPÍTULO I***

*LASSBio-1422: a new D<sub>4</sub> ligand with efficacy in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia*

---



## **LASSBio-1422: a new D<sub>4</sub> ligand with efficacy in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia**

Andresa Heemann Betti<sup>a</sup>, Camila Boque Antonio<sup>a</sup>, Thais Emanuelle Tavares Pompeu<sup>b,c</sup>, Thaise da Silva Martins<sup>d,e</sup>, Diego Hasse<sup>a</sup>, Vivian Herzfeldt<sup>a</sup>, Eveline Dischkaln Stolz<sup>a</sup>, Carlos Alberto Manssour Fraga<sup>c,d,e,f</sup>, Eliezer J. Barreiro<sup>c,d,e,f</sup>, François G. Noël<sup>b,c,f</sup>, Stela Maris Kuze Rates<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, Lab 505C, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brazil.*

<sup>b</sup>*Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Sala J1-17, CEP 21941-912, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.*

<sup>c</sup>*Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.*

<sup>d</sup>*Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, P.O. Box 68023, CEP 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.*

<sup>e</sup>*Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.*

<sup>f</sup>*Programa de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-902, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil.*

\*Corresponding author:

Stela Maris Kuze Rates Ph.D.

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752 – Lab 505C, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS - Brazil

E-mail: stela.rates@ufrgs.br

Phone: 55-51-33085455; FAX: 55-51-33085437

## ABSTRACT

Considering that more effective and safer drugs to treat schizophrenia are still needed, a new functionalized *N*-phenylpiperazine derivative (LASSBio-1422) was planned from our lead compound LASSBio-579. The aim of this study was to evaluate the potential antipsychotic activity of LASSBio-1422 through mice models predictive of positive and cognitive symptoms of schizophrenia, and its binding profile. LASSBio-1422 (5 and 25 mg/kg p.o.) inhibited the apomorphine-induced climbing as well as the ketamine-induced hyperlocomotion (0.01; 0.1; 1, 5 mg/kg p.o.) demonstrating promising results in two animal models predictive of efficacy on positive symptoms. LASSBio-1422 (5 mg/kg p.o.) was also evaluated in two models predictive of cognitive symptoms. It was effective in preventing the prepulse impairment induced by apomorphine, ( $\pm$ )-DOI and ketamine. LASSBio-1422 also demonstrated an important effect in the ketamine-induced memory impairment, where it was active in three different moments of the memory processes: acquisition, consolidation, retrieval. Potential extrapyramidal side-effects, neurotoxicity and sedation were assessed by catatonia, rota-rod, locomotion and barbiturate sleeping time. LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.) did not affect any of the parameters observed, indicating that it does not have neurotoxic, depressant or hypnotic effect. Unlike clozapine, LASSBio-1422 has a much higher affinity for the D<sub>4</sub> receptors than for D<sub>2-like</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. In conclusion, the present study characterizes the new functionalized *N*-phenylpiperazine derivative LASSBio-1422 as an antipsychotic lead compound active in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia, with no propensity for inducing motor side effects, and also with a different binding profile, suggesting a new mechanism of action.

**Keywords:** *N*-phenylpiperazine derivative, LASSBio-579, clozapine, haloperidol, novel object recognition task, D<sub>4</sub> antagonist.

## 1. INTRODUCTION

Antipsychotics remain the current standard of care for mental disorders including schizophrenia (~1% prevalence), and generate over 16 billion dollars worldwide in annual sales (Lieberman et al. 2005). However, the large CATIE trial, sponsored by the US National Institutes of Health, found that 74% of patients discontinue the use of therapy within 18 months due to either poor tolerability or incomplete efficacy, indicating a need for novel therapies (Lieberman et al. 2005).

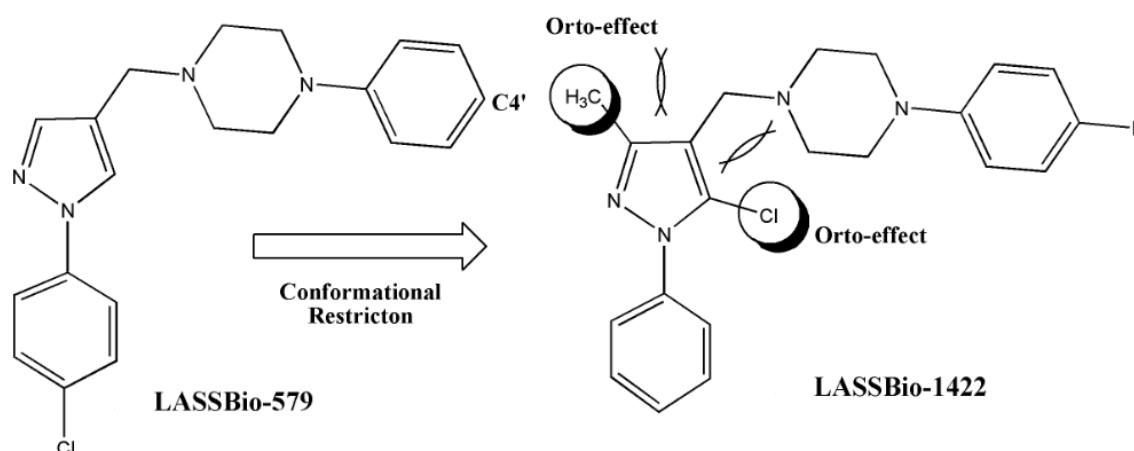
While the initial breakthrough with the discovery of chlorpromazine was a huge step forward, subsequent advances have been small, despite the introduction of many new antipsychotics (McEvoy, 2009). The first generation of antipsychotics, termed conventional or typical antipsychotics, such as haloperidol, inhibit dopamine D<sub>2</sub> receptors and are effective in treating positive symptoms of schizophrenia, but may cause extrapyramidal movement disorders (EPS). Second generation or atypical antipsychotics, such as clozapine, olanzapine and risperidone, inhibit D<sub>2</sub> receptors in conjunction with other receptors, notably 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Snyder and Murphy, 2008). Although the superior tolerability of the second generation antipsychotics with regard to EPS is beyond doubt, new detrimental side-effects, such as metabolic complications, including weight gain, hyperglycemia and hyperlipidemia, have been associated with them (Newcomer, 2007).

Several pharmacological properties have been proposed to account for the atypicality of an antipsychotic drug. These include a high ratio of serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub>/dopamine receptor D<sub>2</sub> antagonism (Meltzer et al. 1989), a high ratio of noradrenaline receptor/D<sub>2</sub> receptor antagonism (Wadenberg et al. 2007), preferential mesolimbic binding (Pillowsky et al. 1997) and fast dissociation of the antipsychotic from the D<sub>2</sub> receptor (Kapur and Seeman, 2001).

Previous studies from our group described the synthesis of a new *N*-phenylpiperazine derivative, LASSBio-579 (1-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-4-pyrazolylmethyl]-4-phenylhexahydropiperazine), designed by molecular hybridization between the prototypes clozapine and L-741, a D<sub>2</sub> antagonist ligand (Menegatti et al. 2003). In vitro assays indicated that LASSBio-579 could act as an agonist at pre-synaptic

dopamine D<sub>2</sub>-like receptors (Menegatti et al. 2003) and binds to D<sub>2-like</sub>, D<sub>4</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors with moderate affinity (Gomes et al. 2013; Neves et al. 2010). Other groups have also demonstrated that this molecular scaffold presents affinity for D<sub>4</sub> receptors (Löber et al. 2006; Tallman et al. 1997). In vivo studies have shown that LASSBio-579 acts on dopaminergic and serotonergic neurotransmission; it prevents the apomorphine-induced climbing behavior, the ketamine-induced hyperlocomotion as well as the prepulse inhibition deficits induced by apomorphine, (±)-DOI and ketamine (Neves et al. 2013) at doses devoided of cataleptogenic effects in mice (Neves et al. 2010). However, high doses of LASSBio-579 (5 and 15 mg/kg p.o.) induced a cataleptic behavior in mice and it impaired motor coordination on rota rod test in a dose dependent manner (Neves et al. 2013).

In the course of our ongoing project aiming to identify molecules as new antipsychotic lead-compounds, a new LASSBio-579 analog, LASSBio-1422, was synthesized based on the following rational design. We have first introduced two isosteric groups, i.e. methyl and chlorine, attached to C-3 and C-5 of the pyrazole ring in order to promote a dissymmetric ortho-effect on the *N*-phenylpiperazine side chain that could adopt a more fixed conformation and, as consequence, present a differentiated molecular recognition profile by the target receptors (Barreiro et al. 2011; Lima and Barreiro, 2005). Moreover, we have placed a fluorine atom at C4' of the *N*-phenylpiperazine ring of LASSBio-579 in order to prevent the main oxidative metabolism site (Gomes et al. 2013) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Design concept of *N*-phenylpiperazine derivative, LASSBio-1422, from the antipsychotic lead-compound, LASSBio-579.

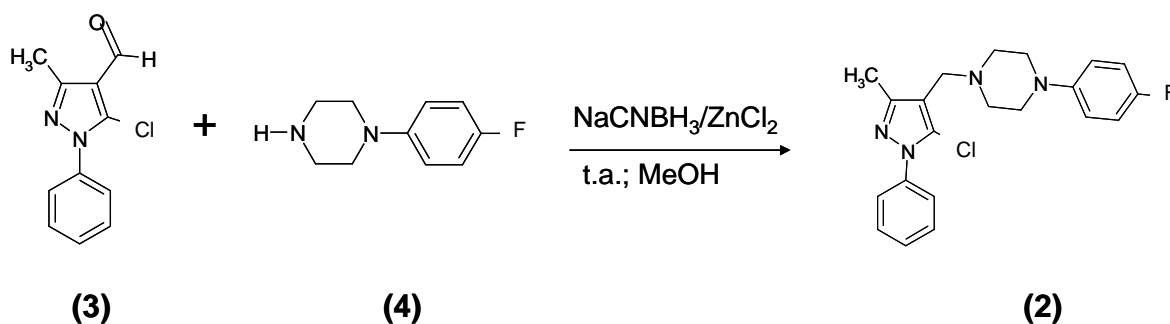


Therefore, the aim of this study was to evaluate LASSBio-1422 in different animal models predictive of positive and cognitive symptoms of schizophrenia, as well as its binding profile to the receptors classically considered as antipsychotic targets.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemistry

LASSBio-1422 (1-((5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-4-(4-fluorophenyl)piperazine) was synthesized and purified following a protocol adapted from Kim and coworkers (1985). Instead of performing a reaction with anhydrous methanol under nitrogen atmosphere we used a reductive amination with NaCNBH<sub>3</sub> and ZnCl<sub>2</sub> (Fig. 2) (Yield: 51%). The structure of *N*-phenylpiperazine derivative LASSBio-1422 was fully characterized by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, IR spectroscopy and mass spectrometry. Moreover, the analytical results for C, H, and N were within ± 0.4% of the theoretical values, assuring a purity superior to 99.5%. Microanalyses were carried out using a FlashEA 1112 Elemental analyzer and Mettler Toledo MT-SICS MX5 balance. Calculated: C (66.53%), H (5.76%), N (9.21%); Determined: C (66.45%), H (5.77%), N (9.25%).



**Fig. 2.** LASSBio-1422 (2) synthesis route. (3) 5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole-4-carbaldehyde. (4) 4-fluorophenyl) piperazine.

## **2.2 *In vitro* assays**

### **2.2.1 Radioligands and drugs**

[<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (82.7 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (154.2 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-ketanserin (67 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-glutamate (51.1 Ci/mmol), were purchased from New England Nuclear Life Science Products, PerkinElmer, USA. Ketanserin tartrate, pargilyne, serotonin creatinine sulphate, L-glutamic acid monosodium salt hydrate and (-)-sulpiride were purchased from Sigma, São Paulo, Brazil.

The test substances and (-)-sulpiride were dissolved in DMSO to obtain stock solutions. Subsequent dilutions were prepared in incubation buffer. At the final concentration used (0.2% at most), DMSO had no effect in our assays.

### **2.2.2. Tissue preparation**

Adult male Wistar rats (200-300 g) were euthanized by decapitation. The brains were immediately removed on ice and hippocampus, striatum and total cortex were dissected, weighted and stored in liquid nitrogen until use. This procedure was approved by the Institutional Ethical Committee for Animal Care from the Federal University of Rio de Janeiro (CEUA, Protocol nº DFBCICB011).

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 MgCl<sub>2</sub> 8 mM and EDTA 5 mM. The resulting suspension was ultracentrifuged at 48,000 g<sub>av</sub> 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<sub>av</sub> 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<sub>max</sub> 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 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 and coworkers (1951) using bovine serum albumin as standard.

### 2.2.3. Binding assays

As our behavioral experiments were done in mice, we performed the binding assays in a close related rodent (rat) that is generally used for such studies. For a great range of receptors, very similar affinities have been reported for mouse and rat receptors, even when differences exist between rodent and human species. In the case of the D<sub>4</sub> receptors, due to the lack of specific radioligand for this subtype, we used cells transfected with the human receptors.

For binding to D<sub>2</sub>-like receptors, striatal membranes (50  $\mu$ g protein), test compound and 0.1 nM [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 were incubated at 37°C for 60 min under yellow light in a solution containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) in a final volume of 500  $\mu$ L. Non specific binding was estimated in the presence of 30  $\mu$ M (-)-sulpiride.

For binding to 5-HT<sub>1A</sub> receptors, hippocampal membranes (40  $\mu$ g protein), test compound and 1 nM [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT were incubated at 37°C for 15 min in a solution containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M pargyline and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), in a final volume of 500  $\mu$ L. Non-specific binding was estimated in the presence of 10  $\mu$ M serotonin.

For binding to 5-HT<sub>2A</sub> receptors, cortical membranes (150  $\mu$ g protein), test compound and 1 nM [<sup>3</sup>H]-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  $\mu$ L. Non-specific binding was estimated in the presence of 1  $\mu$ M ketanserin.

For the binding assay to D<sub>4</sub> receptors, we used commercially available (Chemiscreen™, Millipore) crude membrane preparations of recombinant Chem-1 cells, an adherent mammalian cell line without detectable endogenous dopamine receptor expression, that have been transfected through a process using full-length human DRD4.4 cDNA encoding the D<sub>4</sub> isoform with 4 andem repeats in the third cytoplasmic loop (Accession number NM\_0000797). Five µg protein, test compound and [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (0.1 nM) were incubated at room temperature for 120 min under yellow light in a solution containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 10 µM clozapine. In the GTP shift assay, paired competition curves were performed in the presence and absence of 1 mM GTP.

The binding assay to mGluR<sub>2</sub> receptors was performed using commercially available (Chemiscreen™, Millipore) crude membrane preparations of recombinant cells that have been transfected using human GRM2 cDNA encoding mGlu2 (Accession number NM\_000839). Twenty µg protein, test compound and 40 nM [<sup>3</sup>H]-Glutamato were incubated at 30<sup>0</sup>C for 30 min in a solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) in a final volume of 500 µL. Non-specific binding was estimated in the presence of 30 µM glutamate.

After incubation, samples were rapidly diluted with 3 x 4 mL Tris-HCl 5 mM (pH 7.4) and immediately filtered under vacuum on glass fibre filters (GMF 3, Filtrak, Germany) previously soaked in 0.5% polyethyleneimine in the case of binding to the 5-HT receptors. 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.

## **2.3 Behavioral Experiments**

### **2.3.1 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

in groups of eight mice (17 x 28 x 13 cm) with free access to food (Nuvital®) and water. Mice were kept at constant room temperature ( $22 \pm 2$  °C), 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. Mice were only tested once. All experiments were performed by human observers blind to treatment. The study was approved by the Local Ethical Committee (CEP), which is linked to the National Commission of Research Ethics (CONEP) (Protocol 2007975), 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).

### **2.3.2 Drugs and treatments**

Apomorphine hydrochloride hemihydrate (SIGMA, São Paulo, Brazil), ketamine (CRISTÁLIA, São Paulo, Brazil), ( $\pm$ )-DOI hydrochloride (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 as reference drugs.

LASSBio-1422 and haloperidol were suspended in saline with addition of 1% (v/v) of polissorbate 80 (Tween®). Sodium pentobarbital was directly dissolved in saline. Apomorphine was dissolved in saline with addition of 0.1% ascorbic acid and clozapine was dissolved in saline with addition of 0.1% acetic acid 0.1 M. Vehicle groups received saline with 1% (v/v) polissorbate 80. The doses (expressed as free base) were chosen based on previous results published by our group (Neves et al. 2013, 2010). The drugs were administered by intraperitoneal and oral (gavage) routes (10 mL/kg body weight) or subcutaneously (5 mL/kg body weight). All experiments were performed according to a randomized protocol.

### **2.3.3 Apomorphine-induced climbing**

Mice were treated with LASSBio-1422 (1, 5, 25 mg/kg p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg p.o.), clozapine (5 mg/kg p.o.) 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 right away treated with apomorphine 4 mg/kg or vehicle s.c. (second treatment). The climbing behavior score was evaluated as: normal behavior (0 point), increased activity and sniffing (1 point), occasional clinging to sides of cage with forepaws (2 points), intermittent clinging to sides or 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 period of observation in each interval was 1 min. The climbing index was calculated as the sum of all scores obtained by the same animal at each time interval.

#### *2.3.3.1 The combined effect of LASSBio-1422 with antipsychotics in the apomorphine-induced climbing*

In order to evaluate the potential additive or synergistic effect of LASSBio-1422 with antipsychotics, the animals received a combination of sub-effective doses of LASSBio-1422 (1 mg/kg), haloperidol (0.1 mg/kg) and clozapine (1 mg/kg). The drug mixtures were prepared immediately before the administration and constituted the first treatment. The test was performed in the same conditions described above.

### **2.3.4. Ketamine-induced hyperlocomotion**

Mice were treated with vehicle, haloperidol (0.01 mg/kg, p.o.), clozapine (1 mg/kg, p.o.) or LASSBio-1422 (0.01; 0.1; 1 and 5 mg/kg p.o.) and allowed to freely explore during 30 minutes the locomotor cage, an area made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 x 30 x 45 cm) divided into 24 squares of equal area. Then ketamine was subcutaneously injected at 10 mg/kg. Immediately after ketamine injection, locomotor activity was recorded for 20 minutes.

### **2.3.5. Prepulse inhibition of startle reflex (PPI)**

The PPI test occurred in a startle chamber (Insight®, São Paulo, Brazil), in which a loudspeaker produced a continuous background noise of 65 dB of sound as well as the acoustic startle pulses. A white noise pulse was used as the startle stimulus, which had an intensity of 115 dB and duration of 50 ms; three different noise intensities (80, 85 and 90 dB, duration 20 ms) were used as prepulses. An acclimatization time of 5 min, during which the mice received no stimulus except the background noise, was followed by 5 initial startle stimuli. After this habituation program, the test program was started with five different trial types presented in a random order: (1) pulse alone, (2) control (no stimulus), (3) pulse with preceding prepulse of 80 dB, (4) pulse with preceding prepulse of 85 dB and (5) pulse with preceding prepulse of 90 dB. A total of 10 presentations of each trial type were given with an inter-stimulus interval randomized between 10 s and 30 s. Percent PPI of the startle response was calculated as follows:  $100 - [(response\ to\ acoustic\ prepulse\ plus\ startle\ stimulus\ trials / startle\ response\ alone\ trials) \times 100]$ . Mice were treated with vehicle, LASSBio-1422 (5 mg/kg, p.o.), clozapine (15 mg/kg, p.o.) or haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) and 30 min later they were injected s.c. with either saline or the PPI disrupting drugs: apomorphine (3 mg/kg), a dopaminergic agonist; ketamine (30 mg/kg), a NMDAR antagonist, or ( $\pm$ )2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-DOI (0.5 mg/kg), a 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist. The animals treated with apomorphine or ketamine were immediately placed in the startle chambers and the PPI measurement was started. The animals who received ( $\pm$ )-DOI were placed in the startle chambers 15 min after treating and the PPI measurement was started.

### **2.3.6. Novel object recognition task**

The animal model used in this study was adapted from Moura and coworkers (2006) and is based on the fact that rodents preferentially explore unfamiliar (novel) objects (Ennaceur and Delacour, 1988; Myskiw et al. 2008). The test was performed in an acrylic box with three closed walls and one transparent wall (45 x 30 x 30 cm). Before starting the experiment (day 1), mice were gently handled once a day for five days.

### *2.3.6.1 Effect on short-term memory*

On day 1 (habituation) the animals were placed in the box for 10 minutes and allowed to freely explore the environment. On day 2, the animals were treated by gavage with vehicle, LASSBio-1422 (5 mg/kg), clozapine (1 mg/kg), haloperidol (0.01 mg/kg) or intraperitoneally with ketamine (10 mg/kg) one hour before the training session. In the training session, mice were placed in the box for 10 minutes in the presence of two identical objects (A, A); those animals that did not explore one of the objects were excluded from the experiment. Ninety minutes later mice were placed once again in the box containing the familiar object (A) and the unfamiliar (B) object. The time exploring each object was measured during 10 minutes. All objects had the same color, texture and size, but different shapes.

### *2.3.6.2 Effect on long-term memory*

Habituation, training session and treatments were carried out as described above by using another group of animals. Twenty four hours after the training session, mice were placed again in the box in the presence of a familiar object (A) and a new object (C). The time exploring each object was recorded for 10 minutes.

### *2.3.6.3 Effect on long term memory impairment induced by ketamine*

On day 1 the animals were placed in the box for 10 minutes and allowed to freely explore the environment. On day 2, the animals were treated intraperitoneally with vehicle or ketamine (10 mg/kg) one hour before the training session. In the training session, the animals were placed in the box during 10 minutes in the presence of two identical objects (A, A). Twenty four hours later, the animals were placed again in the box containing the familiar object (A) and a different object (C).

LASSBio-1422 (5 mg/kg), clozapine (1 mg/kg) and haloperidol (0.01 mg/kg) were administered by gavage at three different moments, as follows:



Experiment 1: the drugs were administered one hour before training (at the same moment of ketamine or vehicle administration).

Experiment 2: the drugs were administered right after training.

Experiment 3: the drugs were administered one hour before long-term memory testing.

In all experiments, the object exploration index was calculated by the following formula: Exploration index = time observing each object (A, B or C)/ time observing both objects

### **2.3.7. Models of potential antipsychotic adverse effect**

The potential of LASSBio-1422 to induce three classical antipsychotic adverse effects was evaluated: catalepsy, motor coordination impairment and sedation/hypnosis.

#### *2.3.7.1 Spontaneous locomotor activity*

Locomotor activity was monitored in an arena made of acrylic (45 x 30 x 30 cm) divided into 24 squares of equal area. Mice were treated with LASSBio-1422 (15 and 30 mg/kg, p.o.), haloperidol (0.5 and 4 mg/kg, p.o.), clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.) or vehicle and sixty minutes later positioned at the apparatus center. After a five minutes habituation period, mice were observed during 15 minutes. The following parameters were recorded: number of squares crossings, rearings and groomings.

#### *2.3.7.2 Catalepsy test*

Mice were treated with vehicle, LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) or clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.). After 30, 60 and 90 minutes, 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 30 seconds) was recorded.

### 2.3.7.3 Rota-rod test

Rodent motor impairment was evaluated through rota-rod test. The apparatus consisted of a cylinder of 3 cm of diameter rotating at 5 rpm. One day before the test the animals were trained during five minutes. On the test day the mice that were able to stay at least 90 seconds balanced on the rotating rod were selected for testing. Animals' performance was measured by human observers before and 60 minutes after drug administration. Mice were treated with vehicle, LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) or clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.). The integrity of motor coordination was assessed on the basis of the longest time of permanence and the number of falls in a 5 minutes period.

### 2.3.7.4 Barbiturate sleeping time

The hypnotic-sedative effect of LASSBio-1422 was evaluated through barbiturate sleeping time test. Sixty minutes after gavage with vehicle, LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.), haloperidol (0.5 and 4 mg/kg, p.o.) or clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.), the animals 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. We assumed a 240 minutes cut-off for sleeping time, i.e., sleeping time over 240 min was counted as 240 min.

## 2.4 Statistical Analysis

The median inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were estimated from the competition binding 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,  $K_i = IC_{50}/(1 + [radioligand]/K_d)$ . The  $K_d$  values used were obtained from saturation experiments performed in our tissue preparations as follows: D<sub>2</sub>-like receptors:  $0.42 \pm 0.01$  nM; D<sub>4</sub> receptors:  $2.74 \pm 0.01$  nM; 5-HT<sub>1A</sub> receptors:  $0.70 \pm 0.10$  nM; 5-HT<sub>2A</sub> receptors:  $2.69 \pm 0.50$  nM.

Catalepsy and rota-rod results were analyzed by two-way repeated-measures (RM) analysis of variance (ANOVA), with treatment as the first factor and time interval or session (second factor) as the repeated-measure. Apomorphine-induced climbing, ketamine-induced hyperlocomotion, prepulse inhibition, locomotor activity and barbiturate sleeping time, were subjected to a one-way ANOVA. Novel object recognition was analyzed by Student's paired *t*-test. The analyses were performed using Sigma Stat 2.03 software (Jandel Scientific Corporation). Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1 Binding assays

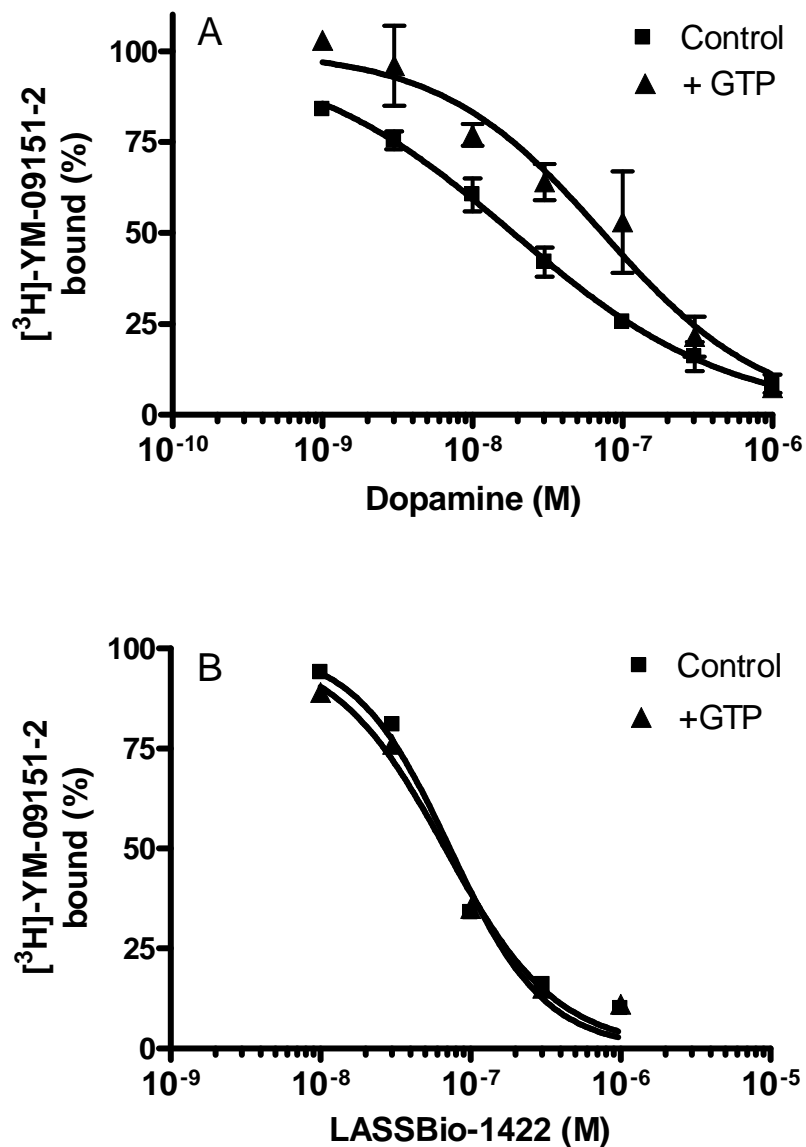
Competition binding curves revealed that LASSBio-1422 has a high affinity ( $K_i = 88$  nM) for the  $D_4$  receptors and, to a lesser extent, for the  $5\text{-HT}_{1A}$  receptor (Table 1). On the other hand, unlike clozapine, LASSBio-1422 has a much lower affinity for the  $D_2$ -like and  $5\text{-HT}_{2A}$  receptors (Table 1).

**Table 1.** Affinities of LASSBio-1422 for  $D_2$ -like,  $D_4$ ,  $5\text{-HT}_{1A}$  and  $5\text{-HT}_{2A}$  receptors. Clozapine was used as a reference drug.

	$K_i$ (nM)			
	(95% confidence interval)			
	$D_2$ -like	$D_4$	$5\text{-HT}_{1A}$	$5\text{-HT}_{2A}$
LASSBio-1422	2,820 (2,198-3,618)	88.0 (56.1-138.0)	493 (395-616)	4,643 (3,949-5,459)
Clozapine	144 (116-180)	45.9 (33.8-62.2)	259 (223-300)	20.0 (16.3-24.6)

The  $K_i$  values were calculated from mean curves obtained from 2-3 experiments, performed in triplicate. The 95% confidence interval corresponds to the goodness of fit of the parameter calculated by non-linear regression analysis of the mean curve.

The intrinsic efficacy of LASSBio-1422 for the D<sub>4</sub> receptor was investigated by using a functional binding assay, the classical GTP-shift assay, which is based on the ternary complex model for GPCRs and has been validated for various metabotropic receptors (Kenakin, 2009), including the D<sub>4</sub> receptor (Lawson et al. 1994). This assay is based on the difference of affinity measured for agonists (but not antagonists) in the absence and presence of a large concentration of GTP that is capable to destabilize the high affinity state of the receptor formed by the agonist, receptor and G protein. Fig. 3 shows the profiles of the competition curves for [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 binding to D<sub>4</sub> receptors using either a full agonist, dopamine (Fig. 3A) or LASSBio-1422 (Fig. 3B). The control curve of dopamine has a clear shallow aspect characterized by a Hill slope significantly lower than 1 (nH = -0.61 ± 0.03). In the presence of GTP, the competition curve was shifted to the right indicating a loss of affinity for the receptor (IC<sub>50</sub> from 19 nM to 74 nM) and a nearly normal slope, with a Hill coefficient not different from 1 (nH = -0.80 ± 0.12). On the contrary, the addition of GTP has no effect on LASSBio-1422, since the competition curves in the absence and presence of 1 mM GTP were superimposed, indicating that this compound is an antagonist of the D<sub>4</sub> receptors.



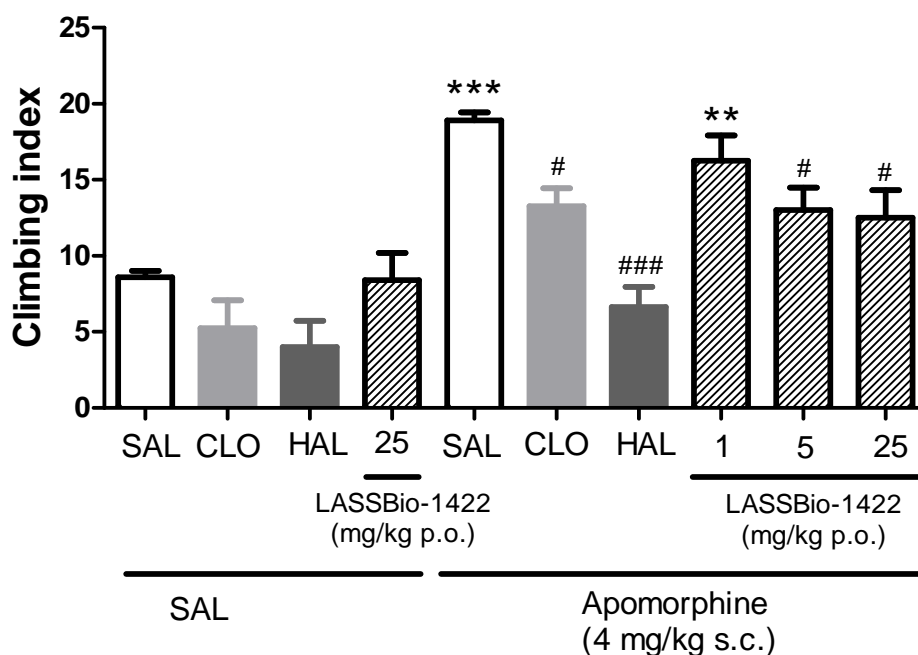
**Fig. 3.** Effect of 1 mM GTP on dopamine (A) and LASSBio-1422 (B) competition for  $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$  binding to human  $\text{D}_4$  receptors (GTP-shift assay). The data were fitted assuming the model of sigmoidal dose-effect curve with variable slope (see the text for the values of  $\text{IC}_{50}$  and Hill coefficient). In such assay, the competition curves of agonists (like dopamine) but not antagonists (like LASSBio-1422) are shifted to the right in the presence of GTP. The curves represent the mean curves from two independent experiments (dopamine) or a single experiment in triplicate (LASSBio-1422).

LASSBio-1422 does not bind to AMPA, Kainate, NMDA, glycine (CEREP Study number 20593; Test concentration:  $10^{-5}$  and  $10^{-8}\text{M}$ ) and  $\text{mGluR}_2$  receptors that have also been investigated as possible targets.

## 3.2 Behavioral experiments

### 3.2.1 Apomorphine-induced climbing

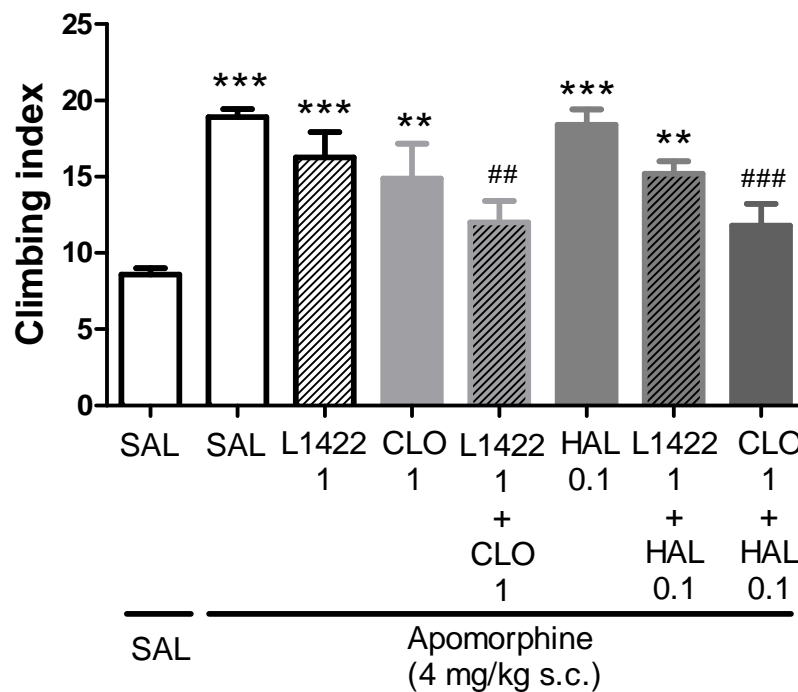
One-way ANOVA revealed a significant main effect of LASSBio-1422 [ $F(8,77)=13.814$ ,  $P<0.001$ ] in the apomorphine-induced climbing (Fig. 4). *Post hoc* Student Newman Keuls analysis indicated a significant decrease in the apomorphine-induced climbing by the administration of LASSBio-1422 at the doses of 5 ( $P<0.017$ ) and 25 mg/kg ( $P<0.001$ ) and the positive controls haloperidol 0.5 mg/kg ( $P<0.001$ ) and clozapine 5 mg/kg ( $P<0.013$ ) when compared with vehicle-apomorphine group. LASSBio-1422 did not prevent the climbing behavior effect at the lowest (1 mg/kg) tested dose ( $P=0.175$ ).



**Fig. 4.** Effect of LASSBio-1422 (1, 5 and 25 mg/kg p.o.) in the apomorphine-induced climbing behavior. Clozapine (CLO 5 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL+SAL \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+APO # $P<0.05$  ### $P<0.001$ .

### 3.2.1.1 Combined effect of LASSBio-1422 and antipsychotics in the apomorphine-induced climbing

The effect of co-administration of LASSBio-1422 with two different drugs used for schizophrenia treatment was evaluated in the apomorphine-induced climbing test. For this purpose, subeffective doses of LASSBio-1422 (1 mg/kg), clozapine (1 mg/kg) and haloperidol (0.1 mg/kg) were combined (One-Way ANOVA,  $F(7,74)=8.410$ ,  $P<0.001$ ). *Post hoc* Student Newman Keuls demonstrated that the combined administration of LASSBio-1422 with clozapine ( $P=0.003$ ), but not with haloperidol ( $P=0.141$ ) prevented the apomorphine-induced climbing (Fig. 5).

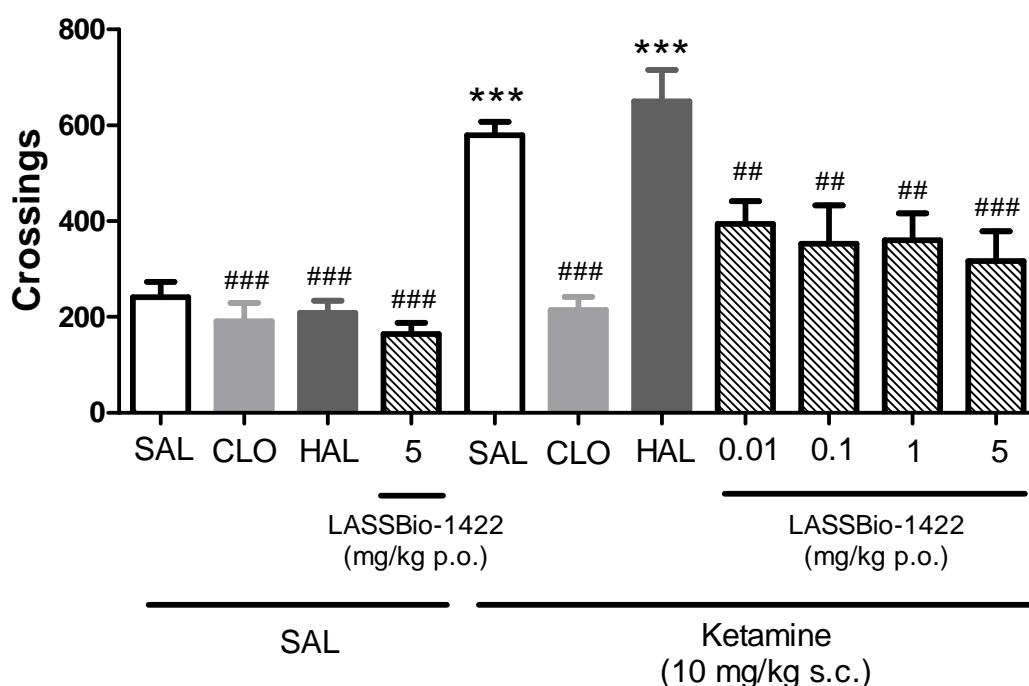


**Fig. 5.** Combined effect of LASSBio-1422 and antipsychotics in the apomorphine-induced climbing. LASSBio-1422 (L1422 1 mg/kg), clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.1 mg/kg p.o.) were used at sub-doses. Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL+SAL \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+Apomorphine ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ .

### 3.2.2 Ketamine-induced hyperlocomotion

Fig. 6 shows a significant main effect of LASSBio-1422 [One-Way ANOVA  $F(10,96)=12.505$ ,  $P<0.001$ ] in the ketamine-induced hyperlocomotion. *Post hoc* Student

Newman Keuls indicated a significant decrease in the ketamine-induced hyperlocomotion by the administration of LASSBio-1422 at the doses of 0.01 ( $P<0.006$ ), 0.1 mg/kg ( $P<0.005$ ), 1 mg/kg ( $P<0.006$ ) and 5 mg/kg ( $P<0.001$ ) and of the positive control clozapine 1 mg/kg ( $P<0.001$ ), when compared with vehicle-ketamine group. Haloperidol 0.01 mg/kg was not able to block this behavior, as expected ( $P=0.254$ ). Doses of clozapine (1 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.01 mg/kg) were chosen on the basis of absence of effect on animals' spontaneous locomotion and the results obtained are in accordance with literature data (Satow et al., 2009).



**Fig. 6.** Effect of LASSBio-1422 (0.01; 0.1; 1 and 5 mg/kg p.o.) on ketamine-induced hyperlocomotion. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Parameter observed: number of crossings. Different from SAL+SAL \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+ Ketamine ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ .

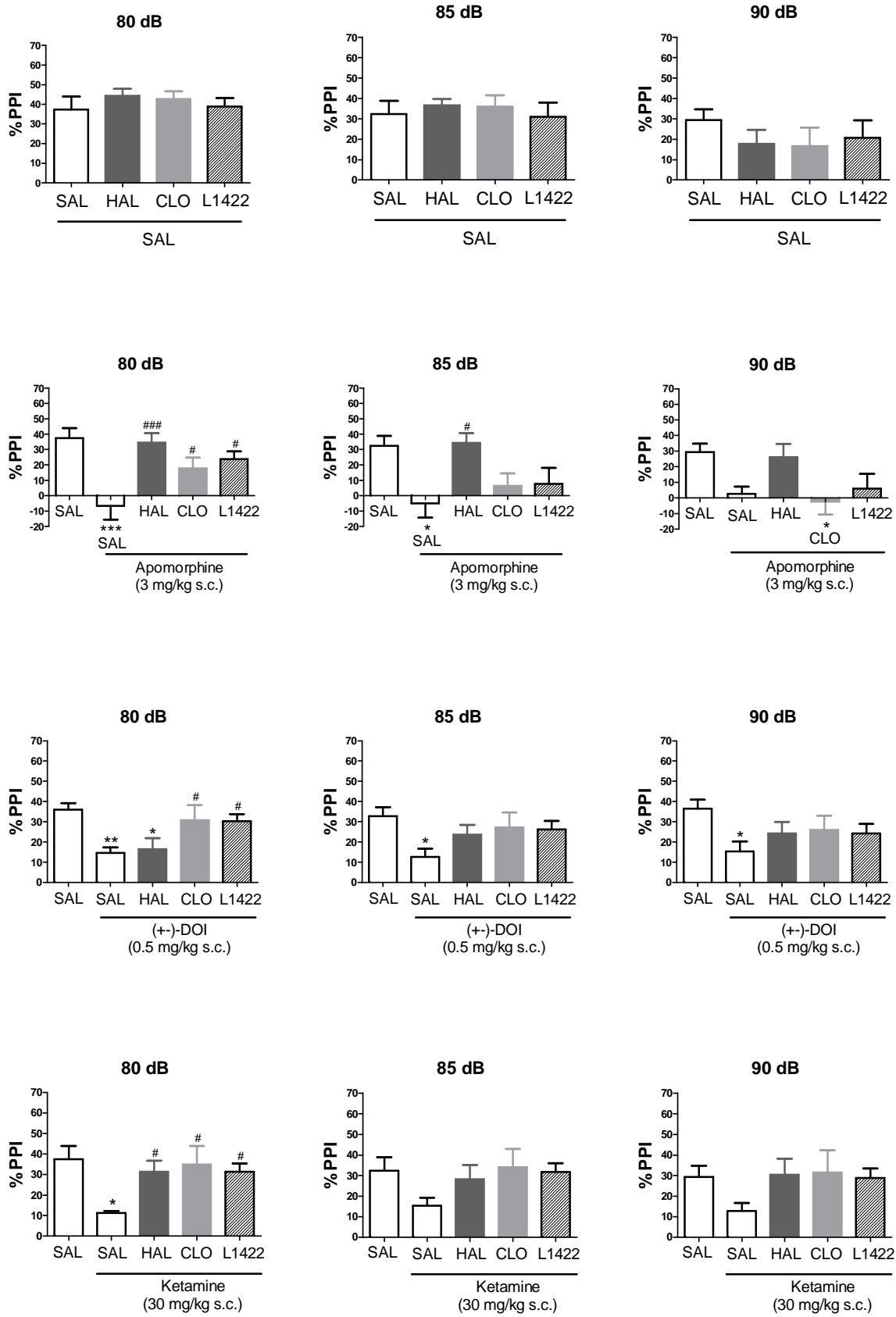
### 3.2.3 Prepulse inhibition

LASSBio-1422 (5 mg/kg, p.o.), neither the antipsychotics tested altered the normal prepulse inhibition (PPI) response of animals [One-Way ANOVA: 80 dB  $F(3,27)=0.411$ ,  $P=0.747$ , 85 dB  $F(3,27)=0.199$ ,  $P=0.896$ , 90 dB  $F(3,27)=0.607$ ,  $P=0.617$ ] (Fig. 7A). Apomorphine (3 mg/kg s.c.), ( $\pm$ )-DOI (0.5 mg/kg s.c.) and ketamine (30 mg/kg



s.c.) induced prepulse inhibition impairment as expected: apomorphine (3 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB  $F(4,42)=6.373$ ,  $P=0.0005$ , 85 dB  $F(4,42)=4.507$ ,  $P=0.0044$ , 90 dB  $F(4,42)=3.643$ ,  $P=0.0131$ ] (Fig. 7B), ( $\pm$ )-DOI (0.5 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB  $F(4,41)=5.238$ ,  $P=0.0019$ , 85 dB  $F(4,41)=2.670$ ,  $P=0.0472$ , 90 dB  $F(4,41)=2.282$ ,  $P=0.0789$ ] (Fig. 7C), and ketamine (30 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB  $F(4,39)=3.217$ ,  $P=0.0238$ , 85 dB  $F(4,39)=1.430$ ,  $P=0.0244$ , 90 dB  $F(4,39)=1.255$ ,  $P=0.3061$ ] (Fig. 7D).

*Post hoc* Student Newman Keuls revealed that LASSBio-1422 prevented the deficit induced by apomorphine only when the prepulse intensity was 80 dB ( $P=0.012$ ). The same profile of action was observed for clozapine (80 dB  $P=0.017$ , 85 dB  $P=0.343$ , 90 dB  $P=0.657$ ). Haloperidol fully prevented the prepulse inhibition disruption induced by apomorphine at 80 dB ( $P<0.001$ ) and 85 dB ( $P=0.012$ ) (Fig. 7B). In the serotonergic model, LASSBio-1422 was effective in preventing the PPI disruption at 80 dB ( $P=0.023$ ), as clozapine ( $P=0.044$ ). Haloperidol did not prevent the prepulse inhibition deficit in neither of the prepulses intensities (80 dB  $P=0.751$ , 85 dB  $P=0.120$ , 90 dB  $P=0.079$ ). LASSBio-1422 also prevented the ketamine induced impairment of prepulse inhibition at 80 dB ( $P=0.050$ ), as well as clozapine ( $P=0.031$ ) and haloperidol ( $P=0.020$ ).

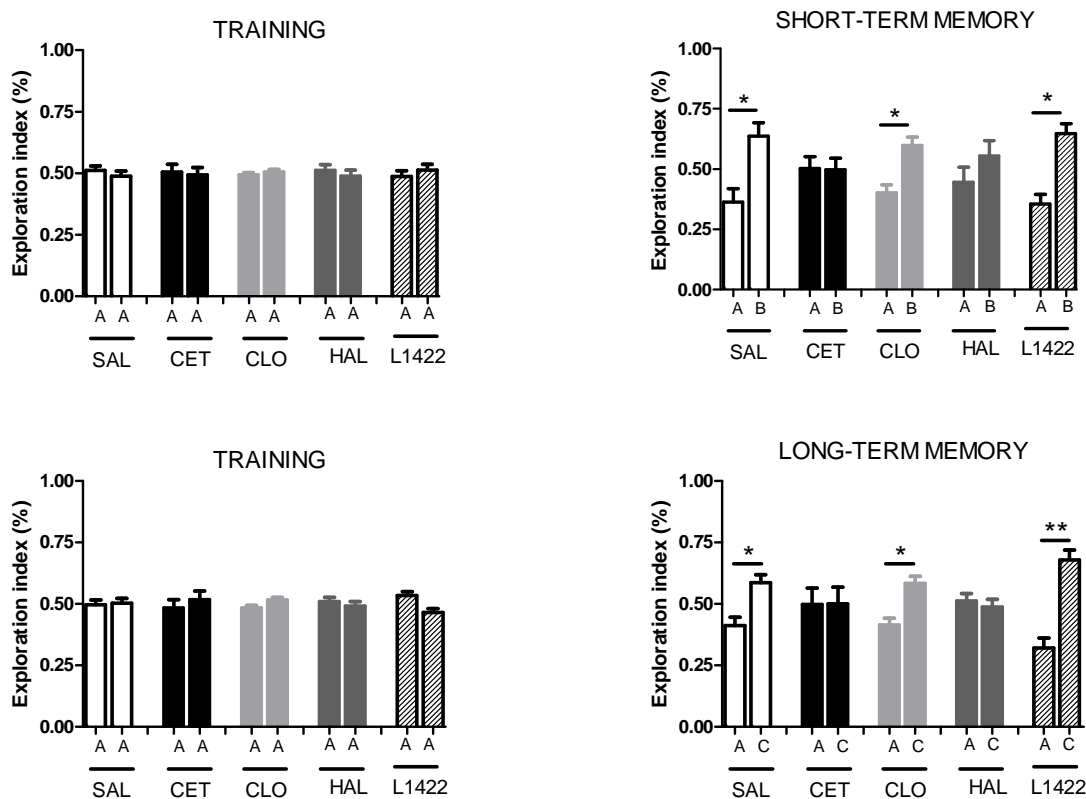


**Fig. 7.** Effect of LASSBio-1422 (L1422 5 mg/kg p.o.) *per se* on prepulse inhibition (PPI) (A) and effect of LASSBio-1422 with apomorphine (B), ( $\pm$ )-DOI (C) and ketamine (D).

Clozapine (CLO 15 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Parameter observed: %PPI. Different from SAL+SAL \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; different from SAL+Apomorphine, SAL+(±)-DOI or SAL+Ketamine # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$ .

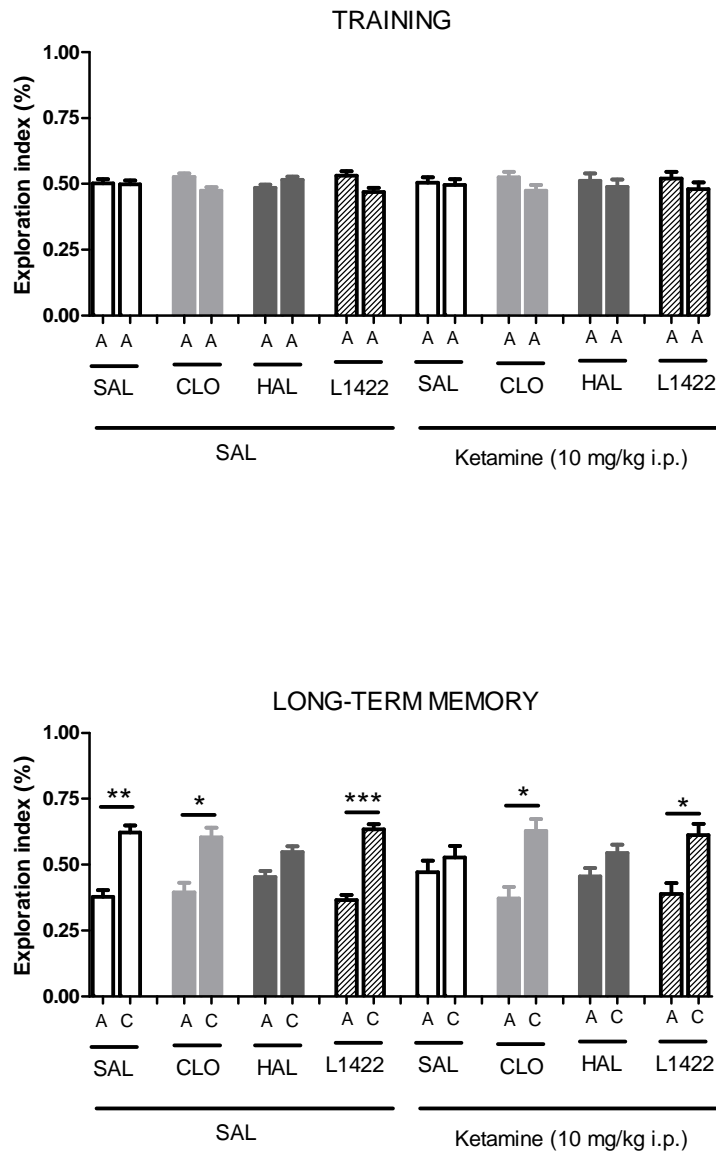
### 3.2.4 Novel object recognition

Student's paired *t*-test revealed that LASSBio-1422 (5 mg/kg) did not impair neither short-term memory (STM) ( $P=0.0118$ ) nor long-term memory (LTM) ( $P=0.0023$ ) *per se*, as clozapine (1 mg/kg) (STM  $P=0.0175$ , LTM  $P=0.0162$ ), differently from haloperidol (0.01 mg/kg) (STM  $P=0.4244$ , LTM  $P=0.7024$ ) and the NMDAR antagonist, ketamine (10 mg/kg) (STM  $P=0.9484$ , LTM  $P=0.9835$ ), which impaired both types of memory (Fig. 8).



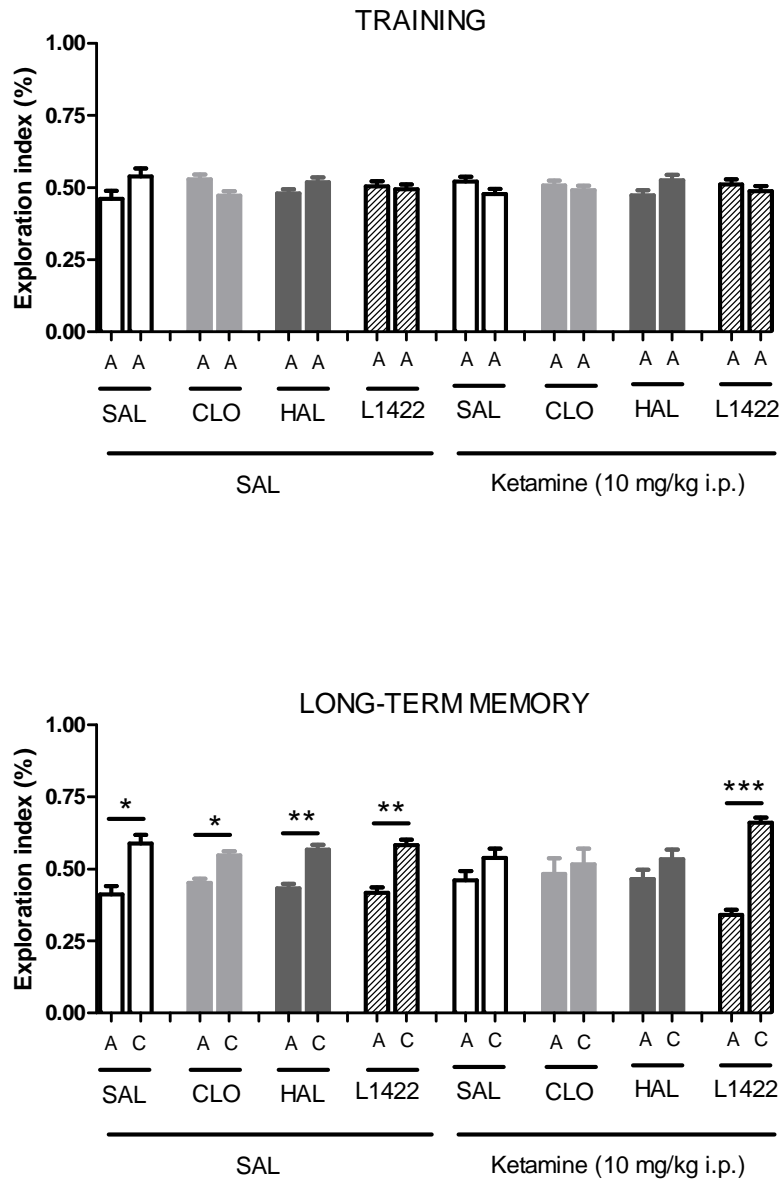
**Fig. 8.** Effect of LASSBio-1422 (L1422 5 mg/kg p.o.) *per se* on short and long-term memory at the novel object recognition test. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. B and C are the different (novel) objects. Data are expressed as mean+S.E.M. Paired *t*-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ .

Further we investigated the ability of LASSBio-1422 to prevent or reverse memory impairment induced by ketamine, by administering it at different moments of the memory formation process. When administered with ketamine before training (acquisition), LASSBio-1422 ( $P=0.0352$ ) and clozapine ( $P=0.0242$ ) were able to prevent the memory impairment, but not haloperidol ( $P=0.2098$ ) (Fig. 9).



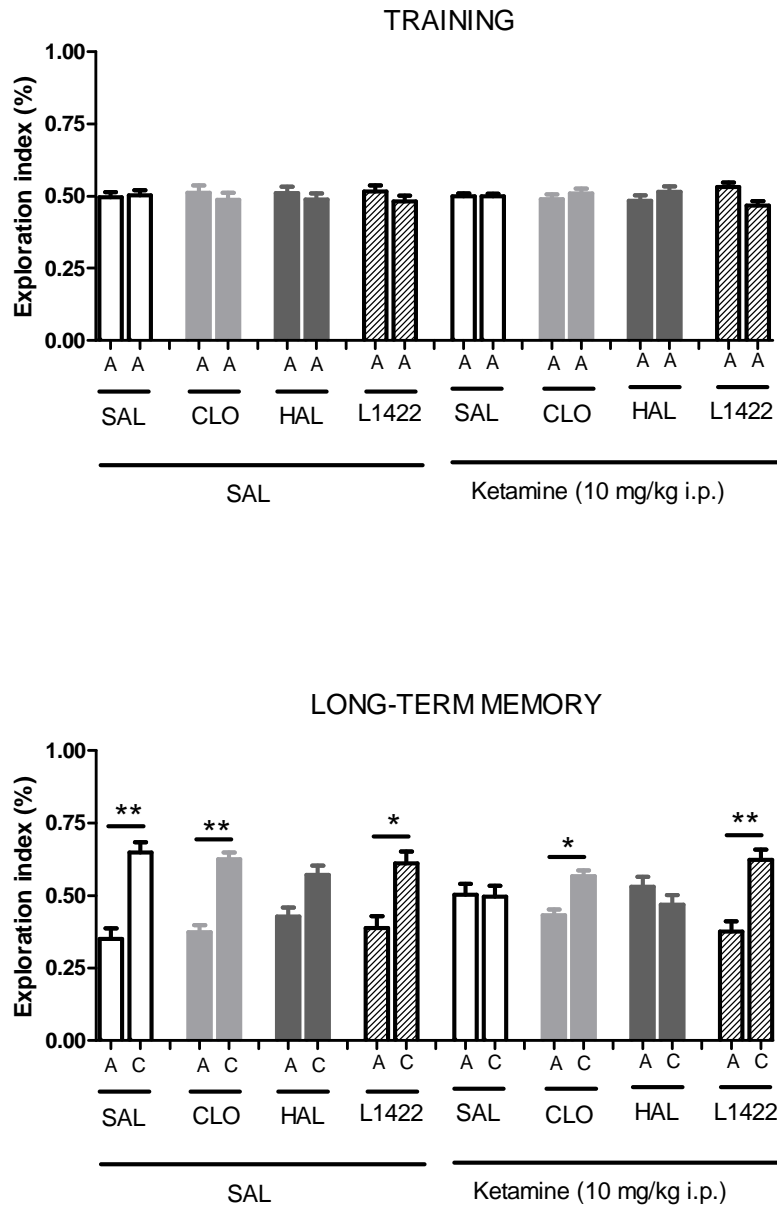
**Fig. 9.** Effect of LASSBio-1422 (L1422 5 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). LASSBio-1422 was treated in the moment of the encoding and consolidation of memory. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M. Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group  $*P<0.05$   $**P<0.01$   $***P<0.001$ .

When administered right after training (consolidation), LASSBio-1422 ( $P=0.0046$ ) was able to reverse the memory impairment induced by ketamine, but not clozapine ( $P=0.7744$ ) nor haloperidol ( $P=0.3171$ ) (Fig. 10).



**Fig. 10.** Effect of LASSBio-1422 (5 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). LASSBio-1422 was treated in the moment of the consolidation of memory. Clozapine (1 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M. Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ .

Finally, when treated one hour before the long-term memory test (retrieval), LASSBio-1422 reversed the ketamine induced memory deficit ( $P=0.0473$ ) as clozapine ( $P=0.0120$ ), but not haloperidol ( $P=0.3870$ ) (Fig.11).



**Fig. 11.** Effect of LASSBio-1422 (L1422 5 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). LASSBio-1422 was treated in the moment of the retrieval of memory. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M. Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ .

As a control, Table 2 shows that there was no alteration in the objects total exploration time of all groups of treatment when compared to the control group (vehicle+vehicle) [One-Way ANOVA. Acquisition: Training  $F(7,63)=0.780$ ,  $P=0.607$ ; LTM  $F(7,63)=1.696$ ,  $P=0.129$ ; Consolidation: Training  $F(7,64)=0.807$ ,  $P=0.585$ ; LTM  $F(7,64)=1.508$ ,  $P=0.183$ ; Retrieval: Training  $F(7,56)=3.886$ ,  $P=0.002$ ; LTM  $F(7,55)=2.483$ ,  $P=0.029$ ].

**Table 2.** Objects total exploration time (seconds) of LASSBio-1422 (L1422 5 mg/kg, p.o.), clozapine (1 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.01 mg/kg p.o.) on the different protocols of the novel object recognition test.

Treatment	Acquisition		Consolidation		Evocation	
	Training	LTM	Training	LTM	Training	LTM
Vehicle+Vehicle	186.4 ± 52.2	165.7 ± 50.9	137.6 ± 49.2	119.8 ± 37.9	182.1 ± 34.1	165.0 ± 84.3
Ketamine+Vehicle	165.1 ± 31.5	163.6 ± 38.1	157.5 ± 43.8	142.2 ± 55.6	181.2 ± 28.5	144.6 ± 28.6
Vehicle+Haloperidol	165.9 ± 28.5	133.6 ± 47.9	162.6 ± 48.3	99.2 ± 34.5	136.8 ± 36.7	107.4 ± 30.1
Ketamine+Haloperidol	178.4 ± 33.4	160.6 ± 62.8	133.5 ± 35.3	92.2 ± 38.5	201.7 ± 28.6	188.2 ± 54.7
Vehicle+Clozapine	171.7 ± 44.8	103.3 ± 44.1	157.6 ± 35.0	121.4 ± 27.5	154.4 ± 19.1	125.7 ± 17.3
Ketamine+Clozapine	141.9 ± 41.7	135.0 ± 30.3	162.7 ± 31.5	123.4 ± 42.2	202.0 ± 40.0	98.6 ± 70.2
Vehicle+L1422	164.6 ± 32.8	141.6 ± 34.9	132.8 ± 44.6	99.8 ± 48.3	166.5 ± 43.9	132.9 ± 36.0
Ketamine+L1422	161.5 ± 57.5	138.1 ± 53.7	142.2 ± 39.0	97.6 ± 39.4	218.7 ± 43.9	152.1 ± 23.3

Data are expressed as mean±S.D. ANOVA. LTM (long-term memory).

### 3.2.5 LASSBio-1422 effects on models of potential antipsychotic adverse effect

#### 3.2.5.1 Spontaneous locomotor activity

As shown in Table 3, One-Way ANOVA demonstrated an effect over mice locomotor activity [crossings  $F(6,57)=7.087$ ,  $P<0.001$ ] and exploratory behavior (rearings [F(6,54)=16.052,  $P<0.001$ ]; groomings [F(6,54)=12.351,  $P<0.001$ ]). *Post hoc* Student Newman Keuls revealed that LASSBio-1422, even when used at high doses (15 and 30 mg/kg), did not alter the number of crossings ( $P=0.110$  and  $P=0.940$ , respectively) neither the number of rearings ( $P=0.056$  and  $P=0.339$ ) and groomings

( $P=0.276$  and  $P=0.487$ ). Otherwise, clozapine 5 mg/kg ( $P=0.011$ ) and 15 mg/kg ( $P=0.026$ ), and haloperidol 0.5 mg/kg ( $P=0.007$ ) and 4 mg/kg ( $P<0.001$ ) caused motor impairment. Haloperidol and clozapine also affected mice exploratory behavior: rearings (clozapine 15 mg/kg  $P<0.001$ ; haloperidol 0.5 mg/kg  $P<0.001$ , 4 mg/kg  $P<0.001$ ) and groomings (clozapine 15 mg/kg  $P=0.001$ ; haloperidol 0.5 mg/kg  $P=0.003$ , 4 mg/kg  $P<0.001$ ).

**Table 3.** Effect of LASSBio-1422 (15 and 30 mg/kg, p.o.) on locomotor activity of mice. Parameters evaluated: number of crossings, rearings and groomings.

Treatment	Dose	Crossings	Rearings	Groomings
SAL	1 mL/100g	330.8 ± 175.0	104.6 ± 41.4	19.5 ± 7.9
Haloperidol	4 mg/kg	71.0 ± 110.7***	6.8 ± 14.0***	1.4 ± 2.7***
Haloperidol	0.5 mg/kg	151.1 ± 117.9**	32.9 ± 30.4***	6.5 ± 2.8**
Clozapine	15 mg/kg	145.0 ± 71.5*	25.6 ± 29.3***	2.8 ± 2.4***
Clozapine	5 mg/kg	183.5 ± 45.0*	87.6 ± 24.2	11.8 ± 3.7
LASSBio-1422	15 mg/kg	249.5 ± 93.8	71.4 ± 35.4	23.1 ± 11.7
LASSBio-1422	30 mg/kg	334.9 ± 77.7	119.4 ± 22.9	17.0 ± 8.1

Data are expressed as mean±S.D. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ .

### 3.2.5.2 Catalepsy test

Two-Way RM ANOVA showed a significant effect of treatment [ $F(5,161)=15.130$ ,  $P<0.001$ ], time [ $F(2,161)=1.312$   $P=0.274$ ] and treatment x time interaction [ $F(10,161)=4.695$ ,  $P<0.001$ ]. *Post hoc* analyses indicated that, after 30 minutes, haloperidol 0.5 mg/kg ( $P=0.010$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P=0.002$ ) increased the time spent by mice at the imposed uncomfortable position. After 60 minutes, haloperidol 0.5 mg/kg ( $P<0.001$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P=0.006$ ) maintained the catalepsy effect. After 90 minutes, just haloperidol 0.5 mg/kg kept causing catalepsy ( $P<0.001$ ). LASSBio-1422 (15 mg/kg) did not cause catalepsy in neither of the time evaluated (30 min  $P=0.987$ , 60 min  $P=0.763$ , 90 min  $P=0.838$ ) (Table 4).



**Table 4.** Effect of LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.) in catalepsy test at 30, 60 and 90 minutes after treatment. Clozapine and haloperidol were used as reference drugs.

Treatment	Dose	30 minutes (T30)	60 minutes (T60)	90 minutes (T90)
SAL	1 mL/100g	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	2.3 ± 1.7
Haloperidol	0.5 mg/kg	11.5 ± 11.5**	19.2 ± 13.9***	24.5 ± 9.9***
Clozapine	15 mg/kg	13.3 ± 12.3**	12.0 ± 8.1**	3.5 ± 3.7
Clozapine	5 mg/kg	3.1 ± 3.9	1.5 ± 0.9	1.6 ± 1.5
LASSBio-1422	15 mg/kg	1.6 ± 1.6	4.2 ± 4.2	4.1 ± 3.9

Data are expressed as mean+S.D. Two-way RM ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL at the same time of measure \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.2.5.3 Rota-rod test

Two-way RM ANOVA demonstrated an effect in the permanence time (treatment factor  $F(4,93) = 9.838$ ,  $P < 0.001$ ; time factor  $F(1,93) = 27.897$ ,  $P < 0.001$ ; treatment x time interaction  $F(4,93) = 7.453$ ,  $P < 0.001$ ) and in the number of falls (treatment factor  $F(4,93) = 8.975$ ,  $P < 0.001$ ; time factor  $F(1,93) = 19.743$ ,  $P < 0.001$ ; treatment x time interaction  $F(4,93) = 7.900$ ,  $P < 0.001$ ). As expected, *post hoc* analysis indicated that haloperidol 0.5 mg/kg ( $P < 0.001$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P < 0.001$ ) decreased the maximum permanence time on the apparatus and increased the number of falls (haloperidol  $P < 0.001$ , clozapine  $P < 0.001$ ). LASSBio-1422 did not affect the maximum permanence time ( $P = 0.209$ ) neither the number of falls ( $P = 0.994$ ) (Table 5).

**Table 5.** Effect of LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) in the rota-rod test.

Treatment	Dose	Permanence time (s)		Number of falls	
		T0	T60	T0	T60
SAL	1 mL/100g	227.3 ± 55.5	235.1 ± 67.7	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.6
Haloperidol	0.5 mg/kg	255.3 ± 59.3	91.4 ± 78.6***	1.1 ± 1.4	13.4 ± 12.5***
Clozapine	15 mg/kg	238.3 ± 74.5	86.9 ± 89.8***	1.3 ± 1.4	21.3 ± 17.5***
Clozapine	5 mg/kg	249.6 ± 65.5	216.3 ± 74.5	0.9 ± 1.1	1.0 ± 0.9
LASSBio-1422	15 mg/kg	288.6 ± 22.8	273.7 ± 45.5	0.2 ± 0.4	0.7 ± 1.1

Data are expressed as mean+S.D. Two-way RM ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from first measure (basal, T0) at the same treatment group \*\*\* $P<0.001$ .

#### 3.2.5.4 Barbiturate sleeping time

One-way ANOVA did not show any effect in the latency to sleep [ $F(5,55)=2.185$   $P<0.071$ ], but it did in the sleeping time [ $F(5,55)=6.523$   $P<0.001$ ]. *Post hoc* Student Newman Keuls revealed that haloperidol 4 mg/kg ( $P=0.001$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P=0.016$ ) increased the sleeping time, differently from LASSBio-1422 (15 mg/kg), that did not modify the pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.) sleeping time ( $P<0.510$ ) (Table 6).

**Table 6.** Effect of LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) on barbiturate sleeping time and latency to sleep. Clozapine and haloperidol were used as reference drugs.

Treatment	Dose	Latency to sleep (min)	Sleeping time (min)
SAL	1 mL/100g	4.4 ± 0.7	34.2 ± 14.4
Haloperidol	4 mg/kg	3.6 ± 1.077	86.2 ± 48.0***
Haloperidol	0.5 mg/kg	5.0 ± 2.8	29.5 ± 11.3
Clozapine	15 mg/kg	3.5 ± 1.3	71.8 ± 23.7*
Clozapine	5 mg/kg	4.8 ± 3.0	45.6 ± 29.5
LASSBio-1422	15 mg/kg	6.2 ± 2.7	42.4 ± 22.0

Data are expressed as mean+S.D. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL \* $P<0.05$  \*\*\* $P<0.001$ .

## 4. DISCUSSION

In this work we have evaluated a new *N*-phenylpiperazine derivative, LASSBio-1422, obtained by functionalization of our lead compound LASSBio-579 aiming the development of new drugs to treat positive and cognitive symptoms of schizophrenia. We demonstrated the efficacy of LASSBio-1422 in two different animal models predictive of efficacy in the treatment of schizophrenia positive symptoms: apomorphine-induced climbing (Moore and Axton, 1988) and ketamine-induced hyperlocomotion (Geyer and Ellenbroek, 2003). As the combination of sub-effective doses of clozapine and LASSBio-1422 inhibited apomorphine-induced climbing, our results indicate that LASSBio-1422 could be proposed as an add-on therapy for reducing the therapeutic doses of clozapine and possibly optimizing its safety profile. Indeed, clozapine has been shown to ameliorate positive symptoms in a large proportion of treatment-resistant schizophrenia patients, reduce the risk for suicide, and decrease overall mortality, but its side effects, including agranulocytosis, sedation, metabolic side effects (hyperlipidosis, type II diabetes, weight gain) (Raja, 2011), have led to its underutilization (Meltzer, 2013).

Apomorphine-induced hyperactivity in mice presents a certain translational validity since direct or indirect activation of dopamine receptors can exacerbate psychotic symptoms in patients with schizophrenia (Porsolt et al. 2010). The administration of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor antagonists (PCP, ketamine, MK-801) can induce a behavioral syndrome in rodents. This syndrome is characterized by locomotor activity increase, head weaving, ataxia, body rolling, and stereotyped movements. This syndrome has been used widely as an animal model of the schizophrenia-like symptoms (Harris and Batki, 2000; Lahti et al. 2001), once hyperactivity seems to translate closely psychotic agitation (Jones et al. 2011; Moghaddam and Jackson, 2003; Porsolt et al. 2010). The NMDA antagonist-induced hyperactivity can be prevented by both typical and atypical antipsychotics; however the atypical antipsychotics have been reported to be more effective than the typical ones (Leite et al. 2008). In contrast, in behavioral tests using dopamine agonists there is no differentiation between typical and atypical antipsychotics (Costall et al. 1978).

The differentiation between typical and atypical antipsychotics can also be done in rodents by using a single model such as PPI, which models the preattentive deficits

observed in schizophrenic patients, with clear translational and face validity (Jones et al. 2011; Porsolt et al. 2010). Apomorphine and ketamine can disrupt PPI in rodents, which can be prevented by typical and atypical antipsychotics, whereas 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonists induce PPI disruption that is prevented by atypical antipsychotics only (Auclair et al. 2006; Geyer et al. 2001; Martin et al. 2003; Schall et al. 1999; Swerdlow et al. 1998). As expected haloperidol was able to prevent apomorphine and ketamine-induced PPI deficits only, while clozapine prevented also the PPI impairment induced by ( $\pm$ )-DOI, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist. LASSBio-1422 (5 mg/kg) presented the same profile as clozapine, which reinforces its putative atypicality. Most important, this finding points to the potential of LASSBio-1422 for alleviating the disruption of preattentive processes presented by schizophrenic patients, which is thought-provoking given that improving attention in neuropsychiatric patients remains crucial for their treatment (Young et al. 2011).

LASSBio-1422 was also effective in preventing memory deficits induced by ketamine in the novel object recognition task, a rodent model of visual learning and memory (Jones et al. 2011; Porsolt et al. 2010; Sood et al. 2011). Glutamate antagonists, like ketamine and PCP, induce clear learning/memory deficits in humans and also in animals (Morgan and Curran, 2006). Schizophrenic patients generally show substantial deficits in remembering stories, verbal paired associates and visual designs compared with normal subjects, which may be related to deficiencies in episodic memory (Sood et al. 2011). Typical antipsychotics have generally been found to be ineffective against cognitive symptoms, but there are abundant evidences from rodent and primate studies that the atypical antipsychotics are far more effective to reverse and even to prevent cognitive impairment (Abbas et al. 2009; Meltzer, 2013; Seeman, 2010). The antipsychotic clozapine, but not haloperidol, has been reported to reverse the deficits induced by PCP in object recognition task (Grayson et al. 2007). These authors have tested the effect of these drugs before training only, after a sub-chronic treatment with PCP.

As far as we know, the present study was the first to demonstrate the effect of haloperidol and clozapine administered at different moments of the memory process in the novel object recognition task, where memory was impaired by ketamine. In our protocol, ketamine was administered just once (before training) in order to prevent

hippocampal degeneration and neurotoxicity induced by repeated treatment with this drug (Olney et al. 1989) and LASSBio-1422, clozapine and haloperidol were administered at different stages of memory formation: encoding, consolidation and retrieval. As expected, a single administration of ketamine impaired both short and long-term memories. LASSBio-1422 (5 mg/kg) did not affect short nor long-term memory *per se*, but improved the deficit induced by ketamine on long-term memory, when administered in the different stages of memory formation (acquisition, consolidation and retrieval). This profile was not fully shared by clozapine (1 mg/kg). This drug did not affect short nor long-term memory *per se*, but contrary to LASSBio-1422, it did not protect against the ketamine-induced memory impairment when administered immediately after the training session, indicating that it is not able to counter attack the deleterious effect of ketamine on memory consolidation process. Haloperidol (0.01 mg/kg) impaired short and long-term memory *per se* and did not improve the memory deficits induced by ketamine, confirming its prejudicial effects on cognition.

The highest tested doses of LASSBio-1422 (15 and 30 mg/kg) did not alter animals' exploratory behavior, neither impaired motor function, nor caused sedative/hypnotic effects suggesting that it has a better safety profile than typical antipsychotics as haloperidol. LASSBio-1422 could fit in with second generation antipsychotics that induce extrapyramidal effects only at high doses, such as risperidone and olanzapine (Farah, 2005; Owens, 1996). In a certain way it could be advantageous also regarding the atypical antipsychotics, since a metanalysis comparing several antipsychotic drugs showed that clozapine, quetiapine and zotepine are even more sedating than haloperidol (Leucht et al. 2009).

Altogether these results strongly suggest that LASSBio-1422 could represent a gain in the development of new drugs for treating schizophrenia positive and cognitive symptoms.

Interestingly, LASSBio-1422 seems to have a pharmacological profile different from the known atypical antipsychotic drugs. Indeed, LASSBio-1422 has a high affinity for  $D_4$  and, to a lesser extent, for  $5-HT_{1A}$  receptors, considered important for the activity of some atypical antipsychotics such as aripiprazole (Lerond et al. 2013), in both cases with  $K_i$  very similar to clozapine. On the other hand, LASSBio-1422 differs from

clozapine since it has a much lower affinity for D<sub>2</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors, harboring a more D<sub>4</sub> selective profile. It's important to note that LASSBio-1422 binding affinity profile also differs appreciably from its parent compound LASSBio-579 (Neves et al. 2010, 2013). Furthermore, it does not bind to AMPA, Kainate, NMDA, glycine and mGluR<sub>2</sub> receptors that have been investigated as possible targets for antipsychotic action (Egerton and Stone, 2012; Moghaddam and Javitt, 2012).

Our results are in line with other studies demonstrating that selective dopamine D<sub>4</sub> receptor antagonists can be effective in animal models of schizophrenia positive and cognitive symptoms, reversing apomorphine-induced blockade of prepulse inhibition (Mansbach et al. 1998), inhibiting locomotor hyperactivity (Zhang et al. 2002) and improving memory in a delayed alternation task in rats (Zhang et al. 2004). The lack of extrapyramidal side effects also could be attributed, at least in part, to D<sub>4</sub> antagonism (Chaudhry et al. 2007; Wong and Van Tol., 2003), once D<sub>4</sub> receptors are more prominently expressed in limbic regions (frontal cortex and hippocampus) than in extrapyramidal motor control regions (caudate nucleus and putamen) (Wong and Van Tol, 2003). Besides, increasing evidences from genetic, behavioral, electrophysiological and molecular research point to an important and unique role for the D<sub>4</sub> receptor subtype in the processing of emotionally salient information, learning and memory (Sood et al. 2011; Lauzon and Laviolette, 2010). D<sub>4</sub> receptors are enriched in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (Defagot et al. 2000; Van Tol et al. 1991), brain regions involved in cognitive process (Goldman-Rakic, 1996). Within PFC, dopamine can modulate the firing of GABAergic interneurons via a D<sub>4</sub> receptor mechanism, thus indirectly modulating cortical output (Mrzljak et al. 1996). D<sub>4</sub> receptors may be a key element in regulating the balance between glutamatergic excitation and GABAergic inhibition (Lewis and Gonzalez-Burgos, 2006; Thomas et al. 2009). Yuen and Yan (2009) suggested that impairments in GABAergic inhibition to PFC pyramidal neurons are implicated in the abnormal neural synchrony and working memory disturbances in schizophrenia.

## 5. CONCLUSION

The results discussed so far characterize the new functionalized *N*-phenylpiperazine derivative LASSBio-1422 as an antipsychotic lead compound active in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia, with no propensity for inducing motor side effects, which is in line with the two major goals of current antipsychotic discovery: the development of novel drugs that not only produce minimal extrapyramidal symptoms but improve cognitive impairment in schizophrenia as well (Meltzer, 2013). In addition, given the hypothesized role of memory deficits in schizophrenia, beneficial effects of LASSBio-1422 on cognition identified in this study encourage further studies on D<sub>4</sub> antagonists for treating schizophrenia and other attention and cognition disorders. The investigation of other neurochemical targets as well as the effects of this compound in animal models of negative symptoms of schizophrenia should further substantiate the usefulness of this molecular scaffold in the search for new antipsychotic drugs.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Instituto do Milênio - Inovação em Fármacos e Medicamentos (IM-INO FAR) and INCT de Fármacos e Medicamentos (INCT-INO FAR), CNPq, Brazil and Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD), CAPES, Brazil. The authors are grateful to CAPES and CNPq for the fellowships. The experiments comply with the current laws of Brazil, in which they were performed.

## References

- Abbas, A.I., Hedlund, P.B., Huang, X.P., Tran, T.B., Meltzer, H.Y., Roth, B.L., 2009. Amisulpiride is a potent 5-HT<sub>7</sub> antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology (Berl)*. 205(1), 119-128.
- Auclair, A.L., Kleven, M.S., Besnard, J., Depoortere, R., Newman-Tancredi, A., 2006. Actions of novel antipsychotic agents on apomorphine-induced PPI disruption: influence

of combined serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation and dopamine D<sub>2</sub> receptor blockade. *Neuropsychopharmacology* 31, 1900-1909.

Baldessarini, R.J., Tarazi, F.I., 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. 10<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York.

Barreiro, E.J., Kümmerle, A.E., Fraga, C.A., 2011. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chem Rev.* 111(9):5215-5246.

BRASIL, 2008. Ministério Público. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Published in DOU 9.10.

Chaudhry, I.B., Husain, N., Khan, S., Badshah, S., Deakin, B., Kapur, S., 2007. Amoxapine as an antipsychotic: comparative study versus haloperidol. *J Clin Psychopharmacol.* 27(6), 575-581.

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

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

Defagot, M.C., Falzone, T.L., Low, M.J., Grandy, D.K., Rubinstein, M., Antonelli, M.C., 2000. Quantitative analysis of the dopamine D<sub>4</sub> receptor in the mouse brain. *J Neurosci Res.* 59(2), 202-208.

Egerton, A., Stone, J.M., 2012. The glutamate hypothesis of schizophrenia: neuroimaging and drug development. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(8), 1500-1512.

Ennaceur, A., Delacour, J. A., 1988. New one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31, 47-59.

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



Geyer, M.A., Ellenbroek, B., 2003. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic activity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 1071-1079.

Geyer, M.A., Krebs-Thomson, K., Braff, D.L., Swerdlow, N.R., 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156(2-3), 117-154.

Goldman-Rakic, P.S., 1996. The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 351(1346), 1445-1453.

Gomes, T., Pompeu, T., Rodrigues, D., Noel, F., Menegatti, R., Andrade C., Sabino, J.R., Gil, E.S., Dalla Costa, T., Betti, A.H., Antonio, C.B., Rates, S.M.K., Fraga, C.A.M., Barreiro, E.J., Oliveira, V., 2013. Biotransformation of LASSBio-579 and pharmacological evaluation of p-hydroxylated metabolite a N-phenylpiperazine antipsychotic lead compound. *Eur J Med Chem.* 62, 214-221.

Grayson, B., Idris, N.F., Neill, J.C., 2007. Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res* 184: 31-38.

Harris, D., Batki, S.L., 2000. Stimulant psychosis: symptom profile and acute clinical course. *Am J Addict.* 9, 28-37.

Jones, C.A., Watson, D.J., Fone, K.C., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol.* 164(4), 1162-1194.

Kapur, S., Seeman, P., 2001. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 158, 360-369.

Kenakin, T.P., 2009. A pharmacology primer: theory, applications, and methods, in: *Pharmacological Assay Formats: Binding*, third ed., London, UK.

Kim, S., Oh, C.H., Ko, J.S., Ahn, K.H., Kim, Y.J., 1985. Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. *J. Org. Chem* 50, 1927-1932.

- Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A., Tamminga, C.A., 2001. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25, 455–467.
- Lauzon, N.M., Laviolette, S.R., 2010. Dopamine D4-receptor modulation of cortical neuronal network activity and emotional processing: Implications for neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res* 208(1), 12-22.
- Lawson, C.F., Mortimore, R.A., Schlachter, S.K., Smith, M.W., 1994. Pharmacology of a human dopamine D4 receptor expressed in HEK293 cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16(5), 303-307.
- Leite, J.V., Guimarães, F.S., Moreira, F.A., 2008. Aripiprazole, an atypical antipsychotic, prevents the motor hyperactivity induced by psychotomimetics and psychostimulants in mice. *Eur J Pharmacol* 578, 222–227.
- Lerond, J., Lothe, A., Ryvlin, P., Bouvard, S., d'Amato, T., Ciumas, C., Daléry, J., Poulet, E., Saoud, M., 2013. Effects of aripiprazole, risperidone, and olanzapine on 5-HT1A receptors in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 33(1):84-89.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., Daves, J.M., 2009. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373, 31-41.
- Lewis, D.A., Gonzalez-Burgos, G., 2006. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med* 12(9), 1016-1022.
- Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S.E., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353, 1209–1223.
- Lima, L.M., Barreiro, E.J., 2005. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr Med Chem*. 12(1):23-49.

- Löber, S., Hübner, H., Gmeiner, P., 2006. Synthesis and biological investigations of dopaminergic partial agonists preferentially recognizing the D4 receptor subtype. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 2955-2959.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Martin, R.S., Secchi, R.L., Sung, E., Lemaire, M., Bonhaus, D.W., Hedley, L.R., Lowe, D.A., 2003. Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat. *Psychopharmacology* 165, 128-135.
- Mansbach, R.S., Brooks, E.W., Sanner, M.A., Zorn, S.H., 1998. Selective dopamine D4 receptor antagonists reverse apomorphine-induced blockade of prepulse inhibition. *Psychopharmacology (Berl)*. 135(2), 194-200.
- McEvoy, J.P., 2009. Much ado about small differences. *World Psychiatry* 8(1), 29-30.
- Meltzer, H.Y., 2013. Update on typical and atypical antipsychotics drugs. *Annu Rev Med* 64, 393-406.
- Meltzer, H.Y., Matsubara, S., Lee, J.C., 1989. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D1, D2 and serotonin<sub>2</sub> pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251, 238–246b.
- Menegatti, R., Cunha, A.C., Ferreira, V.F., Pereira, 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., 2003. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 11, 4807-4813.
- Moghaddam, B., Jackson, M.E., 2003. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*. 1003, 131-137.
- Moghaddam, B., Javitt, D., 2012. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 37(1), 4-15.
- Moore, N.A., Axton, M.S., 1988. Production of climbing behavior in mice requires both D1 and D2 receptor activation. *Psychopharmacology* 94, 263-266.

Morgan, C.J., Curran, H.V., 2006. Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology* 188, 408-424.

Moura, E., Afonso, J., Hein, L., Vieira-Coelho, M.A., 2006.  $\alpha$ 2-Adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br J Pharmacol* 149, 1049-1058.

Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., 1996. Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature*. 381(6579), 245-248.

Myskiw, J.C., Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2008. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 89, 338–351.

Neves, G., Camila B. Antonio, C.B., Betti, A.H., Pranke, M., Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J., Noel, F., Rates, S.M.K., 2013. New insights into pharmacological profile of LASSBio-579, a multi-target *N*-phenylpiperazine derivative active on animal models of schizophrenia. *Behav Brain Res* 237, 86-95.

Neves, G., Menegatti, R., Antonio, C.B., Graziottin, L.R., Vieira, R.O., Rates, S.M.K., Noël, F., Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., 2010. Searching for Multi-target Antipsychotics: Discovery of Orally Active Heterocyclic *N*-Phenylpiperazine Ligands of D2-like and 5-HT1A Receptors. *Bioorg Med Chem* 18(5), 1925-1935.

Newcomer, J.W., 2007. Antipsychotic medications: metabolic and cardiovascular risk. *J Clin Psychiatry* 68 (4), 8–13.

Ohmura, T., Muramatsu, I., 1995. Two distinct alpha 1-adrenoceptor subtypes in rabbit liver: a binding study. *Br J Pharmacol* 116(6), 2591-2596.

Olney, J.W., Labruyere, J., Price, M.T., 1989. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science*. 244(4910), 1360-1362.

Owens, D.G.C., 1996. Adverse effects of antipsychotic agents: do newer agents offer advantages? *Drugs* 51, 895-930.

- Porsolt, R.D., Moser, P.C., Castagne, V., 2010. Behavioral Indices in Antipsychotic Drug Discovery. *J Pharm Exp Ther* 333(3), 632-638.
- Raja, M., 2011. Clozapine safety, 35 years later. *Curr Drug Saf.* 6(3), 164-184.
- Sangberg, P.R., Bunsey, M.D., Giordano, M., Norman, A., 1988. The catalepsy test : its ups and downs. *Behav Neurosci* 102, 748-759.
- Satow, A., Suzuki, G., Maehara, S., Hikichi, H., Murai, T., Murai, T., Kawagoe-Takaki, H., Hata, M., Ito, S., Ozaki, S., Kawamoto, H., Ohta, H., 2009. Unique antipsychotic activities of the selective metabotropic glutamate receptor 1 allosteric antagonist 2-cyclopropyl-5-[1-(2-fluoro-3-pyridinyl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one. *JPET* 330, 179-190.
- Schall, U., Keysers, C., Kast, B., 1999. Pharmacology of sensory gating in the ascending auditory system of the pigeon (*Columba livia*). *Psychopharmacology* 145(3), 273-282.
- Seeman, P., 2010. Dopamine D2 receptors as treatment targets in schizophrenia. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 1, 56-73.
- Snyder, E.M., Murphy, M.L., 2008. Schizophrenia therapy: beyond atypical antipsychotics. *Drug Discov* 7, 471-472.
- Sood, P., Idris, N.F., Cole, S., Grayson, B., Neill, J.C., Young, A.M., 2011. PD168077, a D(4) receptor agonist, reverses object recognition deficits in rats: potential role for D(4) receptor mechanisms in improving cognitive dysfunction in schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 25(6), 792-800.
- Swerdlow, N.R., Bakshi, V., Waikar, M., Taaid, N., Geyer, M.A., 1998. Seroquel, clozapine and chlorpromazine restore sensorimotor gating in ketamine-treated rats. *Psychopharmacology* 140(1), 75-80.
- Tallman, J.F., Primus, R.J., Brodbeck, R., Cornfield, L., Meade, R., Woodruff, K., Ross, P., Thurkauf, A., Gallaber, D.W., 1997. I. NGD 94-1: identification of a novel, high-affinity antagonist at the human dopamine D4 receptor. *J Pharm Exp Ther* 282, 1011-1019.

Thomas, T.C., Grandy, D.K., Gerhardt, G.A., Glaser, P.E., 2009. Decreased dopamine D4 receptor expression increases extracellular glutamate and alters its regulation in mouse striatum. *Neuropsychopharmacology* 34(2), 436-445.

Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., Civelli, O., 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*. 350(6319), 610-614.

Zhang, K., Davids, E., Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 2002. Effects of dopamine D4 receptor-selective antagonists on motor hyperactivity in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions. *Psychopharmacology (Berl)*.161(1):100-106.

Zhang, K., Grady, C.J., Tsapakis, E.M., Andersen, S.L., Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 2004. Regulation of working memory by dopamine D4 receptor in rats. *Neuropsychopharmacology* 29(9), 1648-1655.

Wadenberg, M.L., Wiker, C., Svensson, T.H., 2007. Enhanced efficacy of both typical and atypical antipsychotic drugs by adjunctive  $\alpha 2$  adrenoceptor blockade: experimental evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 10, 191–202.

Wong, A.H., Van Tol, H.H., 2003. The dopamine D4 receptors and mechanism of antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27(7), 1091-1099.

Young, J.W., Powell, S.B., Scott, C.N., Zhou, X., Geyer, M.A., 2011. The effect of reduced dopamine D4 receptor expression in the 5-choice continuous performance task: Separating response inhibition from premature responding. *Behav Brain Res*. 222(1), 183-192.

Yuen, E.Y., Yan, Z., 2009. Dopamine D4 receptors regulate AMPA receptor trafficking and glutamatergic transmission in GABAergic interneurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* 29(2), 550-562.

## ***CAPÍTULO II***

### ***Derivados benziltiazolidinônicos úteis no tratamento da esquizofrenia***

---





## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA

#### **Campo da Invenção**

A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre o sistema nervoso central. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados benziltiazolidinônicos úteis no tratamento da esquizofrenia ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de antipsicóticos.

#### **Antecedentes da Invenção**

##### **Esquizofrenia**

A esquizofrenia tem sido descrita como “a pior doença que afeta a humanidade”, devido à multiplicidade de sintomas e a permanência dos mesmos ao longo da vida do paciente (TANDON *et al.*, 2008). Ela é um transtorno psiquiátrico crônico e incapacitante, uma doença de natureza complexa, com manifestações múltiplas e quadros variados e a mais importante das psicoses. Cerca de 1% da população desenvolve esta doença ao longo da vida, sendo a incidência semelhante em homens e mulheres. É uma das formas mais importante de doença psiquiátrica, uma vez que afeta pessoas jovens. Além disso, estudos mostram que pacientes esquizofrênicos apresentam uma taxa de mortalidade duas vezes maior do que a população em geral, pela maior prevalência e gravidade das condições clínicas (CRISMON E DORSON, 1997; GRAEFF *et al.*, 1999; RANG *et al.*, 2004; ELKIS *et al.*, 2008).

Essa doença psiquiátrica com frequência começa na adolescência ou na vida adulta jovem, podendo seguir um curso de recidivas ou tornar-se crônica e progressiva, particularmente nos casos em que o início é tardio. A esquizofrenia crônica é usada para justificar a permanência de muitos pacientes em hospitais psiquiátricos por longo tempo. Nos Estados Unidos, são hospitalizados anualmente 87 mil pacientes para o tratamento

de esquizofrenia. Essas hospitalizações incluem um total de aproximadamente 930 dias de hospitalização com um custo total de 806 milhões (RANG *et al.*, 2004; MARCUS E OLFSON, 2008).

Geralmente, o transtorno tem início com um episódio agudo, caracterizado por manifestações psicóticas positivas (sintomas positivos), como delírios, alucinações, fala e comportamento desorganizados e agitação motora (GRAEFF *et al.*, 1999; STAHL, 2000).

Com a progressão da doença tendem a surgir os sintomas negativos (embotamento afetivo, falta de iniciativa, isolamento social, pensamento estereotipado, anedonia, entre outros) e cognitivos (falta de atenção e concentração, problemas de memória e aprendizagem, fluência verbal comprometida). Neste estágio, quando não tratados, os pacientes ficam cada vez mais deteriorados, podendo desenvolver um quadro de demência grave (GRAEFF *et al.*, 1999; TSAI E COYLE, 2002).

## **Neurobiologia da esquizofrenia**

### **Teorias neuroquímicas**

#### *Esquizofrenia e as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica*

A teoria dopaminérgica foi proposta por Carlsson, ganhador do Prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 2000, com base na evidência farmacológica indireta em seres humanos e em animais de experimentação (RANG *et al.*, 2004). A hipótese dopaminérgica clássica da esquizofrenia postula que os sintomas positivos da doença sejam secundários a uma hiperatividade dopaminérgica subcortical ou, mais precisamente, mediados pelos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> da via dopaminérgica mesolímbica (LARUELLE *et al.*, 1996; ABI-DARGHAM *et al.*, 1998, 2000; ABI-DARGHAM, 2004; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). Esta hipótese é sustentada pelos fatos de agonistas dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> em uso contínuo induzirem sintomas similares aos positivos esquizofrênicos e de que toda medicação efetiva como antipsicótica, necessariamente, bloqueia, em algum grau, esses receptores (ABI-DARGHAM, 2004; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). A hipótese

dopaminérgica para a esquizofrenia atribui também um prejuízo na atividade da via dopaminérgica mesocortical (KNABLE E WEINBERGER, 1997; DAVIS *et al.*, 1991), havendo, neste caso, uma hipoatividade desta via envolvendo o receptor dopaminérgico do tipo D<sub>1</sub> no córtex pré-frontal (ABI-DARGHAM, 2004). Esta hipofunção dopaminérgica estaria relacionada com os sintomas negativos e cognitivos vistos na doença (KNABLE E WEINBERGER, 1997; DAVIS *et al.*, 1991; GOLDMAN-RAKIC *et al.*, 2004), e tem sido corroborada por estudos em humanos e em animais mostrando que a depleção dopaminérgica no córtex pré-frontal causa sintomas semelhantes, bem como pela verificação de que os receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> encontram-se aumentados nessa região de pacientes esquizofrênicos (KNABLE E WEINBERGER, 1997; DAVIS *et al.*, 1991; ABI-DARGHAM *et al.*, 2002; GOLDMAN-RAKIC *et al.*, 2004). Assim, acredita-se que um déficit de atividade dopaminérgica cortical e um aumento de atividade dopaminérgica subcortical coexistam na doença (ABI-DARGHAM, 2004; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). Esta coexistência é explicada pelo fato das transmissões dopaminérgica dos sistemas mesocortical e mesolímbico serem reguladas por circuitos neuronais complexos que incluem sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, interagindo entre si indiretamente (ABI-DARGHAM, 2004). Tal interação é evidenciada por diversos estudos realizados em animais, mostrando que manipulações que diminuem a atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal geram um aumento na atividade das vias dopaminérgicas subcorticais, tanto a espontânea quanto aquela induzida por anfetamina ou apomorfina (PYCOCK *et al.*, 1980; DAVIS *et al.*, 1991). Contudo, diversos trabalhos têm oferecido evidências de que uma disfunção da transmissão glutamatérgica envolvendo os receptores NMDA está associada à esquizofrenia (BRESSAN E PILOWSKY, 2003; GOFF E COYLE, 2001; COYLE *et al.*, 2003; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005).

De fato, é sabido que antagonistas de receptores NMDA, como a fenciclidina e a cetamina, são capazes de induzir tanto os sintomas positivos como os negativos e cognitivos da doença em sujeitos hígidos, bem como em pacientes esquizofrênicos (KRYSTAL *et al.*, 1994; LAHTI *et al.*, 1995).

Ainda, há evidências sugerindo que a desregulação dopaminérgica encontrada na esquizofrenia pode ser secundária a um déficit na função do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (JENTSCH E ROTH 1999).

Antagonistas do receptor NMDA, como fenciclidina, produzem sintomas psicóticos (alucinações, distúrbios do pensamento) em seres humanos; foi também relatado haver redução das concentrações de glutamato e do número de receptores glutamatérgicos em cérebros *postmortem* de esquizofrênicos (RANG *et al.*, 2004). Novos antipsicóticos agonistas de receptores metabotrópicos pré-sinápticos de glutamato do tipo R2 e R3 (mGluR2/3) atuam modulando diretamente a liberação de glutamato. O composto LY2140023, em ensaio clínico de fase II/III, foi comparado com olanzapina (Zyprexa®), demonstrando eficácia um pouco menor para reduzir os sintomas positivos, mas os pacientes não ganharam peso, ao contrário, perderam em média 0,5 kg, indicando que agonistas destes mGluRs podem representar um avanço na pesquisa por antipsicóticos com melhor tolerabilidade. O mecanismo de ação dos agonistas de mGluRs ainda não está completamente elucidado. Por um lado, agonistas mGluR2/3 inibem a liberação de dopamina, demonstrando haver uma interconectividade funcional das vias glutamatérgicas e dopaminérgicas, sendo portanto possível que agonistas mGluR2/3 tenham como alvo final o mecanismo convencional de antagonismo dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>. Por outro lado, os receptores mGluR2/3 podem formar um complexo com receptores 5-HT<sub>2A</sub>, sugerindo que a ativação destes receptores glutamatérgicos poderia regular a sinalização serotoninérgica (SNYDER E MURPHY, 2008).

Uma desregulação dopaminérgica também causa alterações na transmissão glutamatérgica, uma vez que aferências glutamatérgicas corticais e projeções dopaminérgicas convergem em sinapses envolvendo neurônios GABAérgicos no estriado (KOTTER, 1994; CEPEDA E LEVINE, 1998). De uma maneira geral, mostrou-se que os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> apresentam papéis antagônicos em relação à transmissão glutamatérgica, via receptor NMDA, no estriado (CEPEDA E LEVINE, 1998; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). A estimulação dos receptores D<sub>2</sub> inibe a transmissão glutamatérgica por receptor NMDA, enquanto que a dos receptores D<sub>1</sub> a favorece (CEPEDA E LEVINE, 1998; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). Assim, tanto as

interações glutamato/dopamina quanto dopamina/glutamato parecem ser relevantes para a fisiopatologia da doença.

As primeiras formas de tratamento da esquizofrenia introduzidas na prática médica foram o eletrochoque, a lobotomia e o choque insulínico, mas foram logo desacreditadas (SWAYZE, 1995; TANDON *et al.*, 2010). O tratamento farmacológico deste distúrbio teve início somente na década de 50, com a descoberta acidental dos efeitos da clorpromazina (TANDON *et al.*, 2010). Posteriormente, diversos outros compostos com propriedades farmacológicas semelhantes foram desenvolvidos, dando origem à classe dos neurolépticos, antipsicóticos típicos ou, ainda, antipsicóticos de primeira geração.

Os antipsicóticos típicos podem ser divididos em três principais classes químicas: os fenotiazínicos (sendo a clorpromazina o principal fármaco), os tioxantênicos (clorprotixeno) e as butirofenonas (haloperidol). Três destes agentes (clorpromazina, flufenazina e haloperidol) ainda constam na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009).

Os antipsicóticos típicos diferem-se quanto à potência, farmacocinética e perfil de efeitos adversos. Centenas de ensaios clínicos demonstram que os antipsicóticos típicos suprimem ou atenuam manifestações psicóticas agudas e reduzem a frequência de recidivas. Em consequência, reduzem o número e o tempo de hospitalizações e viabilizam outras formas de tratamento. Embora úteis para aliviar os sintomas positivos da esquizofrenia, são pouco eficazes no alívio dos sintomas negativos e cognitivos, além de um percentual de pacientes (chamados refratários) responderem pouco ou nada a estes medicamentos (GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; GARDNER *et al.*, 2005).

Além disso, estes antipsicóticos de primeira geração apresentam uma gama de importantes efeitos adversos. Os chamados efeitos extrapiramidais estão diretamente ligados ao excesso de bloqueio dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> na via nigro estriatal. Os pacientes podem apresentar quadros de distonia muscular, acatisia, podendo desenvolver Parkinsonismo farmacológico e, com a extensão do tratamento, discinesia tardia. O aparecimento destes sintomas é a principal causa de abandono do tratamento por parte dos pacientes. O bloqueio de receptores dopaminérgicos na via

tuberoinfundibular acarreta num aumento dos níveis séricos de prolactina, com consequente aumento do tamanho e sensibilidade das glândulas mamárias, diminuição da libido, amenorréia e galactorréia (CRISMON E DORSON, 1997; GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; GARDNER *et al.*, 2005).

A procura de substâncias que superassem as limitações dos fármacos típicos existentes no mercado conduziu ao desenvolvimento da clozapina, em 1971, primeiro fármaco dos chamados antipsicóticos atípicos ou de segunda geração para os quais não existe uma definição universal. A conceituação mais simples utiliza apenas um critério de inclusão: produzir o efeito antipsicótico na maioria dos pacientes em doses que não causam efeitos extrapiramidais importantes. Outros atributos que vêm sendo descritos incluem uma maior eficácia em relação aos sintomas negativos e a não alteração dos níveis séricos de prolactina e/ou um mecanismo de ação que envolveria mais de um receptor.

Os principais representantes deste grupo são clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, ziprasidona e aripiprazol. Todos eles se caracterizam por apresentar uma afinidade para vários receptores (mecanismo de ação multireceptor), envolvendo a ligação tanto a receptores dopaminérgicos (especialmente  $D_2$ ) quanto serotoninérgicos ( $5-HT_2$  e/ou  $5-HT_{1A}$ ) (CRISMON E DORSON, 1997; GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; HIROSE *et al.*, 2004; FARAH, 2005; GARDNER *et al.*, 2005; YAGCIOGLU, 2007).

Na realidade, ainda não se sabe exatamente qual o mecanismo de ação responsável pela diferença clínica vista entre antipsicóticos típicos e atípicos. Há na literatura diversas teorias para tentar explicar o mecanismo responsável pela atipicalidade. Muitas destas teorias postulam que o perfil atípico é secundário a interações que estes fármacos exerceriam em outros receptores dopaminérgicos que não o  $D_2$  (isto é, em  $D_1$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ), ou mesmo da relação de potência de bloqueio entre eles (por exemplo,  $D_4/D_2$ ,  $D_1/D_2$ ) (SEEMAN *et al.*, 1997; STRANGE, 2001; TAUSCHER *et al.*, 2004). Outras teorias afirmam que o perfil atípico é secundário à ação dos fármacos em receptores não dopaminérgicos, em especial os receptores  $5-HT_{2A}$ , ou mesmo dependeria de uma boa relação de potência para o bloqueio dos receptores  $5-HT_{2A}/D_2$  (MELTZER *et al.*, 2003). Há também teorias que afirmam que a atipicalidade é secundária a bloqueios

dopaminérgicos seletivos no SNC, ou seja, alguns fármacos apresentariam maior propensão a bloquear zonas límbicas do que estriatais (PILOWSKY *et al.*, 1997; STRANGE, 2001; BRESSAN *et al.*, 2003). Outra teoria mantém o receptor D<sub>2</sub> como alvo chave dos antipsicóticos sem precisar invocar atividade em outros receptores, sendo que a diferença entre atípicos e típicos se dá pelo fato dos primeiros se desligarem rapidamente do receptor (rápida dissociação). Desta forma, os antipsicóticos atípicos seriam facilmente deslocados dos receptores quando a dopamina endógena for liberada o que permitiria uma transmissão neuronal mais normal no cérebro de paciente (KAPUR E SEEMAN, 2001).

Os antipsicóticos atípicos são, atualmente, preconizados como tratamento de primeira linha na esquizofrenia. Em função das grandes diferenças observadas no que diz respeito tanto à eficácia quanto aos efeitos adversos (LEUCHT *et al.*, 2009; TANDON *et al.*, 2008), estes fármacos devem ser avaliados individualmente na hora da prescrição e não como uma classe homogênea.

A clozapina apresenta melhora tanto de sintomas positivos como negativos e 60% dos pacientes que não respondem ao tratamento com antipsicóticos típicos podem apresentar melhora com o seu uso, razão pela qual é o fármaco de escolha em caso de refratariedade aos tratamentos mais clássicos. Em relação ao seu mecanismo de ação, ainda discutido, a clozapina apresenta maior afinidade para os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>2</sub> do que para os receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like, sendo que sua afinidade para o subtipo D<sub>4</sub> é um pouco maior do que para o D<sub>2</sub>. Entretanto, o maior problema com a utilização da clozapina é o aparecimento eventual de agranulocitose (cerca de 1 a 2% dos pacientes). Dada a gravidade e a potencial letalidade deste quadro (aproximadamente 1%), o uso deste fármaco é restrito na prática clínica a casos refratários aos tratamentos convencionais (CRISMON E DORSON, 1997; GRAEFF *et al.*, 1999; FARAH, 2005; GARDNER *et al.*, 2005; ELKIS E MELTZER, 2007).

Os outros antipsicóticos atípicos também apresentam efeitos adversos limitantes de sua utilização terapêutica. A utilização crônica de olanzapina, quetiapina (e risperidona), assim como da clozapina, está associada ao aumento de peso e um aumento da propensão à indução de diabetes tipo II. Essas alterações metabólicas aumentam significativamente o risco de morte por doença cardiovascular, que já é a principal causa

de mortalidade dos pacientes com esquizofrenia. Os distúrbios metabólicos associados aos antipsicóticos atípicos são, portanto, um desafio atual para os psiquiatras no dia-a-dia (ELKIS *et al.*, 2008). Já o tratamento com risperidona (mais ziprasidona e olanzapina) pode levar ao desenvolvimento de efeitos extrapiramidais com o aumento da dose (OWENS, 1996; FARAH, 2005).

O aripiprazol, às vezes chamado de antipsicótico de terceira geração, possui um perfil de efeitos adversos caracterizado por menor ganho de peso quando comparado aos outros antipsicóticos (junto com a ziprasidona), pouca sedação e ausência de elevação de prolactina. A particularidade do seu mecanismo de ação residiria no fato de atuar como agonista parcial nos receptores  $D_2$  ou de apresentar seletividade funcional neste receptor (MAILMAN e MURTHY, 2010). Além disso, apresenta atividade agonista parcial nos receptores  $5HT_{1A}$  e antagonismo em receptores  $5HT_{2A}$ . Entretanto, seu custo elevado exige apoio governamental para que a população menos favorecida possa utilizá-lo (MAMO *et al.*, 2007).

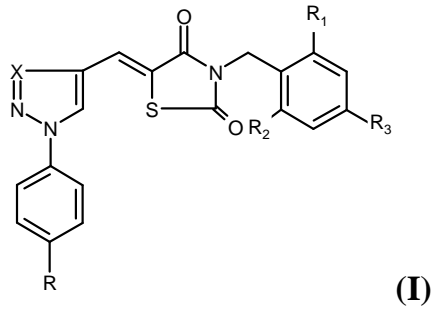
Uma das alternativas atualmente propostas para o tratamento da esquizofrenia são os agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo R2/R3 (mGluR2/3) que, além de parecerem mais seguros que os antipsicóticos atípicos atuais, poderiam apresentar uma melhora de cognição e uma melhor tolerabilidade.

Dados do estudo Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) financiado pelo National Institutes of Health (NIH) indicam que 74% dos pacientes abandonam o tratamento com antipsicóticos em 18 meses quer seja em função da baixa tolerabilidade ou da eficácia incompleta (LIEBERMAN *et al.*, 2005), uma das razões pela qual há necessidade de novos fármacos antipsicóticos.

### **Sumário da Invenção**

É um objeto da presente invenção compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I)





ativos em modelos animais preditivos de atividade antipsicótica: inibição de *climbing* induzido por apomorfina em camundongos e inibição da hiperlocomoção induzida por cetamina. É, portanto, um objeto da presente invenção proporcionar moléculas úteis no tratamento da esquizofrenia ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de antipsicóticos e composições farmacêuticas contendo as mesmas.

É um objeto da presente invenção, compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I) não induziram catatonia em camundongos e não causaram comprometimento motor quando comparadas aos antipsicóticos típico, haloperidol, e atípico, clozapina. É, portanto, outro objeto da presente invenção proporcionar moléculas e composições farmacêuticas contendo as mesmas que não induzam efeitos extrapiramidais, comuns a outros antipsicóticos, especialmente os típicos.

É um objeto da presente invenção, compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I) que não potenciaram o tempo de sono barbitúrico, em camundongos. É, portanto, outro objeto da presente invenção proporcionar moléculas e composições farmacêuticas contendo as mesmas, que não acarretem nos efeitos sedativos típicos de outros neurolépticos, como o haloperidol, e atípicos, como a clozapina.

É um objeto da presente invenção, compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I) capazes de prevenir a hiperlocomoção induzida por cetamina, em doses que *per se* não afetam locomoção, e de prevenir prejuízo induzido pelo agonista serotoninérgico ( $\pm$ )-DOI na inibição de sobressalto por pré-pulso, em camundongos. É, portanto, outro objeto da presente invenção proporcionar moléculas e composições farmacêuticas contendo as mesmas que apresentem um perfil de antipsicótico atípico.

É um objeto da presente invenção, compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I) não apresentarem toxicidade quando administradas a camundongos por 14

dias nas doses de 15 e 30 mg/kg, v.o.. É, portanto, outro objeto da presente invenção proporcionar moléculas e composições farmacêuticas contendo as mesmas que apresentem baixo potencial tóxico.

### **Breve Descrição das Figuras**

A Figura 1 mostra o efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina em camundongos. Tratamentos: HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, v.o.); CLO (clozapina 15 mg/kg, v.o.); Veículo (solução salina + 1% polissorbato); Apomorfina (4 mg/kg, s.c.). O parâmetro avaliado foi o índice de climbing. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Veículo \*\* $P<0,01$  \*\*\* $P<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Apomorfina # $P<0,05$ ; ## $P<0,01$ ; ### $P<0,001$ .

Figura 2 mostra o efeito de FPY-3 (5, 15 e 30 mg/kg, v.o.) no modelo de escalada induzida por apomorfina em camundongos. O parâmetro observado foi o índice de climbing. Tratamentos v.o.: Veículo (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, n=10), HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, n=10), CLO (clozapina 15 mg/kg, n=8). Tratamentos s.c.: Veículo (salina + vitamina C 1mg/mL), Apomorfina (apomorfina 4 mg/kg). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls: Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Veículo \* $P<0,05$  \*\*\* $P<0,05$ . Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Apomorfina # $P<0,05$  ### $P<0,001$ .

A Figura 3 mostra o efeito de diferentes doses de FPY-3 (1, 5 e 15 mg/kg, v.o. no teste de hiperlocomoção induzida por cetamina, em camundongos. Tratamentos: HAL (haloperidol 0,01 mg/kg,v.o.), CLO (clozapine (1 mg/kg, v.o.), Cetamina (10 mg/kg, s.c.). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Veículo \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Cetamina # $P<0,05$  ### $P<0,001$ .

A Figura 4 mostra o efeito de FPY-3 (15 mg/kg, v.o.) no teste de inibição de sobressalto por pré-pulso, em camundongos, onde os agentes inibidores deste processo são a

apomorfina, o ( $\pm$ )-DOI e a cetamina. Tratamentos: HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, v.o.), CLO (clozapine (15 mg/kg, v.o.), apomorfina (3 mg/kg, s.c.), ( $\pm$ )-DOI (0,5 mg/kg, s.c.), cetamina (30 mg/kg, s.c.). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Veículo \* $P$ <0,05 \*\* $P$ <0,01 \*\*\* $P$ <0,001. Diferença significativa em relação ao grupo Veículo+Apomorfina ou Veículo+DOI ou Veículo+Cetamina # $P$ <0,05 ## $P$ <0,01 ### $P$ <0,001.

A Figura 5 mostra o controle de ganho de massa corporal durante 14 dias dos camundongos tratados agudamente com FPY-3 (2000 mg/kg, v.o.) (n=3).

A Figura 6 mostra o controle de ganho de massa corporal durante 14 dias dos camundongos tratados diariamente com FPY-3 (15 e 30 mg/kg, v.o.) ou veículo (n=6). Diferença significativa em relação ao grupo Veículo \* $P$ <0,05.

A Figura 7 mostra a estrutura química dos compostos sintetizados: 3-(4-cloro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3*H*-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona FPT-2, 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3*H*-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona FPT-4 e 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-(1-fenil-1*H*-pirazol-4-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona FPY-3.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

Os exemplos descritos a seguir não têm a intenção de limitar o escopo da presente invenção, mas apenas de mostrar uma das formas de concretizá-la.

#### **Preparação dos derivados**

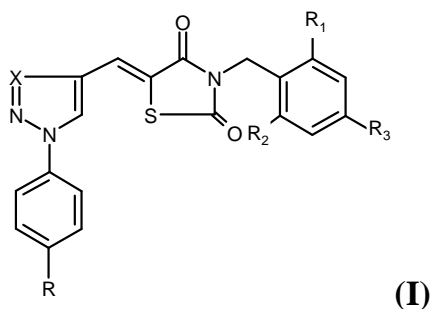
O processo de obtenção dos derivados benziltiazolidinônicos e as características dos compostos obtidos envolveram o emprego das etapas descritas a seguir:

3-(4-Cloro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3*H*-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona **FPT-2**

3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3*H*-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-  
 tiazolidina-2,4-diona **FPT-4**

3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-(1-fenil-1*H*-pirazol-4-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona  
**FPY-3**.

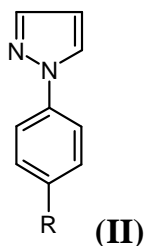
O processo de obtenção dos derivados benziltiazolidinônicos de fórmula (I)



envolveu o emprego das seguintes etapas:

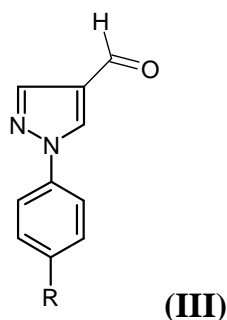
- a) Condensação de fenilidrazinas funcionalizadas com 1,3-tetrametoxipropano;
- b) Formulação do 1-fenilpirazol funcionalizado (II) obtido em a);
- c) Diazotação e substituição nucleofílica aromática de anilinas funcionalizadas;
- d) Cicloadição [2+3] das azidas (IV) com álcool propargílico;
- e) Oxidação do álcool 1,2,3-triazólico (V) obtido na etapa d);
- f) Condensação tipo Knoevenagel-Cope dos derivados tiazolidinônicos benzilados com os aldeídos correspondentes: 1-fenil-4-formil-pirazólico ou 1,2,3-triazólicos.

A etapa a) ocorre pela reação de condensação de fenilidrazinas *para*-substituídas com tetrametoxipropano em solução contendo um álcool e um ácido prótico, aquecida à temperatura de refluxo durante um período de 60 minutos (MENEGATTI et al, 2003). Ao término da condensação, o pH do meio reacional é ajustado e após extração com diclorometano e evaporação do solvente, os derivados 1-fenilpirazólicos, de formula geral (II), funcionalizados com diferentes grupamentos R são obtidos:



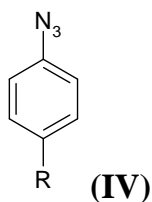
A formulação do 1-fenilpirazol (II), ocorre na etapa b), pela adição de (II) a uma mistura equimolar de dimetilformamida e oxicloreto de fósforo, a qual é mantida na temperatura de 80-85°C por 12 horas (MENEGATTI et al, 2003).

Ao término da formulação, o pH do meio reacional é ajustado e após extração com diclorometano e evaporação do solvente, os correspondentes derivados 1-fenil-4-formilpirazólicos, de formula geral (III), funcionalizados com diferentes grupamentos R são obtidos:

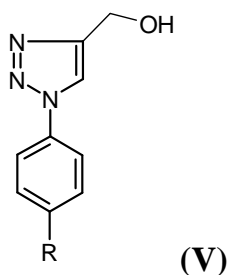


Na etapa c, anilinas *para*-substituídas foram diazotadas após tratamento com uma solução aquosa de nitrito de sódio em meio ácido por 40 minutos a temperatura de 0°C. Em seguida, o correspondente sal de diazônio obtido por como intermediário for tratado com uma solução aquosa de azida de sódio em meio básico, a temperatura ambiente por 120 minutos.

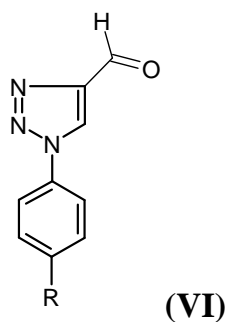
Ao término da substituição nucleofílica aromática, as correspondentes arilazidas, de formula geral (IV), funcionalizados com diferentes grupamentos R são obtidos por filtração:



A etapa d), as arilazidas funcionalizadas (IV) são tratadas com álcool propargílico em solução de tolueno a temperatura de refluxo durante um período de tempo variando entre 3 a 5 horas (KOLB et al, 2001). Ao término da reação de cicloadição [2+3], os correspondentes alcoóis 1,2,3-triazólicos de formula geral (V), funcionalizados com diferentes grupamentos R são obtidos por filtração:



A reação de oxidação ocorre na etapa e), através do tratamento dos alcoóis 1,2,3-triazólicos funcionalizados (V) com dióxido de manganês em solução contendo solvente clorado, a temperatura ambiente por período de tempo que varia entre 60 a 180 minutos. Ao término da reação de oxidação e após a filtração do meio e evaporação do solvente, os correspondentes aldeídos 1,2,3-triazólicos de formula geral (VI), funcionalizados com diferentes grupamentos R são obtidos:



A última etapa da reação f) corresponde a uma reação de condensação equimolar dos derivados 3-benzil-tiazolidina-2,4-dionas funcionalizados com os aldeídos 1-fenil-4-formil-pirazólico não substituído de fórmula geral (III) e com o derivado 1-(4-clorofenil)-1H-[1,2,3]triazol-4-carbaldeído em presença de benzeno como solvente e piperidina como solvente. A mistura reacional foi aquecida por 48 horas e em seguida, colocada a baixa temperatura. O produto precipitado após filtração foi lavado com uma mistura de etanol/água e acetonitrila. Os derivados benziltiazolidinônicos FPT-2, FPT-4 e FPY-3 obtidos apresentaram um grau de pureza suficiente para as análises. Os derivados codificados FPT 3-(4-cloro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3H-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-

tiazolidina-2,4-diona FPT-2,  $C_{19}H_{12}ClN_4O_2S$ , apresentou um rendimento de 54 % e ponto de fusão de 165-166 °C e o 3-(2-cloro-6-fluoro-benzil)-5-[3-(4-cloro-fenil)-3H-[1,2,3]triazol-4-ilmetileno]-tiazolidina-2,4-diona FPT-4,  $C_{19}H_{11}Cl_2FN_4O_2S$ , apresentou rendimento de 29 % e ponto de fusão 145-146 °C. O composto 3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-(1-fenil-1H-pirazol-4-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona FPY-3  $C_{20}H_{13}ClFN_3O_2S$  apresentou um rendimento de 53% e ponto de fusão 218-219 °C. A comprovação estrutural dos derivados sintetizados foi realizada pelos espectros no infravermelho registrados em aparelho IFS 66 Bruker, em pastilha de KBr, pelos espectros de ressonância magnética nuclear de prótons efetuados em um aparelho espectrômetro Bruker AC 300 P, utilizando o  $DMSO-d_6$  como solvente e pelo espectro de massas, impacto eletrônico a 70eV registrados em um aparelho HP 5987. As características espectroscópicas no infravermelho notadamente as absorções na região da carbonila e da dupla ligação etilênica e no espectro de ressonância magnética nuclear de prótons observando-se o dublete  $CH_2$  benzílico, o singlete do grupamento etilênico além dos prótons aromáticos para os compostos FPT e FPY preparados estão de acordo com a estrutura proposta. Na espectrometria de massa as fragmentações observadas e a intensidade dos picos dos isótopos após impacto eletrônico encontram-se igualmente em acordo com as estruturas propostas.

## **Estudo Farmacológico**

### **Ensaio *in vitro***

#### *Preparação do tecido*

Ratos foram sacrificados por decapitação. O encéfalo foi imediatamente removido e colocado no gelo para dissecação das estruturas de interesse: estriado, hipocampo e córtex. Em seguida, foram pesados e estocados em nitrogênio líquido (-70°C). Esse procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidados Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O estriado foi homogeneizado em Potter de Teflon a 4°C a 20 volumes por grama de tecido de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo  $MgCl_2$  8mM e EDTA 5 mM. A suspensão resultante foi ultracentrifugada a 48000  $g_{av}$  a 4°C por 20 minutos. O sedimento

foi ressuspensão em 20 volumes de tampão e incubado a 37°C por 10 minutos para remoção de neurotransmissores endógenos. Essa suspensão foi esfriada no gelo e ressuspensão em tampão, rendendo 1,5 mL/g de tecido e, por fim, estocada no nitrogênio líquido até seu uso.

Hipocampo e córtex foram homogeneizados em Potter de Teflon a 4°C a 20 volumes (hipocampo) ou 10 volumes (córtex) de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) por grama de tecido. A suspensão resultante foi centrifugada duas vezes a 900 g<sub>max</sub> a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram juntados e ultracentrifugados a 48000 g<sub>av</sub> por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em tampão e incubado a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, essa suspensão foi esfriada no gelo e ultracentrifugada duas vezes (48 000 g<sub>av</sub> por 10 minutos a 4°C). O sedimento final foi ressuspensão em tampão na proporção de 1,5 mL/g de tecido e estocado em nitrogênio líquido.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se como padrão albumina de soro bovino.

*Ensaio de radioligação a receptores D<sub>2</sub>-like (NIZNIK et al., 1985; TERAJ et al., 1989 ; HAMDI et al., 1992 ; ASSIÉ et al., 1993)*

Para determinar a ligação dos compostos aos receptores de dopamina do tipo D<sub>2</sub>-like, as preparações membranares da estrutura de interesse, corpo estriado, (50 µg proteína) foram incubados na presença do radioligante [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (0,1 nM) a 37°C, no escuro, por 60 minutos em uma solução contendo 120 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA e Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) em um volume final de 500 µL. A ligação não específica foi determinada pela incubação na presença de 30 µM de (-)-sulpirida.

*Ensaio de radioligação a receptores 5-HT<sub>1A</sub> (HALL et al., 1985; PEROUTKA, 1986; MONGEAU 1992)*

Para determinar a ligação dos compostos aos receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, as preparações membranares da estrutura de interesse, hipocampo (50 µg de proteína),



foram incubadas na presença do radioligante [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (1 nM) a 37°C por 15 minutos em uma solução contendo 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 µM de pargilina e Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) em um volume final de 500 µL. A ligação não específica foi determinada pela incubação na presença de 10 µM de serotonina.

*Ensaio de radioligação a receptores 5-HT<sub>2A</sub> (LEYSEN et al., 1982; NELSON et al., 1993)*

Para determinar a ligação dos compostos aos receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, as preparações membranares da estrutura de interesse, córtex total (150 µg proteína), foram incubadas na presença do radioligante [<sup>3</sup>H]-cetanserina (1 nM) a 37°C por 15 minutos em uma solução contendo 100 nM de prazosina e Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) em um volume final de 500 µL. A ligação não específica foi determinada pela incubação na presença de 1 µM de cetanserina.

Após a incubação, as amostras foram rapidamente lavadas em 4 mL de Tris-HCl 5 mM (3X) e imediatamente filtradas sobre filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak, Germany) previamente umedecidos em tampão Tris-HCl 5 mM (D<sub>2</sub>-like) ou polietilenoimina 0,5% (5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>). Os filtros foram, então, secos e colocados em vials individuais contendo líquido de cintilação (POPOP (1,4-bis-[2-(5-feniloxazol)]-benzeno 0,1 g/L e POP (2,5-difeniloxazol) 4,0 g/L em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi contada em cintilômetro (Packard Tri-Carb 1600 TR) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Afinidades de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 por receptores do tipo D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>. Clozapina e aripiprazole foram usados como fármacos de referência.

Composto	K <sub>i</sub> (µM)		
	D <sub>2</sub> -like	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>2A</sub>
FPT-2	-	-	23,9
FPT-4	-	-	-
FPY-3	-	-	7,3
Clozapine	0,114	0,378	0,014
Aripiprazole	0,001	0,001	0,007

- Os compostos produziram menos de 15% de inibição da ligação do radioligante quando usados na concentração de *screening* (10  $\mu\text{M}$ ), impossibilitando a construção de uma curva de competição e o cálculo do seu  $K_i$ .

## **Testes comportamentais/ Testes *in vivo***

### **Animais**

Foram utilizados camundongos CF1, machos, adultos (20 - 30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS). Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por um período mínimo de 72 horas no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia - UFRGS. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas de 17 x 28 x 13 cm com, no máximo, 8 animais por caixa e os ratos foram mantidos em caixas plásticas de 28 x 42 x 16 cm em grupos de, no máximo, 5 animais por caixa. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante ( $23 \pm 1$  °C), sob sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração certificada Nuvital®). Nos experimentos realizados com administração das substâncias teste por via oral, os animais passaram por um período de 5 horas de jejum antes do teste.

### *Bloqueio do comportamento de escalada (climbing) induzido por apomorfina (COSTALL et al., 1978)*

A apomorfina é um agonista dopaminérgico e o bloqueio de seus efeitos comportamentais é uma resposta observada tanto para antipsicóticos típicos como atípicos.

Camundongos foram tratados com a substância teste, veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (15 mg/kg, v.o.). Em seguida, foram colocados individualmente em gaiolas de metal, onde permaneceram durante meia hora para adaptação. Transcorrido este período, os animais receberam uma injeção de apomorfina 4 mg/kg s.c. ou veículo; sendo imediatamente recolocados nas gaiolas, onde permaneceram por trinta minutos. Neste período, os animais foram observados a cada 5 minutos durante

1 minuto, registrando-se o maior número de patas na grade, presença de escalada contínua ou intermitente e presença ou ausência de estereotipia. Todos esses parâmetros contabilizados geram um índice de climbing: 0 ponto para nenhuma pata na grade e ausência de estereotipia, 1 ponto para nenhuma pata na grade mas presença de estereotipia, 2 pontos para uma, duas ou três patas na grade, 3 pontos para escalada intermitente e 4 pontos para escalada contínua. Esse índice é avaliado para fins estatísticos.

#### *Indução de catatonia (CARLINI, 1973)*

Este teste é utilizado para detecção do potencial de indução de efeitos extrapiramidais.

Camundongos foram tratados com as substâncias teste FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (30 mg/kg, v.o.), veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (5 e 15 mg/kg, v.o.). Os animais foram delicadamente posicionados sobre uma barra de madeira elevada 6,5 cm do chão, apoiados apenas pelas patas dianteiras, 30, 60 e 90 minutos após o tratamento. Foi mensurado o tempo de permanência, em segundos, dos animais nesta posição incômoda nos intervalos descritos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) no teste de indução de catatonia em camundongos. A avaliação foi feita 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) minutos após o tratamento.

Tratamento	Dose	30 minutos (T30)	60 minutos (T60)	90 minutos (T90)
SAL	1 mL/100g	1,2 ± 0,6	1,4 ± 0,9	1,7 ± 0,9
Haloperidol	0,5 mg/kg	11,5 ± 11,5*	19,2 ± 13,9***	24,5 ± 9,9***
Clozapina	15 mg/kg	13,3 ± 12, 3**	11,9 ± 8,1**	3,5 ± 3,7
Clozapina	5 mg/kg	3,1 ± 3,9	1,5 ± 0,9	1,6 ± 1,5
FPT-2	30 mg/kg	2,3 ± 2,4	7,4 ± 11,0	7,5 ± 6,2
FPT-4	30 mg/kg	2,5 ± 2,2	3,7 ± 5,2	5,9 ± 8,3
FPY-3	30 mg/kg	1,6 ± 1,4	1,5 ± 0,8	4,5 ± 4,7

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student Newman Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo SAL \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

*Avaliação do efeito sobre a coordenação motora em aparelho de rota-rod (LÓPEZ-RUBALCAVA et al., 2000)*

Camundongos foram habituados ao rota-rod 24 horas antes do teste (Dia 1). O experimento consistiu de duas exposições ao aparelho (5 rpm), denominadas seleção e sessão teste (Dia 2). Na seleção, apenas os animais que apresentaram tempo de permanência de no mínimo 90 segundos foram considerados aptos a continuar no teste. Imediatamente após esta sessão, os animais selecionados receberam o tratamento com as substâncias teste FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (30 mg/kg, v.o.), veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (5 e 15 mg/kg, v.o.) e 60 minutos após foram novamente colocados no aparelho (sessão teste). Os parâmetros avaliados foram maior tempo de permanência, em segundos, e número de quedas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod, em camundongos. Parâmetros avaliados: maior tempo de permanência e número de quedas.

Tratamento	Dose	Permanência		Quedas	
		T0	T60	T0	T60
SAL	1 mL/100g	224, 2± 59,7	224,6 ± 64,6	1,4 ± 1,6	1,1 ± 1,5
Haloperidol	0,5 mg/kg	238,9 ± 70,1	84,6 ± 62,8**	1,2 ± 1,6	15,2 ± 8,9***
Clozapine	15 mg/kg	238,3 ± 74,5	86,9 ± 89,8**	1,3 ± 1,4	21,3 ± 17,5***
Clozapine	5 mg/kg	249,6 ± 65,5	216,2 ± 74,5	0,9 ± 1,1	1,0 ± 0,9
FPT-2	30 mg/kg	245,6 ± 92,3	250,0 ± 69,0	1,6 ± 2,7	4,5 ± 10,4
FPT-4	30 mg/kg	234,3 ± 68,1	198,9 ± 82,4	1,8 ± 1,6	3,5 ± 4,9
FPY-3	30 mg/kg	228,4 ± 88,6	212, 7 ± 94,4	1,4 ± 2,3	1,7 ± 2,3

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student Newman Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo SAL em T60 \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

*Avaliação da Atividade Locomotora Espontânea – Teste de Exposição ao Campo Aberto (Open Field) (WILLIANSON et al., 1996)*

Parâmetros de locomoção são comumente avaliados em roedores nas etapas iniciais da investigação de um provável efeito central de compostos, principalmente devido à sua simplicidade. A avaliação da atividade locomotora é capaz de demonstrar tanto efeitos depressores quanto estimulantes do sistema nervoso central, caracterizados por uma diminuição ou aumento da locomoção espontânea, respectivamente, o que pode ser visualizado neste teste.

Camundongos foram tratados com o composto teste FPY-3 (30 mg/kg, v.o.), haloperidol (0,5 e 4 mg/kg, v.o.), clozapina (5 e 15 mg/kg, v.o.) ou veículo (1 mL/100g, v.o.) e, após 60 minutos, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico transparente (45 x 30 x 30 cm), com o fundo preto dividido em 24 quadrantes iguais. Os animais foram ambientados por 5 minutos e, posteriormente, observados por 15 minutos,

registrando-se manualmente o número de cruzamentos entre os quadrantes (*crossings*), o número de episódios em que os animais levantaram o corpo apoiados apenas pelas patas traseiras (*rearings*) e o número de comportamentos de auto-limpeza (*groomings*). Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito de FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) no teste de exposição ao campo aberto, em camundongos, em um período de observação de 15 minutos. Parâmetros avaliados: número de *crossings*, *rearings* e *groomings*.

Tratamento	Dose	<i>Crossings</i>	<i>Rearings</i>	<i>Groomings</i>
SAL	1 mL/100g	306,5 ± 179,1	98,7 ± 42,7	20,3 ± 7,8
Haloperidol	4 mg/kg	71,0 ± 110,7**	6,8 ± 13,9***	1,4 ± 2,6***
Haloperidol	0,5 mg/kg	151,1 ± 117,9	32,9 ± 30,4**	6,5 ± 2,8***
Clozapina	15 mg/kg	145,0 ± 71,5	25,6 ± 29,3**	2,8 ± 2,4***
Clozapina	5 mg/kg	183,4 ± 44,9	87,6 ± 24,2	11,7 ± 3,7**
FPY-3	30 mg/kg	315,4 ± 154,5	112,1 ± 56,6	18,1 ± 6,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo SAL \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

#### *Teste de Potenciação do Sono Barbitúrico (WILLIANSON et al., 1996)*

Este teste avalia uma atividade geral sobre o Sistema Nervoso Central. Camundongos foram tratados com o composto teste FPY-3 (30 mg/kg, v.o.), veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 e 4 mg/kg, v.o.) ou clozapina (5 e 15 mg/kg, v.o.). Decorridos 60 minutos, uma solução de pentobarbital sódico (Cristália®, 40 mg/kg, i.p.) foi administrada a todos os grupos. Determinou-se, então, o tempo para indução (latência) e a duração do sono barbitúrico, em minutos, determinados pela perda e retomada do reflexo postural. Estabeleceu-se 240 minutos como valor máximo de duração do sono (Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeito de FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) no teste de potenciação do sono barbitúrico, em camundongos. Parâmetros avaliados: latência para indução do sono e duração do sono.

Tratamento	Dose	Latência (min)	Duração do sono (min)
SAL	1 mL/100g	4,4 ± 0,7	34,2 ± 14,3
Haloperidol	4 mg/kg	3,5 ± 1,0	86,2 ± 48,0***
Haloperidol	0,5 mg/kg	5,0 ± 2,8	29,5 ± 11,3
Clozapina	15 mg/kg	3,5 ± 1,3	71,8 ± 23,7**
Clozapina	5 mg/kg	4,7 ± 2,9	45,6 ± 29,5
FPY-3	30 mg/kg	5,4 ± 3,9	29,4 ± 18,5

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo SAL \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

#### *Hiperlocomoção induzida por antagonistas NMDA*

A administração aguda de antagonistas de receptores NMDA (fenciclidina, cetamina e MK-801) é capaz de produzir uma síndrome comportamental em roedores caracterizada pelo aumento da atividade locomotora. Este efeito tem sido amplamente utilizado como um modelo animal de esquizofrenia relacionado aos efeitos psicóticos induzidos pela administração destes compostos em seres humanos. Ao contrário do efeito induzido por agentes dopaminérgicos, a hiperlocomoção induzida por fenciclidina e análogos é bloqueada apenas por fármacos antipsicóticos atípicos, especialmente aqueles com grande afinidade por receptores 5-HT<sub>2</sub> (JENTSCH E ROTH, 1999; GEYER E ELLENBROEK, 2003).

Para verificar o perfil de atipicalidade das substâncias previamente selecionadas, foi realizado o teste de hiperlocomoção induzida por cetamina (10 mg/kg, s.c.) segundo Moreira e Guimarães (2005) e Satow e colaboradores (2009). Os animais foram tratados por via oral com o composto-teste e colocados na caixa de locomoção para ambientar por 30 min. Imediatamente após esse período, os animais receberam cetamina ou veículo por via s.c. e foram observados por 20 min em relação ao número de *crossings*.

### *Modelo de inibição de sobressalto por pré-pulso*

Este modelo está baseado no fato de que pacientes esquizofrênicos possuem uma disfunção na inibição de pré-pulso, caracterizada pela manutenção da resposta motora ao pulso, ao contrário dos indivíduos normais, os quais não respondem mais a um estímulo relevante (pulso) quando, precedente a este, é fornecido um estímulo de menor intensidade (pré-pulso).

Animais de laboratório podem ser condicionados a não mais responderem ao pulso frente à exposição a um pré-pulso. Este comportamento pode ser corrompido pela administração de diversos agentes farmacológicos, cujo mecanismo de ação leva à alteração de algum sistema neurotransmissor envolvido nas bases neuroquímicas da esquizofrenia (GEYER E ELLENBROEK, 2003; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005).

Os primeiros agentes utilizados foram os dopaminérgicos, como a apomorfina. O efeito dessa substância neste modelo é revertido por praticamente todos os antipsicóticos, não sendo uma ferramenta útil na diferenciação entre moléculas com perfil típico e atípico (GEYER E ELLENBROEK, 2003). Um segundo grupo de drogas utilizadas caracteriza-se pela estimulação da neurotransmissão serotoninérgica. Para tanto, são utilizados agonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> ((±)-DOI) e indutores da liberação de serotonina (MDMA) (GEYER E ELLENBROEK, 2003; VAN DEN BUUSE *et al.*, 2005). A administração de antagonistas NMDA (fenciclidina, cetamina e MK-801) induz um robusto déficit na inibição de pré-pulso em ratos e camundongos. Estes dados caracterizam a inibição de pré-pulso como uma ferramenta capaz de identificar potenciais novos antipsicóticos com perfil multireceptor (JENTSCH E ROTH, 1999; GEYER E ELLENBROEK, 2003).

Através desse modelo foi feita uma investigação do envolvimento dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico para as substâncias previamente selecionadas, utilizando apomorfina (3 mg/kg s.c.), (±)-DOI (0,5 mg/kg s.c.) e cetamina (30 mg/kg s.c.), respectivamente.

Após a administração das substâncias, os camundongos foram recolocados no equipamento de medida de resposta de sobressalto (Insight®) para ambientação com um ruído de fundo (65dB) por 5 minutos, o qual permaneceu durante todo o experimento. O



ensaio consistiu de 55 sessões, divididas em pulso único (115 dB) e um pulso precedido de um pré-pulso de 80, 85 ou 90 dB.

### **Toxicidade Oral Aguda - Determinação da faixa de Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>)**

Este teste avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas e foi realizado segundo a instrução normativa 423 da OECD para avaliação da toxicidade oral aguda de agentes químicos, adaptadas às condições da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Inicialmente, FPY-3 foi administrado na dose de 2000 mg/kg, v.o., a 3 camundongos machos. Os animais foram observados diariamente por 14 dias, e foi computada a frequência de mortes e sinais de toxicidade com ênfase nos intervalos de 1, 2, 6 e 24 horas após o tratamento. Os sinais de toxicidade avaliados foram piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, locomoção, hipotermia (animais juntos no canto da caixa), tônus muscular, tremores, paralisia dos membros posteriores, salivação, secreção brônquica, convulsões. Foi realizado um controle de ganho de massa corporal.

No caso de ocorrência de morte de 2 ou 3 camundongos, a dose era diminuída, segundo uma sequencia decrescente de doses: 300, 50 e 5 mg/kg, conforme preconizado pela OECD (2001). Foi determinada, então, a faixa de DL<sub>50</sub> das substâncias testadas segundo o Anexo 2 da OECD: “test guideline 423”.

### *Toxicidade doses repetidas*

Este teste avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas e foi realizado segundo a instrução normativa 407 da OECD (1995) para avaliação da toxicidade oral em doses repetidas de agentes químicos, adaptado às condições da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Camundongos machos (n=10/grupo) foram tratados diariamente por 14 dias com solução salina (1 mL/100 g) e 2 diferentes doses de FPY-3: dose mínima efetiva no teste

de atividade do tipo antipsicótica (15 mg/kg, v.o.) e uma dose duas vezes maior (30 mg/kg, v.o.).

Durante todo o tratamento, os animais permaneceram no biotério da Faculdade de Farmácia. Foi feito também um controle de ganho de massa corporal durante os 14 dias de tratamento. No 15º dia, os animais foram eutanasiados com tiopental e tiveram sangue e órgãos retirados (Tabela 6).

**Tabela 6.** A massa relativa corporal dos órgãos rins, adrenais, baço, fígado, coração, pulmão e cérebro dos camundongos tratados por 14 dias com veículo ou FPY-3 (15 e 30 mg/kg, v.o.).

Órgão	Veículo	FPY-3	FPY-3
	(n=6)	15 mg/kg (n=6)	30 mg/kg (n=6)
Rins	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1
Adrenais	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,018 ± 0,004
Baço	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2
Fígado	7,2 ± 0,4	7,0 ± 0,4	7,3 ± 0,9
Coração	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Pulmão	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Cérebro	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA.

As análises bioquímicas foram realizadas no equipamento LABMAX, (kits Labtest) (tabela 7). As análises hematológicas foram feitas no ABXMICROS60 (kits Sullab) (Tabela 8).

**Tabela 7.** Análises Bioquímicas após 14 dias de tratamento. AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), CK (creatina fosfoquinase).

	FPY-3		FPY-3
	Veículo (n=6)	15 mg/kg (n=6)	30 mg/kg (n=6)
<b>AST (U/L)</b>	77,7 ± 7,6	61,8 ± 5,9*	71,3 ± 14,5
<b>ALT (U/L)</b>	71,8 ± 26,9	85,2 ± 22,8	68,2 ± 18,6
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	2,2 ± 2,6	5,2 ± 3,2	2,3 ± 3,8
<b>Uréia (mg/dL)</b>	69,5 ± 5,7	65,8 ± 6,1	58,5 ± 8,7*
<b>Glicose (mg/dL)</b>	183,2 ± 25,5	273,0 ± 113,4	263,5 ± 47,9
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,08 ± 0,07	0,13 ± 0,05	0,05 ± 0,04
<b>CK (U/L)</b>	148,8 ± 37,2	143,5 ± 25,6	113,0 ± 32,0
<b>Proteínas totais (mg/dL)</b>	5,0 ± 0,4	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,5
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	126,2 ± 13,5	124,7 ± 19,8	133,5 ± 17,6
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	128,0 ± 50,8	153,8 ± 55,5	92,3 ± 24,9
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	4,1 ± 3,8	4,2 ± 3,1	3,0 ± 2,3
<b>HDL (mg/dL)</b>	52,0 ± 8,0	53,2 ± 6,2	56,0 ± 4,8

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA *post hoc* Dunnet. Diferença em relação ao grupo veículo. \* $P < 0,05$ .

**Tabela 8.** Análises Hematológicas após 14 dias de tratamento. VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (red cell distribution width).

	FPY-3		
	Veículo (n=6)	15 mg/kg (n=6)	30 mg/kg (n=6)
<b>Leucócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	3,7 ± 1,1	3,7 ± 0,9	5,0 ± 0,8*
<b>Eritrócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6,6 ± 0,5	7,2 ± 0,4	6,8 ± 0,7
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	12,1 ± 0,8	13,4 ± 0,4**	12,0 ± 0,6
<b>Hematócrito (%)</b>	34,7 ± 2,4	38,2 ± 2,4	36,4 ± 3,0
<b>Plaquetas (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,4
<b>VCM (µm<sup>3</sup>)</b>	52,7 ± 1,4	52,8 ± 1,5	53,2 ± 1,5
<b>HCM (pg)</b>	18,4 ± 0,6	18,6 ± 0,8	17,7 ± 1,1
<b>CHCM (g/dL)</b>	35,0 ± 1,5	35,2 ± 2,3	33,2 ± 1,3
<b>RDW (%)</b>	14,1 ± 1,0	13,7 ± 0,2	14,0 ± 0,5
<i>Diferencial</i>			
<b>Eosinófilos</b>	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<b>Neutrófilos</b>	36,0 ± 3,7	28,8 ± 4,1	30,5 ± 8,1
<b>Basófilos</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Monócitos</b>	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<b>Linfócitos</b>	61,7 ± 4,9	70,7 ± 4,3	67,7 ± 8,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA *post hoc* Dunnet. Diferença em relação ao grupo veiculo \* $P < 0,05$ .

## REFERÊNCIAS

ABI-DARGHAM, A.; GIL, R.; KRYSTAL, J.; BALDWIN, R.M.; SEIBYL, J.P.; BOWERS, M.; VAN DYCK, C.H.; CHARNEY, D.S.; INNIS, R.B.; LARUELLE, M. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *American Journal of Psychiatry* 155: 761-767, 1998.

ABI-DARGHAM, A.; RODENHISER, J.; PRINTZ, D.; ZEA-PONCE, Y.; GIL, R.; KEGELES, L.S.; WEISS, R.; COOPER, T.B.; MANN, J.J.; VAN HEERTUM, R.L.;

GORMAN, J.M.; LARUELLE, M. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 8104-8109, 2000.

ABI-DARGHAM, A.; MAWLAWI, O.; LOMBARDO, I.; GIL, R.; MARTINEZ, D.; HUANG, Y.; HWANG, D.R.; KEILP, J.; KOCHAN, L.; VAN HEERTUM, R.; GORMAN, J.M.; LARUELLE, M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *Journal of Neuroscience* 22: 3708-3719, 2002.

ABI-DARGHAM A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7: 1-5, 2004.

ABI-DARGHAM A, LARUELLE M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *European Psychiatry* 20: 15-27, 2005.

AGID, O.; KAPUR, S.; REMINGTON, G. Emerging drugs for schizophrenia. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 13:479-495, 2008.

ALBERS, L. J.; MUSENGA, A.; RAGGI, M. A. Iloperidone: a new benzisoxazole atypical antipsychotic drug. Is it novel enough to impact the crowded atypical antipsychotic market? *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17:61-75, 2008.

ASSIÉ, M.B.; SLEIGHT, A.J.; KOEK, W. Biphasic displacement of [3H]YM-09151-2 binding in the rat brain by thioridazine, risperidone and clozapine, but not by other antipsychotics. *European Journal of Pharmacology* 237(2-3):183-189, 1993.

BALDESSARINI, R.J. E TARAZI, F.I. Drugs and the treatment of psychiatric disorders: Psychosis and mania. In: HARDMAN, J.G. E LIMBIRD, L.E. (Ed.). Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10 ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25: 177-183, 2003.

BRESSAN, R.A.; ERLANDSSON, K.; JONES, H.M.; MULLIGAN, R.; FLANAGAN, R.J.; ELL, P.J.; PILOWSKY, L.S. Is regionally selective D2/D3 dopamine occupancy sufficient for atypical antipsychotic effect? an in vivo quantitative [123I]epidepride SPET study of amisulpride-treated patients. *American Journal of Psychiatry* 160: 1413-1420, 2003.

CARLINI, E.A. Farmacologia Prática sem Aparelhagens. São Paulo: Sarvier, 1973.

CEPEDA, C.; LEVINE, M.S. Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Developmental Neuroscience* 20: 1-18, 1998.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; NOHRIA, V. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. *European Journal of Pharmacology* 50: 39-50, 1978.

COYLE, J.T.; TSAI, G.; GOFF, D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003: 318-327, 2003.

CRISMON, M.L. E DORSON, P.G. Schizophrenia. In: DIPIRO, J.T. et al. (Ed.) *Pharmacotherapy – A Pathophysiologic Approach*. 3 ed. Stamford: Appleton Lange, 1997.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 571–625, 2005.

DAVIS, K.L.; KAHN, R.S.; KO, G.; DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry* 148:1474-1486, 1991.

ELKIS, H. E MELTZER, H.Y. Refractory Schizophrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 29 (Supl II): S41-7, 2007.

ELKIS, H.; GAMA, C.; SUPLICY, H.; TAMBASCIA, M.; BRESSAN, R.; LYRA, R.; CAVALCANTE, S.; MINICUCCI, W. Consenso Brasileiro sobre Antipsicóticos de Segunda Geração e Distúrbios Metabólicos. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 30 (1): 77-85, 2008.

FARAH, A. Atypicality of atypical antipsychotics. *Journal of Clinical Psychiatry* 7 (6): 268-84, 2005.

GARDNER, D.M.; BALDESSARINI, R.J.; WARAICH, P. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Canadian Medical Association Journal* 172 (13): 1703-11, 2005.

GEYER, M.A.; ELLENBROEK, B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic activity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 1071-1079, 2003.

GOFF, D.C.; COYLE, J.T. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 158: 1367-1377, 2001.

GOLDMAN-RAKIC, P.S.; CASTNER, S.A.; SVENSSON, T.H.; SIEVER, L.J.; WILLIAMS, G.V. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 3-16, 2004.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; ZUARDI, A.W. Medicamentos antipsicóticos. In: GRAEFF, F.G. E GUIMARÃES, F.S. (Ed.) *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Ateneu, 1999.

HALL, M.D.; EL MESTIKAWY, S.; EMERIT, M.B.; PICHAT, L.; HAMON, M.; GOZLAN, H. [3H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 44(6):1685-1696, 1985.

HAMDI, A.; ONAIVI, E.S.; PRASAD, C. A low protein-high carbohydrate diet decreases D2 dopamine receptor density in rat brain. *Life Sciences* 50(20):1529-1534, 1992.

HIROSE, T.; UWAHODO, Y.; YAMADA, S.; MIWA, T.; KIKUCHI, T.; KITAGAWA, H.; BURRIS, K.D.; ALTAR, C.A.; NABESHIMA, T. Mechanism of action of aripiprazole predicts efficacy and a favorable side-effect profile. *Journal of Psychopharmacology* 18: 375-383, 2004.

- JENTSCH, J.D.; ROTH, R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-225, 1999.
- KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *American Journal of Psychiatry* 158: 360–369, 2001.
- KNABLE, M.B.; WEINBERGER, D.R. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology* 11: 123-131, 1997.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 40: 2004-2021, 2001.
- KOTTER R. Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum. *Progress in Neurobiology* 44: 163-196, 1994.
- KRYSTAL, J.H.; KAPER, L.P.; SEIBYL, J.P.; FREEMAN, G.K.; DELANEY, R.; BREMNER, J.D.; HENINGER, G.R.; BOWERS, M.B.JR.; CHARNEY, D.S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry* 51: 199-214, 1994.
- LAHTI, A.C.; KOFFEL, B.; LAPORTE, D.; TAMMINGA, C.A. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13: 9-19, 1995.
- LARUELLE, M.; ABI-DARGHAM, A.; VAN DYCK, C.H.; GIL, R.; D'SOUZA, C.D.; ERDOS, J.; MCCANCE, E.; ROSENBLATT, W.; FINGADO, C.; ZOGHBI, S.S.; BALDWIN, R.M.; SEIBYL, J.P.; KRYSTAL, J.H.; CHARNEY, D.S.; INNIS, R.B. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 9235-9240, 1996.
- LEUCHT, S.; KOMOSSA, K.; RUMMEL-KLUGE, C.; CORVES, C.; HUNGER, H.; SCHMID, F.; ASENJO LOBOS, C.; SCHWARZ, S.; DAVIS, J.M. A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 166: 152-163, 2009.
- LEYSEN, J.E.; NIEMEGERES, C.J.; NUETEN, J.M.; LADURON, P.M. [3H]Ketanserin (R 41 468), a selective 3H-ligand for serotonin<sub>2</sub> receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Molecular Pharmacology* 21: 301-14, 1982.
- LIEBERMAN, J.A.; STROUP, T.S.; MCEVOY, J.P.; SWARTZ, M.S.; ROSENHECK, R.A.; PERKINS, D.O.; KEEFE, R.S.; DAVIS, S.M.; DAVIS, C.E.; LEBOWITZ, B.D.; SEVERE, J.; HSIAO, J.K. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New England Journal of Medicine* 353: 1209–1223, 2005.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; HEN, R.; CRUZ, S.L. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: Differences in sensitivity between 5-HT1B knockout and wild-type mice. *Behavioural Brain Research* 115 (1): 85-94, 2000.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, M.J.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the foline reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.

MAILMAN, R.B.; MURTHY, V. Third Generation Antipsychotic Drugs: Partial Agonism or Receptor Functional Selectivity? *Current Pharmaceutical Design* 16: 488-501, 2010.

MAMO, D.; GRAFF, A.; MIZRAHI, R.; SHAMMI, C.M.; ROMEYER, F.; KAPUR, S. Differential effects of aripiprazole on D2, 5-HT2, and 5-HT1A receptor occupancy in patients with schizophrenia: a triple PET study. *American Journal of Psychiatry* 164: 1411-1417, 2007.

MARCUS, S.C.; OLFSON, M. Outpatient Antipsychotic Treatment and Inpatient Costs of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 34 (1): 173-180, 2008.

MELTZER, H.Y.; LI, Z.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 1159-1172, 2003.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; Pereira, 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, 4807-4813, 2003.

MIYAMOTO, S.; DUNCAN, G.E.; MARX, C.E.; LIEBERMAN, J.A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms. *Molecular Psychiatry* 10: 79-104, 2005.

MONGEAU, R.; WELNER, S.A.; QUIRION, R.; SURANYI-CADOTTE, B.E. Further evidence for differential affinity states of the serotonin1A receptor in rat hippocampus. *Brain Research* 11;590(1-2):229-238, 1992.

MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES F.S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *European Journal of Pharmacology* 512: 199-205, 2005.

NELSON, D.L.; LUCAITES, V.L.; AUDIA, J.E.; NISSEN, J.S.; WAINSCOTT, D.B. Species differences in the pharmacology of the 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor: structurally specific differentiation by ergolines and tryptamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265(3):1272-1279, 1993.

NIZNIK, H.B.; GRIGORIADIS, D.E.; PRI-BAR, I.; BUCHMAN, O.; SEEMAN, P. Dopamine D2 receptors selectively labeled by a benzamide neuroleptic: [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 329(4):333-343, 1985.

OECD (1995). Guideline 407. Repeated-dose 28-day oral toxicity study in rodents. Adopted by the Council on 27<sup>th</sup> July 1995.



- OECD (2001). Guideline 423. Acute oral toxicity – acute toxic class method. Adopted by the Council on 17<sup>th</sup> December 2001.
- OWENS, D.G.C. Adverse effects of antipsychotic agents: do newer agents offer advantages? *Drugs* 51: 895-930, 1996.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167, 1985.
- PEROUTKA, S.J. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>1C</sub> binding sites in rat frontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 47(2):529-540, 1986.
- PILOWSKY, L.S.; MULLIGAN, R.S.; ACTON, P.D.; ELL, P.J.; COSTA, D.C.; KERWIN, R.W. Limbic selectivity of clozapine. *Lancet* 350: 490–491, 1997.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229: 327-336, 1977.
- PYCOCK, C.J.; KERWIN, R.W.; CARTER, C.J. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. *Nature* 286: 74-76, 1980.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RODGERS, R.J. e DALVI, A. Anxiety, Defense and the Elevated Plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 6, p. 80.
- SATOW, A.; SUZUKI, G.; MAEHARA, S.; HIKICHI, H.; MURAI, T.; MURAI, T.; KAWAGOE-TAKAKI, H.; HATA, M.; ITO, S.; OZAKI, S.; KAWAMOTO, H.; OHTA, H. Unique Antipsychotic Activities of the Selective Metabotropic Glutamate Receptor 1 Allosteric Antagonist 2-Cyclopropyl-5-[1-(2-luoro-3-pyridinyl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330(1): 179-190, 2009.
- SEEMAN, P.; CORBETT, R.; VAN TOL, H.H. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D<sub>2</sub> receptors or are selective for D<sub>4</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology* 16: 93-110, 1997.
- SHAPIRO, D. A.; RENOCK, S.; ARRINGTON, E.; CHIODO, L. A.; LIU, L. X.; SIBLEY, D. R.; ROTH, B. L.; MAILMAN, R. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 28:1400–1411, 2003.
- STAHL, S.M. *Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications* 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- STRANGE, P.G. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacological Reviews* 53: 119-133, 2001.

SWAYZE, V.W.I. Frontal leucotomy and related psychosurgical procedures in the era before antipsychotics (1935–1954): a historical review. *The American Journal of Psychiatry* 152:505–515, 1995.

TANDON, R.; BELMAKER, R.H.; GATTAZ, W.F.; LOPEZ-IBOR JR., J.J.; OKASHA, A.; SINGH, B.; STEIN, D.J.; OLIE, J.-P.; FLEISCHHACKER, W.W.; MOELLER, H.-J. World Psychiatric Association Pharmacopsychiatry Section statement on comparative effectiveness of antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 100:20–38, 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H.A.; KESHAVAN, M. Schizophrenia, “Just the Facts”: What we know in 2008 Part 1: Overview. *Schizophrenia Research* 100:4–19, 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H.A.; KESHAVAN, M. Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention: past, present, and future. *Schizophrenia Research* 122:1–23, 2010.

TAUSCHER, J.; HUSSAIN, T.; AGID, O.; VERHOEFF, N.P.; WILSON, A.A.; HOULE, S.; REMINGTON, G.; ZIPURSKY, R.B.; KAPUR, S. Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics. *American Journal of Psychiatry* 161:1620-1625, 2004.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [<sup>3</sup>H]YM-09151-2 with [<sup>3</sup>H]spiperone and [<sup>3</sup>H]raclopride for dopamine D-2 receptor binding to rat striatum. *European Journal of Pharmacology* 173: 177, 1989.

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

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): 550-557, 2005.

WEBER, J.; MCCORMACK, P. L. ASENAPINE. *CNS Drugs* 23:781–792, 2009.

WILLIANS, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Chichester: John Wiley & Sons, 1996.

World Health Organization, 2009. W.H.O. Model List of Essential Medicines 16th Edition. Disponível em:

<http://www.who.int/medicines/publication/essentialmedicines/en/index/html>.

YAGCIOGLU, A. The Mechanism of Action of Antipsychotic Drugs: Is Atypicality Superior in Schizophrenia Treatment? *Turkish Journal of Psychiatry* 18 (4): 1-10, 2007.

### **Vantagens da presente invenção**

Os resultados apresentados demonstram que os derivados benziltiazolidinônicos são ativos nos modelos animais de sintomas positivos e pré-atencionais da esquizofrenia em doses que não apresentam uma tendência para causar catatonia, comprometimento motor ou sedação. Dessa forma, essas substâncias mostraram-se promissoras para o desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento da esquizofrenia. Além disso, podem ser uma perspectiva de fármacos antipsicóticos com alvo biológico distinto dos antipsicóticos clássicos disponíveis no mercado, uma vez que não apresentaram uma alta afinidade pelos receptores  $D_2$ -like,  $5-HT_{1A}$  e  $5-HT_{2A}$ .

### **Resumo**

#### NOVOS DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA

A presente invenção proporciona novos derivados benziltiazolidinônicos e composições farmacêuticas compreendendo os mesmos; estes compostos foram ativos em modelos animais de esquizofrenia, com as vantagens de não acarretarem em efeitos adversos típicos dos antipsicóticos, pois apresentaram menor incidência de catatonia e efeito sobre a coordenação motora quando comparados com outros agentes antipsicóticos, o haloperidol e a clozapina, e não apresentaram efeito depressor do sistema nervoso central; as moléculas apresentaram efeito nos modelos de escalada induzida por apomorfina, na hiperlocomoção induzida por cetamina e no modelo de inibição do sobressalto por pré-pulso. FPY-3 não apresentou efeito tóxico em 14 dias de tratamento, sendo potencialmente útil para o tratamento da esquizofrenia.

**FIGURAS**

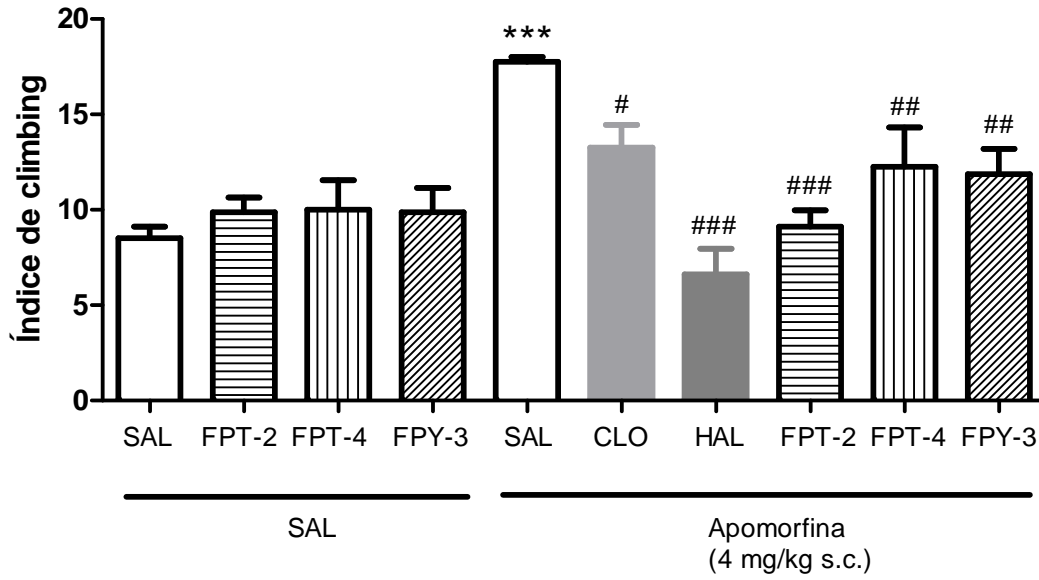


Figura 1

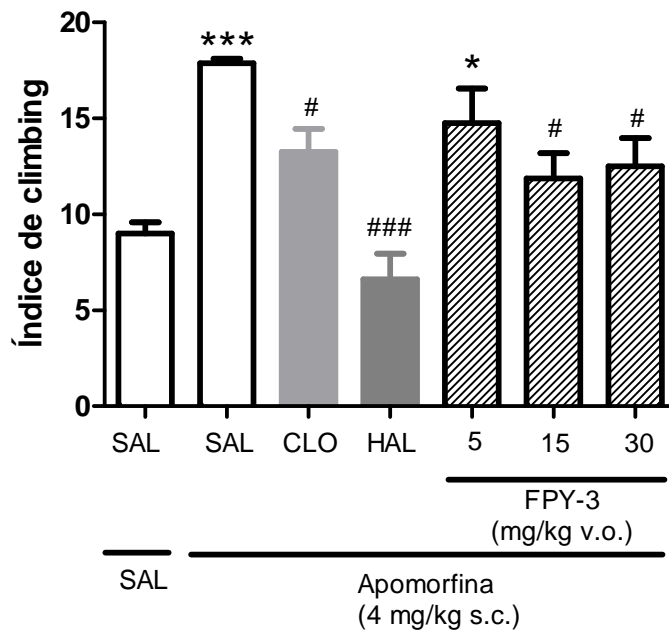


Figura 2

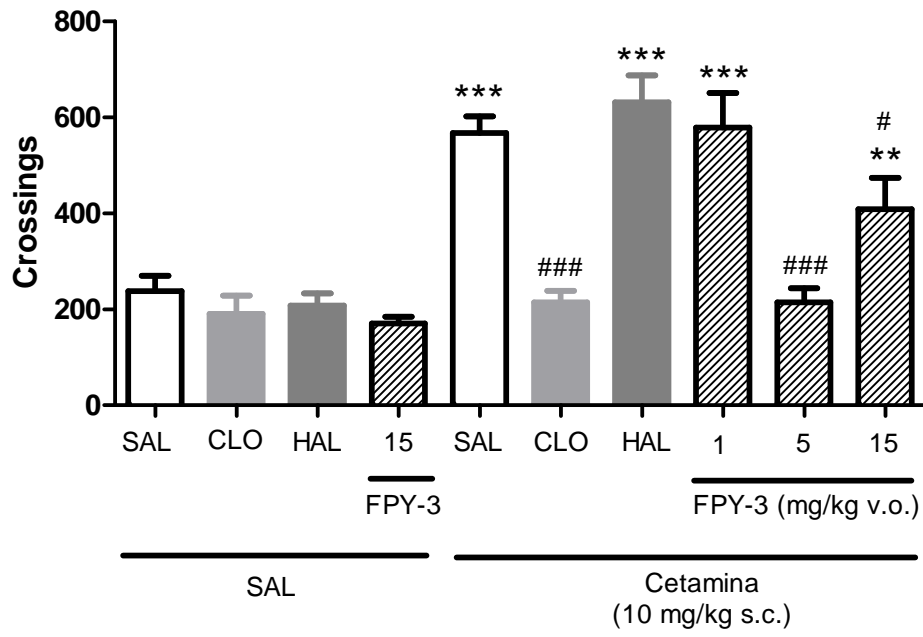


Figura 3

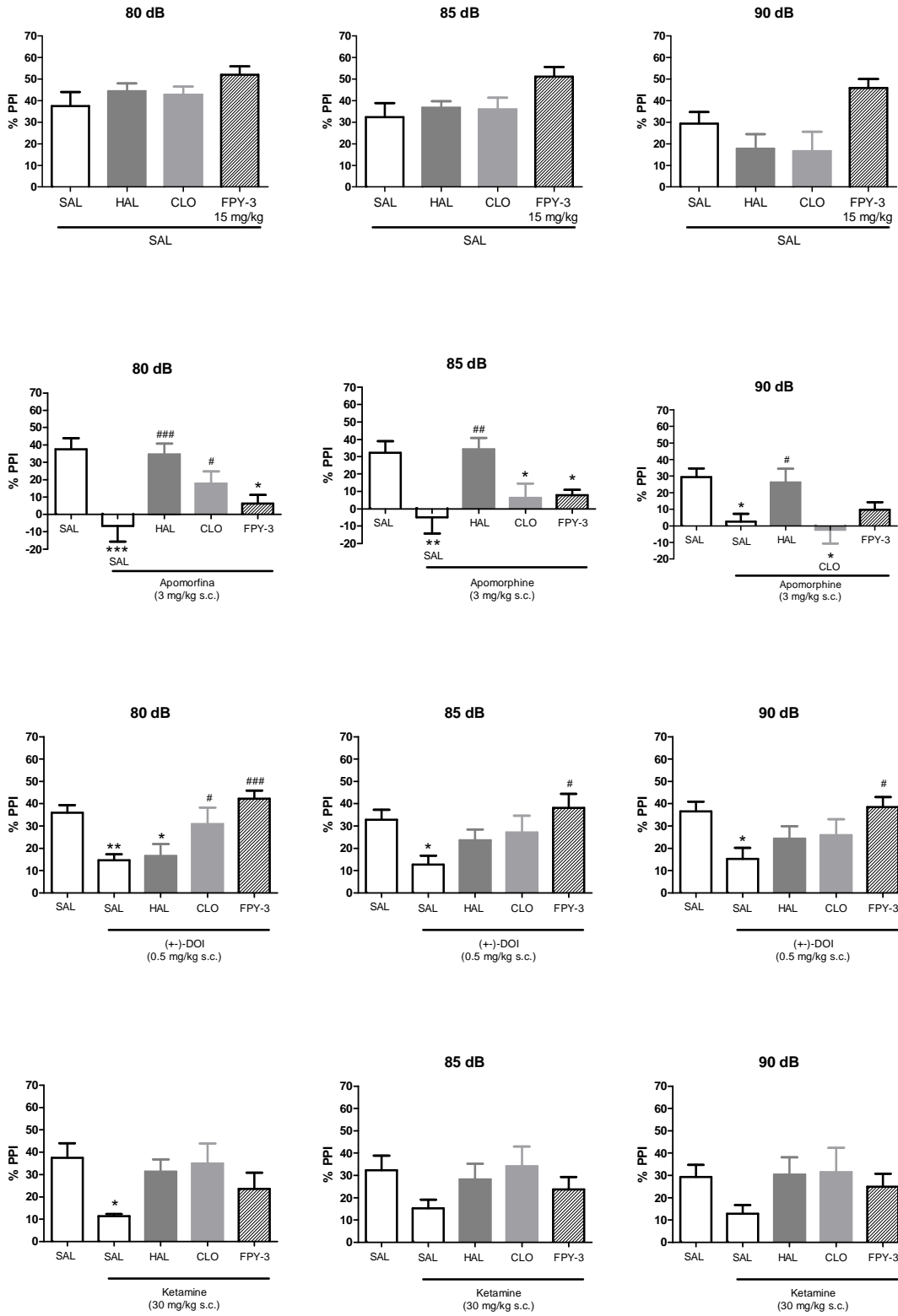


Figura 4

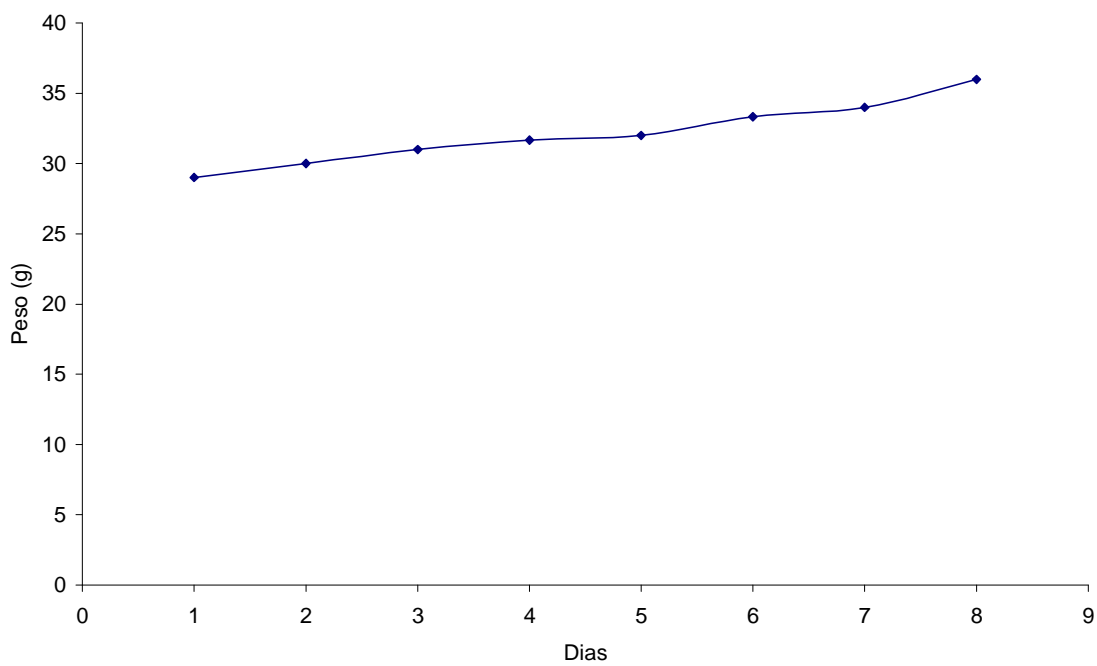


Figura 5

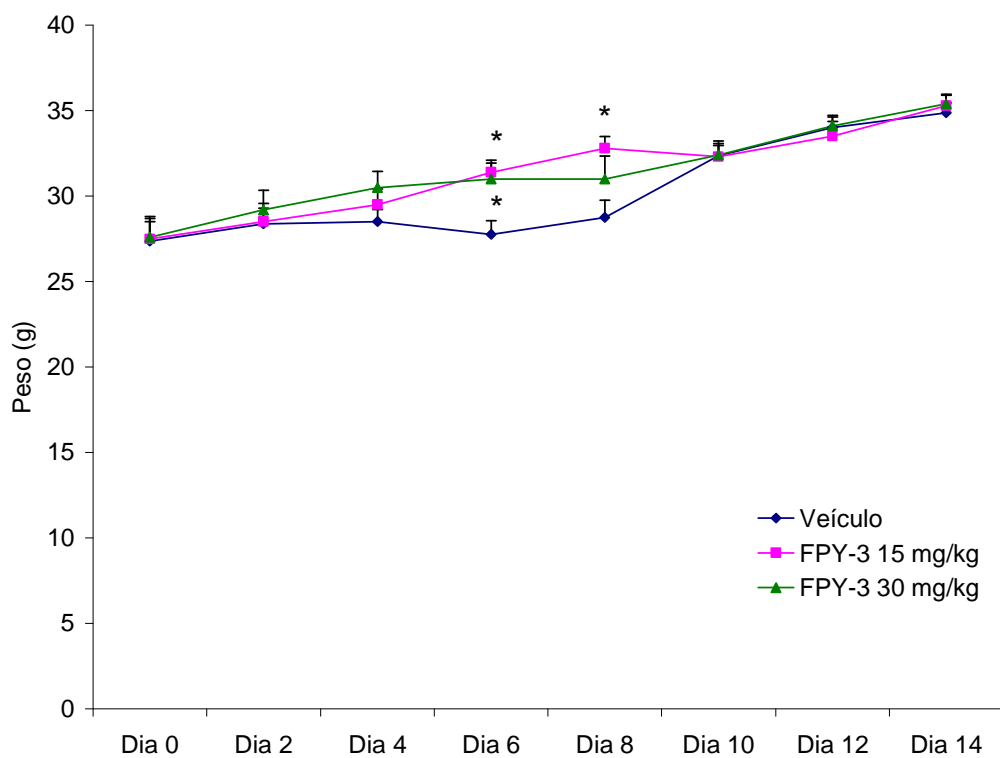
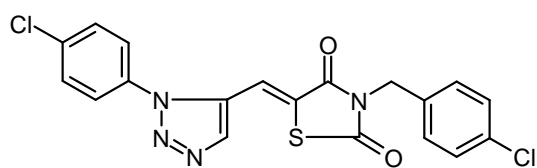
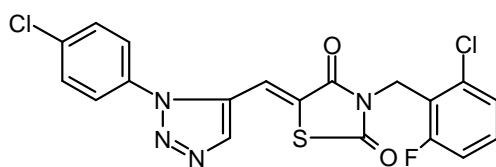


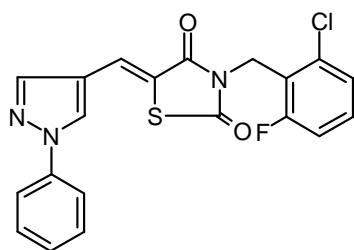
Figura 6



FPT-2



FPT-4



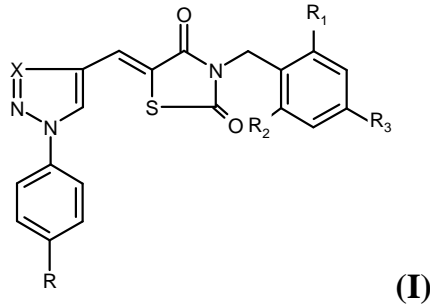
FPY-3

Figura 7



## Reivindicações

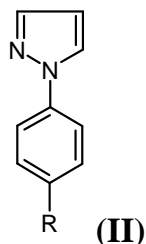
- 1) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA, **caracterizado por** compostos benziltiazolidinônicos de fórmula molecular (I)



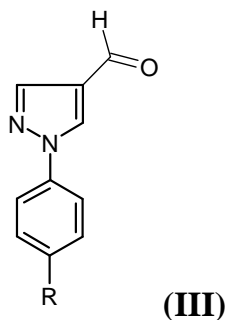
Sendo R: Cl, H; R1: Cl, H; R2: F, H; R3: Cl, H; X: N, C.

- 2) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** emprego das seguintes etapas na obtenção de compostos de fórmula molecular (I):
- a) condensação de fenilidrazinas funcionalizadas com 1,3-tetrametoxipropano;
  - b) formulação do 1-fenilpirazol funcionalizado (II) obtido em a);
  - c) diazotação e substituição nucleofílica aromática de anilinas funcionalizadas;
  - d) cicloadição [2+3] das azidas (IV) com álcool propargílico;
  - e) oxidação do álcool 1,2,3-triazólico (V) obtido na etapa d);
  - f) condensação tipo Knoevenagel-Cope dos derivados tiazolidinônicos benzilados com os aldeídos correspondentes: 1-fenil-4-formil-pirazólico ou 1,2,3-triazólicos.
- 3) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** etapa a)

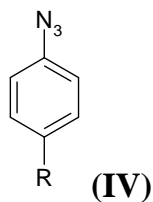
consistir numa reação de condensação de fenilidrazinas *para*-substituídas com tetrametoxipropano em solução, contendo um álcool e um ácido prótico, aquecida à temperatura de refluxo durante um período de tempo adequado, com posterior ajuste do pH do meio reacional, e, em seguida, extração com diclorometano e evaporação do solvente, para a obtenção dos compostos de fórmula (II).



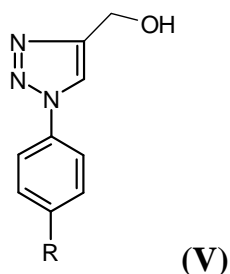
- 4) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** etapa b) consistir da adição de (II) a uma mistura equimolar de dimetilformamida e oxicloreto de fósforo, a qual é mantida na temperatura de 80-85°C por 12 horas, sendo ao término da reação, o pH do meio reacional é ajustado e, em seguida, extração com diclorometano e evaporação do solvente, para a obtenção dos compostos de formula geral (III).



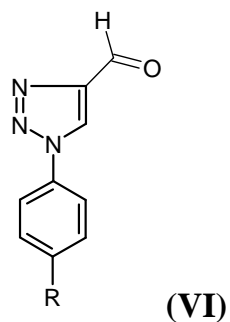
- 5) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** etapa c) consistir numa diazotação de (II) seguida de um tratamento com uma solução aquosa de nitrito de sódio em meio ácido por 40 minutos a temperatura de 0°C com o conseqüente tratamento do sal de diazônio obtido com uma solução aquosa de azida de sódio em meio básico, a temperatura ambiente por 120 minutos para obtenção dos compostos de fórmula molecular (IV)



- 6) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** etapa d), consistir no tratamento das arilazidas funcionalizadas (IV) com álcool propargílico em solução de tolueno a temperatura de refluxo durante um período de tempo variando entre 3 a 5 horas, seguido de cicloadição [2+3], para a obtenção dos produtos de fórmula molecular (V).



- 7) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pela** etapa e) consistir numa oxidação através do tratamento dos álcoois 1,2,3-triazólicos funcionalizados (V) com dióxido de manganês em solução contendo solvente clorado, a temperatura ambiente por período de tempo que varia entre 60 a 180 minutos seguida de filtração do meio e evaporação do solvente, para obtenção dos compostos de formula geral (VI).



- 8) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pela** última etapa da reação f) corresponder a uma condensação equimolar dos derivados 3-

benzil-tiazolidina-2,4-dionas funcionalizados com os aldeídos 1-fenil-4-formilpirazólico não substituídos de fórmula geral (III) e com o derivado 1-(4-clorofenil)-1H-[1,2,3]triazol-4-carbaldeído em presença de benzeno e piperidina como solvente, sendo que a mistura reacional é aquecida por 48 horas e em seguida, colocada a baixa temperatura seguida de filtração e lavagem com uma mistura de etanol/água e acetonitrila.

- 9) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** composições farmacêuticas compreendendo compostos de fórmula molecular (I) ou sais farmacêuticamente aceitáveis.
- 10) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA, **caracterizado por** compreender compostos de fórmula (I) ou sais farmacêuticamente aceitáveis por ser no uso em medicina, particularmente, contra esquizofrenia ou outras manifestações clínicas que requeiram o uso de antipsicóticos e composições farmacêuticas contendo as mesmas.
- 11) DERIVADOS BENZILTIAZOLIDINÔNICOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** uso de compostos de fórmula molecular (I) ser para manufatura de medicamentos, particularmente no tratamento da esquizofrenia ou outras manifestações clínicas que requeiram o uso de antipsicóticos.

### ***CAPÍTULO III***

*Avaliação do potencial efeito neuroprotetor de FPY-3, um derivado benziltiazolidinônico*

---



## RESUMO

A esquizofrenia é uma doença cerebral que se manifesta tipicamente na puberdade ou início da idade adulta. Evidências indicam uma origem no desenvolvimento neuronal da doença e sugerem que a manifestação na puberdade ou pós-puberdade está relacionada a maturações estruturais e alterações sinápticas que ocorrem nessa fase. Apesar de dados clínicos e neuropatológicos não sustentarem a hipótese da esquizofrenia como uma doença neurodegenerativa clássica, neuroimagens têm demonstrado que o volume de massa cinzenta encefálica apresenta uma redução progressiva em várias regiões cerebrais. Estudos mostrando que pacientes com esquizofrenia possuem volume encefálico reduzido e que alterações no volume de massa cinzenta na transição entre pré-psicótico para psicótico sustentam a teoria de dano neuronal excitotóxico na esquizofrenia. Alguns antipsicóticos, por sua vez, diminuem a taxa de redução de volume encefálico e possuem efeitos neuroprotetores em estudos pré-clínicos. No entanto, haloperidol apresentou efeito neurotóxico em estudos em camundongos. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor de FPY-3, um derivado benziltiazolidinônico, em cultura primária de neurônios cerebelares na presença ou ausência de glutamato em concentrações tóxicas. FPY-3 ( $10^{-10}$  a  $10^{-15}$ M) não alterou a viabilidade celular em 48h quando adicionado diretamente à cultura primária de neurônios indiferenciados, demonstrando a ausência de neuroproteção em células imaturas. Por outro lado, FPY-3 ( $10^{-9}$  a  $10^{-13}$ M) não apresentou efeito neurotóxico *per se* quando administrado diretamente à cultura de neurônios diferenciados em nenhum dos tempos avaliados: 24h, 48h e 72h. Além disso, na presença de glutamato (100  $\mu$ M), FPY-3 demonstrou um efeito protetor contra a morte neuronal induzida por glutamato, nas concentrações de  $10^{-10}$  a  $10^{-13}$ M, proteção essa que persistiu durante todos 24h, 48h e 72h. Considerando a hipótese neurodegenerativa da esquizofrenia, o efeito neuroprotetor encontrado para FPY-3 é um dado promissor e merece um estudo mais aprofundado.

**Palavras-chave:** cultura primária de neurônios cerebelares, derivado benziltiazolidinônico, neuroproteção, esquizofrenia.

## ABSTRACT

Schizophrenia is a brain disease manifested typically in puberty or early adulthood. Evidences indicate an origin in the neural development of the disease and suggest that the manifestation at puberty or post-puberty is related to structural maturation and synaptic changes occurring during this phase. Despite clinical and neuropathological data do not sustain the hypothesis of schizophrenia as a classical neurodegenerative disease, neuroimaging studies have demonstrated that the volume of brain grey matter has a progressive reduction in many brain regions. Studies showing that patients with schizophrenia have reduced brain size and changes in grey matter volume in the transition from pre-psychotic to psychotic, support the excitotoxic neuronal damage theory in schizophrenia. Some antipsychotic, in turn, decrease the rate of cerebral volume reduction and have neuroprotective effects in preclinical studies. However, haloperidol showed neurotoxic effect in studies in mice. The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effect of FPY-3, a benziltiazolidinone derivative, in cerebellum primary cell cultures in the presence or absence of glutamate at toxic concentrations. FPY-3 ( $10^{-10}$  to  $10^{-15}$ M) did not alter cell viability after 48 hours when added directly to the undifferentiated primary cell culture, demonstrating a lack of neuroprotective effect in immature cells. Moreover, FPY-3 ( $10^{-9}$  to  $10^{-13}$ M) did not show neurotoxic effect *per se* when administered directly to the differentiated neurons culture in any of the evaluated time: 24h, 48h and 72h. Furthermore, in the presence of glutamate (100 mM), FPY-3 demonstrated a protective effect against neuronal death induced by glutamate at the concentrations  $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M, protection that persisted for 24h, 48h and 72h. Considering the neurodegenerative hypothesis of schizophrenia, the neuroprotective effect found for FPY-3 is a promising result and deserves further study.

**Keywords:** cerebellum primary cell culture, benziltiazolidinone derivative, neuroprotection, schizophrenia.



## 1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é uma doença cerebral que se manifesta tipicamente na puberdade ou início da idade adulta e possui um curso flutuante. Evidências indicam uma origem no desenvolvimento neuronal da doença e sugerem que a manifestação na puberdade ou pós-puberdade está relacionada a maturações estruturais e alterações sinápticas que ocorrem nessa fase (Meyer-Linderberg, 2011). Apesar de dados clínicos e neuropatológicos não sustentarem a hipótese da esquizofrenia como uma doença neurodegenerativa clássica, neuroimagens têm demonstrado que o volume de massa cinzenta encefálica apresenta uma redução progressiva em várias regiões cerebrais (Scherk e Falkai, 2006). Estudos mostrando que pacientes com esquizofrenia possuem volume encefálico reduzido (Lawrie et al., 1999) e que alterações no volume de massa cinzenta na transição entre pré-psicótico para psicótico (Pantelis et al., 2003) sustentam a teoria de dano neuronal excitotóxico na esquizofrenia. Evidências sugerem que reduções volumétricas são devidas à perda de neuritos (dendritos, espinhos dendríticos e terminais axonais), e não à perda de corpo celular (Kolomeets et al., 2005; Glantz et al., 2006).

Uma variedade de dados experimentais e observacionais suporta a hipótese de que, apesar da esquizofrenia se manifestar no seu quadro clínico completo tipicamente no final da adolescência ou início da idade adulta, sinais de desenvolvimento neuronal anormal estão presentes desde cedo, e podem ser rastreados desde o segundo trimestre de gestação. A razão da esquizofrenia se manifestar após a adolescência é complexa e pode estar relacionada a uma interação de desenvolvimento de sistemas cerebrais neuronais críticos interrompido com uma remodelamento do desenvolvimento normal e extensivo que ocorre no final da adolescência, principalmente a mielinização de massa branca e alterações da sinapse cortical (Meyer-Linderberg, 2011).

A esquizofrenia não está associada com uma grande perda neuronal, mas sim com uma redução seletiva do número de tipos celulares específicos, assim como com alterações na morfologia de neurônios, incluindo a redução no comprimento dendrítico e densidade de espinhos. Ainda, existem evidências de que a atividade apoptótica está diminuída (Lieberman et al., 2008).

Alguns antipsicóticos diminuem a taxa de redução de volume encefálico (Scherk e Falkai, 2006) e possuem efeitos neuroprotetores em estudos pré-clínicos (Kopripiva et al., 2011). No entanto, haloperidol apresentou efeito neurotóxico (Ohno et al., 2010) em estudos pré-clínicos em camundongos. Lieberman e colaboradores (2005), por sua vez, demonstraram que pacientes tratados com haloperidol exibem uma diminuição significativa no volume de massa cinzenta, enquanto os tratados com olanzapina, não. Van Haren e colaboradores (2007) acompanharam pacientes esquizofrênicos durante cinco anos e observaram que o tratamento com clozapina e olanzapina estava associado com uma menor redução da massa cinzenta encefálica em relação aos pacientes esquizofrênicos tratados com haloperidol.

Em cultura primária de neurônios corticais de ratos, haloperidol induziu apoptose e reduziu os níveis de fosforilação de Akt e ativou caspase-3 (Ukai et al., 2004). Wang e colaboradores (2005) observaram que olanzapina e quetiapina bloquearam a ativação de caspase-3. Aripiprazol demonstrou um efeito neuroprotetor após 24h em cultura de neurônios corticais de ratos embriogênicos; entretanto, o mesmo não foi verificado para risperidona e olanzapina (Koprivica et al., 2010). Estudos realizados em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos (Behl et al., 1995) e em linhagem celular PC12 (Galili-Mosberg et al., 1999) mostraram um efeito citotóxico de haloperidol, o qual foi suprimido pela adição de antioxidantes. Um estudo usando uma linhagem celular humana NB e uma cultura de células primárias de camundongos demonstrou diferentes atividades neurotóxicas de vários antipsicóticos: perfenazina apresentou um efeito neurotóxico mais pronunciado, haloperidol e clozapina apresentaram um efeito intermediário, enquanto sulpirida e risperidona não apresentaram efeito neurotóxico. Com a exceção da clozapina, esse estudo verificou uma correlação entre a neurotoxicidade induzida pelo fármaco e seus efeitos extrapiramidais associados, sugerindo uma possível relação entre os dois fenômenos (Gil-Ad et al., 2002).

Este capítulo descreve o estudo inicial de FPY-3, um derivado benziltiazolidinônico com potencial efeito antipsicótico descrito no capítulo II. Tiazolidinonas englobam também ligantes PPAR (receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo) com atividade hipoglicemiante bem documentada (Yoshioka et al., 1989 apud Aneja et al., 2011; Tschöpe et al., 2011) e atividade neuroprotetora em estudo. Uryu

e colaboradores (2002) demonstraram a atividade neuroprotetora de troglitazona, um fármaco antidiabético ligante PPAR $\gamma$ , em um modelo de toxicidade induzida pelo glutamato em cultura primária de neurônios cerebelares. Ligantes PPAR têm também sido apontados como agentes potencialmente úteis no tratamento de doenças neuropsiquiátricas, como depressão e esquizofrenia (García-Bueno et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

Investigar o potencial efeito neuroprotetor de FPY-3, um derivado benziltiazolidinônico já descrito no Capítulo II.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

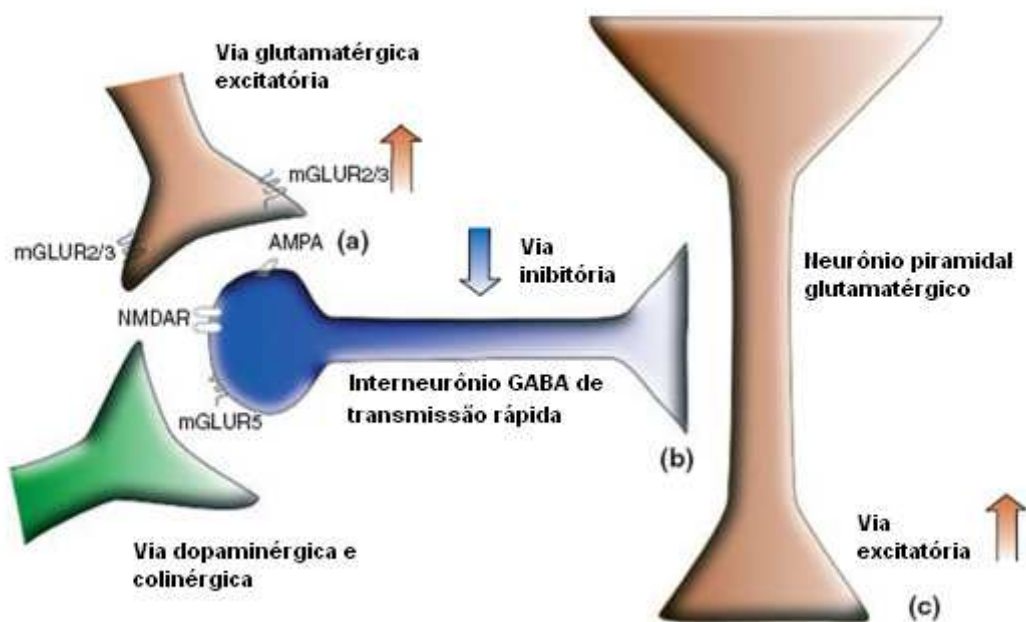
### **3.1 Excitotoxicidade**

O conceito de excitotoxicidade foi introduzido por Olney em 1969, quando ele verificou que o tratamento de camundongos com altas doses de glutamato causava lesões cerebrais. O aumento no nível de glutamato extracelular em determinadas doenças causa um aumento na ativação dos receptores de glutamato. A estimulação excessiva dos canais iônicos do receptor NMDA leva ao aumento do influxo de cálcio intracelular, desencadeando assim eventos secundários, como morte neural, aumento do tempo da despolarização da célula, desequilíbrio iônico e diminuição dos níveis intracelulares de ATP (Contestabile, 2002; Stahl, 2007).

Todos os principais subtipos de receptores glutamatérgicos podem levar à excitotoxicidade em populações neuronais; entretanto, a neurotoxicidade mediada pelo receptor NMDA é a mais estudada.

Até o presente momento, as três hipóteses principais da etiologia da esquizofrenia, a hipótese dopaminérgica (Klawans et al., 1972; Snyder 1972; Davis et al., 1991), a hipofunção de receptores NMDA (Javitt 1987; Tamminga 1998), e a hipótese da disfunção GABAérgica (Benes e Berreta, 2001; Lewis et al., 2005) vêm sendo vistas tradicionalmente de forma separada e, raramente, como uma única teoria. Entretanto, a

teoria da hipofunção de receptores NMDA não deve ser considerada contraditória à hipótese dopaminérgica, pois muitos estudos demonstram interações entre receptores dopaminérgicos e receptores NMDA em regiões cerebrais importantes como o hipocampo (Lisman e Otmakhova, 2001) e entre aferências glutamatérgicas e o núcleo dopaminérgico subcortical (Lisman e Grace, 2005). Outra teoria que também pode estar relacionada a outras hipóteses é o mau funcionamento de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, que gerariam uma desinibição generalizada no córtex cerebral (Stahl, 2007; Gaspar et al, 2009). De fato, alterações nos interneurônios GABAérgicos, os quais recebem muitas aferências de neurônios glutamatérgicos, são uma das mais reproduzíveis alterações neuroanatômicas encontradas em pacientes esquizofrênicos. Estas inter-relações estão demonstradas na figura 1.



**Figura 1.** Circuito básico das vias neuroquímicas envolvidas na esquizofrenia. O circuito crítico envolve a participação de interneurônios GABAérgicos de rápida transmissão (b) e neurônios piramidais glutamatérgicos (c). Alterações em todos os mecanismos moleculares neste circuito, incluindo receptores NMDA, AMPA, e mGluR (a e b) e suas vias intracelulares podem resultar em uma disfunção do sistema. Além disso, alterações na neurotransmissão da acetilcolina (Ach) ou dopamina podem ter participação na fisiopatologia da esquizofrenia, através da modulação destes circuitos. Figura adaptada de Gaspar e colaboradores, 2009.

### 3.2 Interneurônios GABAérgicos

O circuito neuronal cortical e hipocampal compreende neurônios excitatórios (a grande maioria composto por neurônios piramidais) e várias classes de interneurônios inibitórios GABAérgicos. Os interneurônios GABAérgicos são divididos em diferentes subtipos baseados na morfologia, eletrofisiologia, conectividade sináptica e expressão gênica. Os interneurônios que contêm parvalbumina inervam centenas de neurônios piramidais, controlando seus disparos e sincronia (Cobb et al., 1995; Miles et al., 1996).

Além da função fundamental de manutenção da função cortical, os interneurônios GABAérgicos são fundamentais na maturação do circuito neuronal durante o desenvolvimento pós-natal. Circuitos corticais GABAérgicos são altamente imaturos no nascimento (Chattopadhyaya et al., 2004). No córtex pré-frontal (CPF) de primatas, a maturação do padrão de inervação GABAérgica frequentemente se estende até o período de pós-adolescência (Hashimoto et al., 2009), sugerindo que problemas na maturação dos neurônios GABAérgicos podem levar à distúrbios neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia (Nakazawa et al., 2012).

Outra evidência de que a patofisiologia da esquizofrenia pode ter origem nos interneurônios vem de dados sugerindo que a hipofunção de receptores NMDA ocorre de forma mais robusta em interneurônios, e não em neurônios piramidais. Isso ocorre porque um único interneurônio se projeta para centenas de neurônios piramidais (Cobb et al., 1995). Assim, a hipofunção de receptores NMDA em um único interneurônio poderia desinibir o disparo de um grande número de neurônios piramidais corticais e, com isso, aumentar o impacto do bloqueio de um receptor NMDA de neurônios piramidais individuais (Homayoun e Moghaddam, 2007).

Estudos experimentais e evidências clínicas sugerem que uma disfunção na inibição GABAérgica e o consequente desbalanço entre excitação e inibição do córtex é responsável, ao menos em parte, pelo processo patofisiológico de várias desordens neuropsiquiátricas, entre elas a esquizofrenia (Benes e Berretta, 2001). Entretanto, ainda não se sabe se o comprometimento na rede de interneurônios é a causa primária da esquizofrenia ou um efeito secundário, decorrente de alterações em outros sistemas neurotransmissores (Nakazawa et al., 2012).

Reynolds e colaboradores (2004) demonstraram que uma quantidade reduzida de células parvalbumina nas regiões frontais e hipocâmpais é encontrada na esquizofrenia. Essa redução de parvalbumina pode representar a perda verdadeira de densidade celular ou ainda, uma perda de interneurônios GABAérgicos, o que pode levar a uma excitotoxicidade secundária devido ao excesso de glutamato.

### 3.3 Hipofunção de receptores NMDA

A hipótese da hipofunção de receptores NMDA na esquizofrenia (Olney e Farber, 1995; Olney et al., 1999) veio para unificar o modelo bioquímico da doença, complementando algumas questões pendentes na hipótese dopaminérgica. Essa hipótese da hipofunção de receptores NMDA surgiu da observação de que drogas como a fenciclidina (PCP) e a cetamina, antagonistas não-seletivos de receptores NMDA, ao se ligar ao sítio intracanal do receptor, preveniam a entrada de cálcio na célula, levando à minimização de efeitos observados na esquizofrenia, como alucinações, desordem de pensamento e, principalmente, sintomas negativos (Krystal et al., 1994).

Posteriormente, Olney e Farber (1995) propuseram primeiramente que o sítio de ação para cetamina e PCP ao induzir sintomas do tipo esquizofrênico, e neurotoxicidade em ratos, eram os receptores NMDA expressos em interneurônios GABAérgicos no tálamo e no cérebro frontal basal. A rede de efeitos pelo bloqueio de receptores NMDA seria a desinibição de projeções neuronais, resultando na elevação do glutamato cortical e na liberação de acetilcolina. Consequentemente, alterações neurodegenerativas poderiam desenvolver um processo excitotóxico.

A função reduzida de receptores NMDA em interneurônios corticais poderia aumentar o processo de excitotoxicidade através da desinibição das projeções neuronais glutamatérgicas cortico-cortical e cortico-talâmica (Konradi e Heckers, 2003; Stone et al., 2007). Law e Deakin (2001) verificaram em estudos *post mortem* a redução de mRNA para a subunidade NR1 de receptores NMDA no hipocampo esquerdo de pacientes esquizofrênicos.

### **3.4 Cultura primária de neurônios cerebelares como uma ferramenta de estudo da excitotoxicidade**

Um sistema *in vitro* de cultura celular pode servir como um modelo bastante útil para o estudo de substâncias que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC). Entretanto, ele deve se assemelhar à natureza e ao comportamento de neurônios *in vivo*. Para tanto, ele deve ser composto de uma população quase homogênea de células para permitir estudos bioquímicos e de biologia molecular em toda a cultura e as células devem ser de fácil manuseio. Muitas das linhagens celulares de neurônios disponíveis não são adequadas devido a alterações no seu fenótipo quando comparadas com as células de origem. Uma alternativa interessante é encontrada em culturas granulares, que podem servir como um modelo adequado de neurônios altamente diferenciados. A desvantagem de utilização de células primárias, no entanto, é que elas consistem em populações neuronais mistas. Assim, em circunstâncias particulares, a presença de componentes não neuronais (principalmente astrócitos) pode ser problemática, uma vez que eles possuem diferentes características funcionais e metabólicas. Entretanto, células granulares cerebelares são de um elevado grau de pureza. Mais de 90% das células em cultura são células cerebelares granulares, constituindo a maior população neuronal homogênea no encéfalo de mamíferos (D'mello et al., 1993; Contestabile, 2002). Além disso, elas amadurecem tardiamente (pós-natal) no desenvolvimento do SNC. Estas características permitem o isolamento dessas células em animais recém-nascidos e, assim, podem ser cultivadas *in vitro* (Krämer e Minichiello, 2010). A cultura primária de neurônios cerebelares tem sido usada há quase 30 anos e, desde então, se tornou o modelo *in vitro* mais popular para estudar aspectos da neurobiologia desenvolvimental, funcional e patológica em uma população homogênea de neurônios (Contestabile, 2002).

Culturas primárias de neurônios fetais ou neonatais também são amplamente utilizadas para estudar neurodegeneração e neuroproteção (Contestabile, 2002). Como já mencionado, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro, e também uma potente excitotoxina. Quando exposto por um longo período de tempo em culturas neuronais, concentrações micromolares podem levar a uma rápida neurotoxicidade (Chuang et al., 1992; Schori et al. 2002). Chuang e colaboradores (1992) demonstraram por diferentes métodos de quantificação de sobrevivência neuronal que o glutamato,

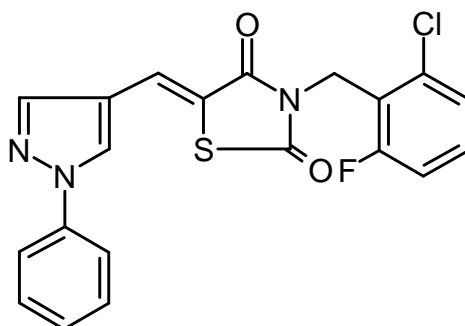
quando adicionado a culturas primárias de neurônios cerebelares, induz neurotoxicidade, efeito bloqueado por MK-801, demonstrando que a toxicidade é mediada pelos receptores NMDA (Schori et al., 2002).

Uma vez que a cultura primária de neurônios expressa tanto receptores glutamatérgicos permeáveis a cálcio como receptores não NMDA, esses neurônios são um importante modelo usado para análise de excitotoxicidade (Carroll et al., 1998; Lim e Ho, 1998).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparação de FPY-3

A preparação em escala de miligramas e multigramas de FPY-3: 3-(2-Cloro-6-fluoro-benzil)-5-(1-fenil-1*H*-pirazol-4-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (**2**) foi realizada pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da UFPE conforme descrito no Capítulo II.



(2)

### 4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 7 a 9 dias, provenientes de INSERM U982 (Université de Rouen, França). Os ratos foram mantidos em caixas plásticas de 28 x 42 x 16 cm em grupos de, no máximo, 1 fêmea com os filhotes por caixa. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante ( $23 \pm 1$  °C), sob



sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento.

### **4.3 Ética**

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios éticos relatados por Goldim (1995) e as normas do Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), Resolução 714, de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e a Lei nº 11794 de outubro de 2008, que estão de acordo com o European Communities Council Directive de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC). Os ratos foram eutanasiados por decapitação para retirada da estrutura cerebral de interesse. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (projeto nº17613).

### **4.4 Drogas e Fármacos**

A substância FPY-3 foi sintetizada e caracterizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- $H^1$ ) pelo Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUGPIT – UFPE). Outras drogas e fármacos utilizados foram: (+)-MK-801 (Sigma®), MPEP (Tocris®), EGLU (Tocris®), em grau farmacêutico.

### **4.5 Ensaios *in vitro***

Estes experimentos foram realizados na Equipe Facteurs Neurotrophiques et Différenciation Neuronale, INSERM U982 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 982), Université de Rouen, França, sob supervisão do Dr. David Vaudry.

#### 4.5.1 *Cultura primária de neurônios cerebelares*

A cultura primária de neurônios foi preparada empregando-se cerebelo de ratos de 7 a 9 dias (Gallo et al., 1982; Krämer e Minichiello, 2010; Facci e Skaper, 2012). As células foram dissociadas do cerebelo por digestão enzimática com tripsina (2,5%) e trituradas para obtenção de uma suspensão celular. As células foram semeadas em placas de 24 poços pré-preparadas com poly-D-lysina, na densidade de  $1,2 \times 10^6$  células/mL. As células dissociadas foram cultivadas de duas diferentes formas: A) na ausência de soro no meio de cultura (DMEN, HAM F12, antibiótico, Gibco®) (cultura de células indiferenciadas/imaturas); B) em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino (Lonza®) e 25 mM de KCl (cultura de células diferenciadas/maduras). Citosina arabinofuranosida (10  $\mu$ M) foi adicionada 24 h após a preparação da cultura primária de células diferenciadas para impedir o crescimento de células não-neuronais. As culturas foram mantidas em incubadora a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.5.2 *Estudo do efeito de FPY-3 sobre culturas primárias de neurônios cerebelares e do seu efeito neuroprotetor em um modelo de morte neuronal induzida por glutamato*

Cinco dias ou 3 horas após a preparação das culturas primárias de neurônios diferenciados e indiferenciados, respectivamente, as células foram tratadas com FPY-3 na faixa de concentração de  $10^{-10}$  a  $10^{-15}$ M. As diluições de FPY-3 foram preparadas em meio de cultura a partir de uma solução-mãe (10 mM, 100% de DMSO). A concentração final máxima de DMSO nas diferentes concentrações foi de 0,01%. Cada tratamento foi realizado em quadruplicata, sendo repetido de 3 a 5 vezes em culturas independentes. As placas foram tratadas através da adição direta da diluição contendo FPY-3 (20  $\mu$ L) ao meio de cultura das placas.

No modelo de morte induzida pelo glutamato (excitotoxicidade) foram utilizadas apenas as culturas diferenciadas com cinco dias. As placas foram tratadas com as diferentes concentrações de FPY-3 ( $10^{-9}$  a  $10^{-13}$ M) e, após 2 horas, coincubadas, ou não, com glutamato (100  $\mu$ M) (Chuang et al., 1992).

Como controle para ação neuroprotetora foi utilizado PACAP ( $10^{-7}$ M) (polipeptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária) com reconhecida atividade antiapoptótica (Vaudry et al., 1999).

#### *4.5.3 Efeito de FPY-3 em associação com diferentes antagonistas glutamatérgicos no modelo de excitotoxicidade em cultura primária de neurônios diferenciados*

As culturas primárias de neurônios diferenciados foram tratadas no quinto dia após a sua preparação, conforme já descrito, com FPY-3 ( $10^{-12}$ M) e diferentes antagonistas glutamatérgicos: antagonista de receptores NMDA: MK-801 (10  $\mu$ M), antagonista pré-sináptico de receptores mGluR2/3, Grupo II: EGLU (10  $\mu$ M) e antagonista não-competitivo de receptores mGluR5, Grupo I: MPEP (1  $\mu$ M). Após 48 horas, foi avaliada a viabilidade celular nessas culturas.

#### *4.5.4 Avaliação da viabilidade celular*

Vinte e quatro, 48 ou 72h após os diferentes tratamentos descritos no item acima, foi realizada a medida da viabilidade celular para as culturas diferenciadas. Para as culturas indiferenciadas, a viabilidade celular foi medida apenas 48 horas após os tratamentos. A técnica utilizada, em ambos os casos, foi da fluoresceína diacetato. Essa técnica consiste da medida de fluorescência (leitor de placas FlexStation3), após lise celular. É medida a quantidade total de fluoresceína produzida a partir da fluoresceína diacetato pelas células vivas em cada poço da placa (Didier et al., 1990). Os resultados foram confirmados por microscopia de fluorescência (Microscópio Leica) através do software MetaMorph, com aumento de 20x, usando a técnica da calceína (Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity, Molecular Probes). O derivado acetometoxi da calceína (calceína AM) pode ser transportado através da membrana celular em células vivas. Esse grupo acetometóxi obscurece a parte da molécula que forma quelato com cálcio. Após o transporte na célula, esterases intracelulares removem o grupo. A molécula liga-se ao cálcio no interior da célula, resultando numa forte fluorescência verde. Como células mortas perdem esterases ativas, somente células vivas são marcadas (Harvey E Chintala, 2007).

## 4.6 Análise Estatística

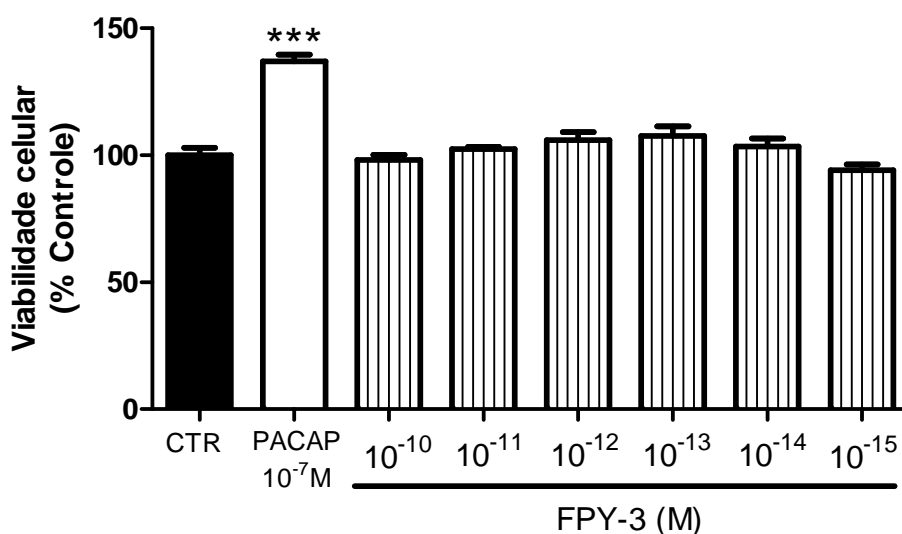
Para a realização das análises estatísticas dos ensaios *in vitro* foi utilizado o *software* Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation ®). Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de PT-31 em cultura primária de neurônios cerebelares foi utilizada uma ANOVA seguida por Dunnet (na ausência de glutamato) ou Bonferroni (na presença de glutamato). Aceitou-se o nível de significância  $P < 0,05$  (User's Manual, 1997).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ensaios *in vitro*

#### 5.1.1 Efeito de diferentes concentrações de FPY-3 em cultura primária de neurônios indiferenciados

FPY-3 ( $10^{-10}$  a  $10^{-15}$ M) não alterou a viabilidade celular em 48h (Figura 2) quando adicionado diretamente à cultura primária de neurônios indiferenciados (cultura sem soro), em relação ao controle, demonstrando a ausência de neuroproteção em células imaturas. Como esperado, PACAP aumentou a viabilidade celular (efeito antiapoptótico) nestas condições.



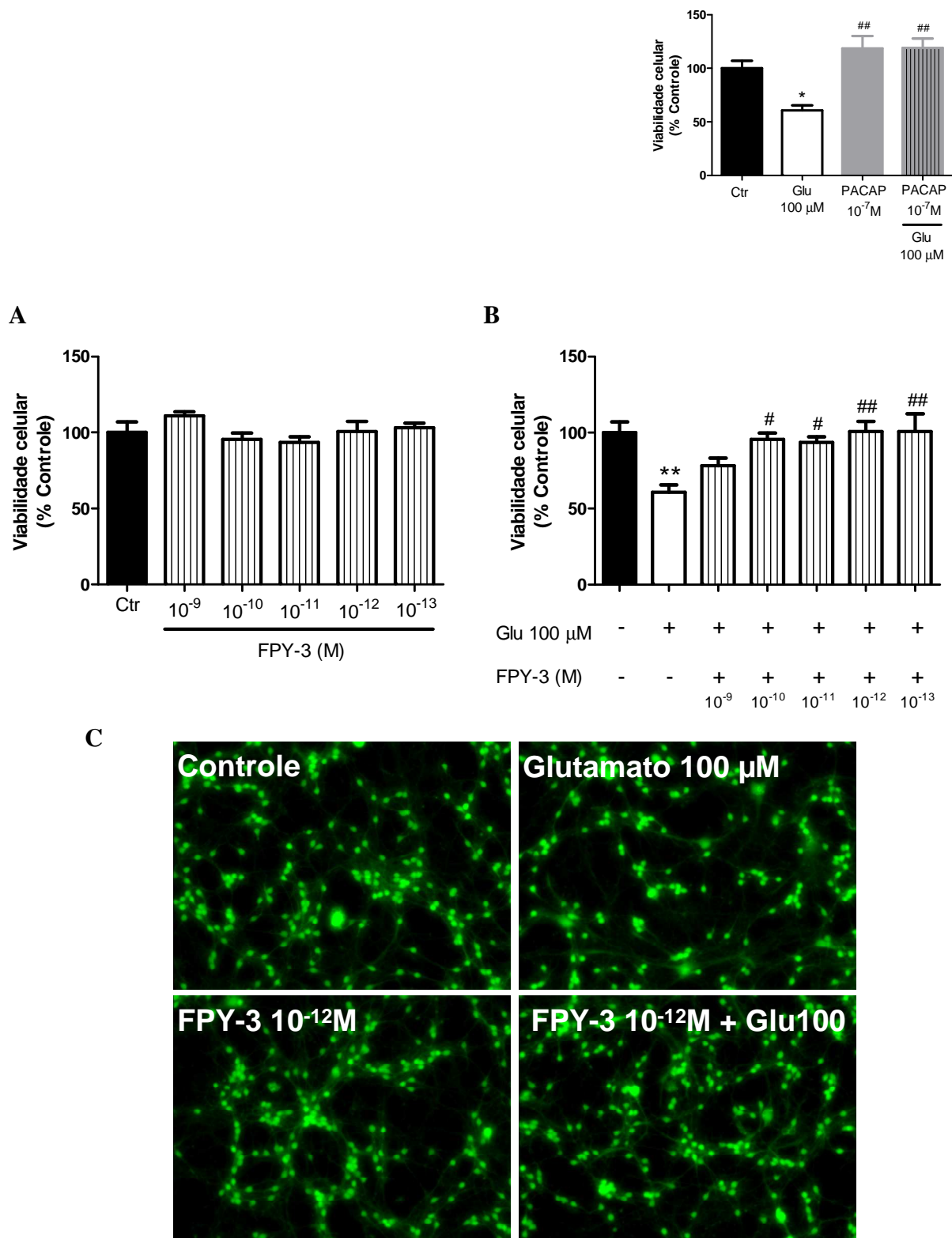
**Figura 2.** Efeito de FPY-3 ( $10^{-10}$  a  $10^{-15}$ M) e PACAP ( $10^{-7}$ M) em cultura primária de neurônios cerebelares indiferenciados (3-5 placas, quadruplicata). Resultados expressos

em média±erro padrão. ANOVA *post hoc* Dunnet. Diferença significativa em relação do grupo CTR (controle) \*\*\* $P < 0,001$ .

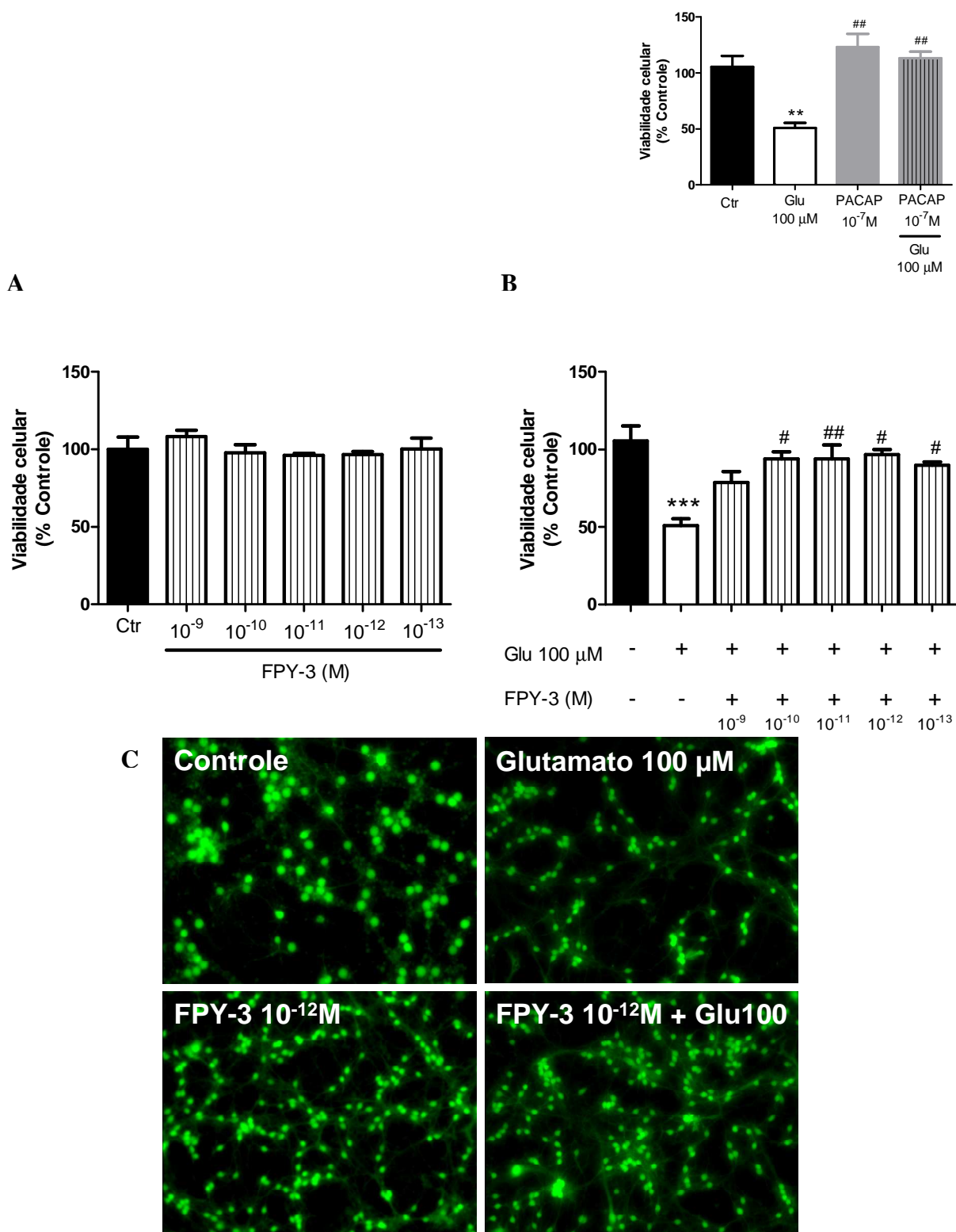
### *5.1.2 Efeito de diferentes concentrações de FPY-3 em cultura primária de neurônios diferenciados em presença de glutamato*

FPY-3 ( $10^{-9}$  a  $10^{-13}$ M) não apresentou efeito neurotóxico *per se* quando administrado diretamente à cultura de neurônios diferenciados em nenhum dos tempos avaliados: 24h (Figura 3A), 48h (Figura 4A) e 72h (Figura 5A).

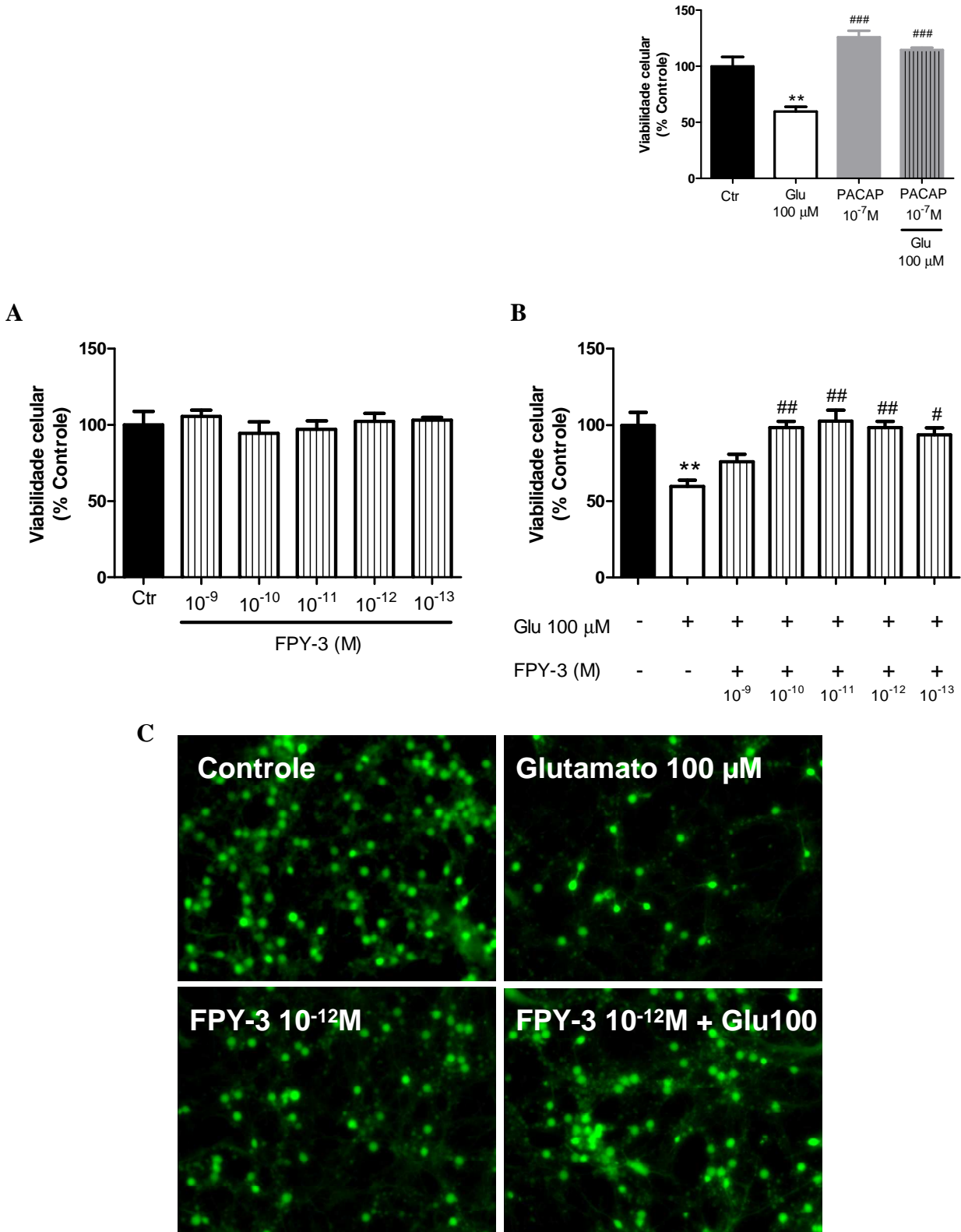
Na presença de glutamato (100  $\mu$ M), FPY-3 demonstrou um efeito protetor contra a morte induzida por glutamato, nas concentrações de  $10^{-10}$  a  $10^{-13}$ M, proteção essa que persistiu durante todos os tempos avaliados: 24h (Figura 5B), 48h (Figura 6B) e 72h (Figura 7B).



**Figura 3.** Efeito de FPY-3 ( $10^{-9}$  a  $10^{-13}$ M) em cultura primária de neurônios cerebelares em 24h de tratamento na ausência (A) ou na presença (B) de 100 μM de glutamato (3-4 placas, quadruplicata). C) Imagens dos tratamentos feitas pela técnica da calceína. A) ANOVA *post hoc* Dunnet. B) ANOVA *post hoc* Bonferroni. Resultados expressos em média±erro padrão. Diferença significativa em relação ao grupo Ctr (controle, não tratado) \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo Glu100 (glutamato 100 μM) # $P < 0,05$  ## $P < 0,01$  ### $P < 0,001$ .



**Figura 4.** Efeito de FPY-3 ( $10^{-9}$  a  $10^{-13}$ M) em cultura primária de neurônios cerebelares em 48h de tratamento na ausência (A) ou na presença (B) de 100  $\mu$ M de glutamato (3-4 placas, quadruplicata). C) Imagens dos tratamentos feitas pela técnica da calceína. A) ANOVA *post hoc* Dunnett. B) ANOVA *post hoc* Bonferroni. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão. Diferença significativa em relação ao grupo Ctr (controle, não tratado) \* $P$ <0,05 \*\* $P$ <0,01 \*\*\* $P$ <0,001. Diferença significativa em relação ao grupo Glu100 (glutamato 100  $\mu$ M) # $P$ <0,05 ## $P$ <0,01 ### $P$ <0,001.

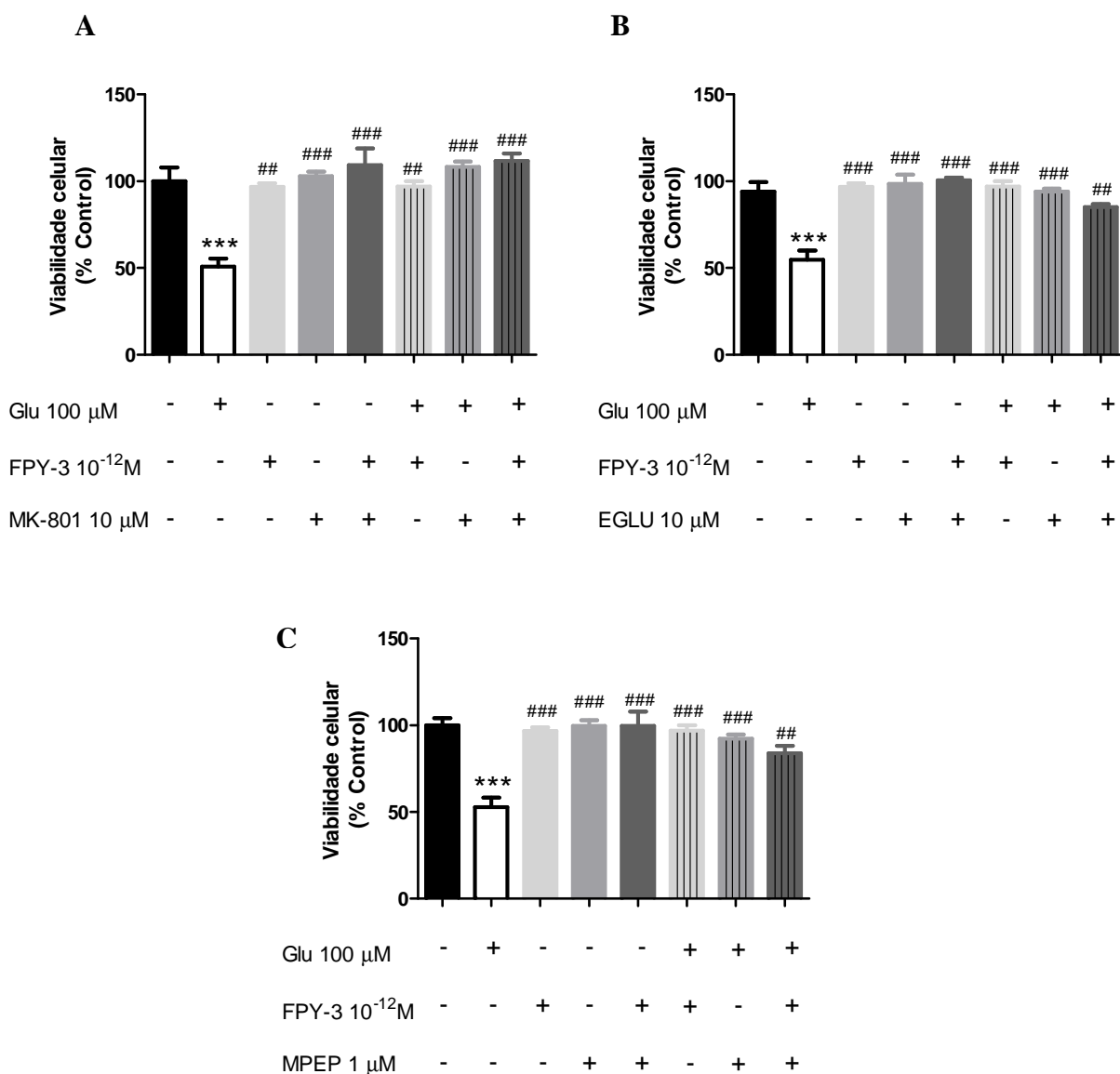


**Figura 5.** Efeito de FPY-3 (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-13</sup>M) em cultura primária de neurônios cerebelares em 72h de tratamento na ausência (A) ou na presença (B) de 100 μM de glutamate (3-4 placas, quadruplicata). C) Imagens dos tratamentos feitas pela técnica da calceína. A) ANOVA *post hoc* Dunnet. B) ANOVA *post hoc* Bonferroni. Resultados expressos em média±erro padrão. Diferença significativa em relação ao grupo Ctr (controle, não tratado) \**P*<0,05 \*\**P*<0,01 \*\*\**P*<0,001. Diferença significativa em relação ao grupo Glu100 (glutamate 100 μM) #*P*<0,05 ##*P*<0,01 ###*P*<0,001.



### 5.1.3 Efeito de FPY-3 em associação com diferentes antagonistas glutamatérgicos no modelo de excitotoxicidade em cultura primária de neurônios diferenciados

FPY-3 ( $10^{-12}$ M) não potencializou o efeito neuroprotetor dos antagonistas glutamatérgicos MK-801 (iGlu NMDA), EGLU (mGluR2/3, Grupo II) e MPEP mGluR5, Grupo I) em 48 horas.



**Figura 6.** Efeito de FPY-3 ( $10^{-12}$ M) em cultura primária de neurônios cerebelares em 48h de tratamento com MK-801 (10  $\mu$ M) (A) EGLU (10  $\mu$ M) (B) e MPEP (1  $\mu$ M) (C) (3-4 placas, quadruplicata). ANOVA *post hoc* Bonferroni. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão. Diferença significativa em relação ao grupo Ctr (controle, não tratado) \*\*\* $P$ <0,001. Diferença significativa em relação ao grupo Glu100 (glutamato 100  $\mu$ M) ## $P$ <0,01 ### $P$ <0,001.

## 6. DISCUSSÃO

FPY-3 demonstrou um efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida pelo glutamato em culturas primárias de neurônios cerebelares diferenciados, o que representa uma vantagem em relação a alguns antipsicóticos, como haloperidol (Ukai et al., 2004), risperidona (Koprivica et al., 2010) e clozapina (Gil-Ad et al., 2002). Esse efeito neuroprotetor foi bastante robusto, persistindo durante as 72 horas avaliadas. Entretanto, esse efeito não foi verificado em culturas de células imaturas, sugerindo um efeito seletivo para células diferenciadas e com a rede neuronal já formada.

O efeito protetor de FPY-3 sobre a morte neuronal induzida por glutamato não foi alterado pela coincubação com antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópico NMDA (MK-801) e metabotrópicos mGluR5 (MPEP) e mGluR2/3 (EGLU), os quais, por sua vez, apresentaram também um efeito protetor contra a toxicidade induzida pelo glutamato. Muitos estudos relacionando neuroproteção e ligantes de receptores mGlu têm sido publicados, mas não encontramos estudos mostrando o efeito dos antagonistas metabotrópicos MPEP e EGLU em cultura primária de neurônios cerebelares com indução de toxicidade por glutamato. Além disso, os estudos apresentam resultados conflitantes, dependendo do momento da adição dos ligantes, a natureza da preparação, a concentração da substância ou a presença ou ausência de células gliais, como pode ser observado nos dados relatados a seguir.

Agonistas do Grupo II mGluR2/3 inibem a liberação de glutamato e promovem a síntese e liberação de fatores neurotróficos em astrócitos (Bruno et al., 2001). Movsesyan e Faden (2006) demonstraram que a atividade neuroprotetora de potenciais ativadores do Grupo II de mGluRs, após um trauma tanto em culturas neuronais como em culturas mistas, é mediada pelos receptores mGluR2, e não mGluR3. Mukhin e colaboradores (1997) verificaram em um modelo celular de injúria neuronal pós-traumática, usando uma cultura mista de neurônios e células gliais, que a ativação de mGluRs do Grupo I exacerbou a morte neuronal induzida por NMDA, enquanto a inibição desses receptores foi neuroprotetora. Kohara e colaboradores (2008) mostraram que YM-202074, um antagonista seletivo de receptores mGluR1, apresentou um efeito neuroprotetor, reduzindo o volume do infarto. O estudo realizado por Szydlowska e colaboradores (2007) demonstrou o potencial efeito neuroprotetor tanto de antagonistas seletivos

mGluR1 (EMQMCM) como de antagonistas mGluR5 (MPEP), em fatias hipocampais e em modelo de isquemia *in vivo*. Entretanto, Blaabjerg e colaboradores (2003) verificaram em fatias hipocampais organotípicas de ratos expostas a concentrações excitotóxicas de NMDA que o efeito neuroprotetor de DHPG, um agonista não seletivo de receptores mGlu do Grupo I, foi abolido por um antagonista seletivo mGluR1 (LY367385), porém não pelo antagonista seletivo mGluR5 (MPEP). No entanto, esse efeito só foi visto quando DHPG foi adicionado às fatias hipocampais antes da exposição ao NMDA, sendo perdido quando adicionado por 2 horas imediatamente após o insulto. Bao e colaboradores (2001) verificaram que tanto o agonista mGluR5 (CHPG) como o antagonista mGluR5 (MPEP) são neuroprotetores quando administrados após a isquemia cerebral, evidenciando a complexidade dos mecanismos envolvidos com neuroproteção.

Estudos avaliando o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na possível ação neuroprotetora dos antipsicóticos são raros e nenhum foi encontrado utilizando cultura primária de neurônios cerebelares nas bases consultadas neste trabalho. O tratamento de culturas hipocampais organotípicas com quetiapina, um antipsicótico atípico, reduziu significativamente a toxicidade induzida por NMDA, sugerindo que a quetiapina possui um efeito neuroprotetor. Esse efeito foi perdido após 2 horas de tratamento com DHPG. O bloqueio isolado de receptores mGluR1 (antagonista LY367385) e mGluR5 (antagonista MPEP) não aboliu o efeito neuroprotetor da quetiapina. Entretanto, a coadministração dos antagonistas mGluR1 e mGluR5 bloqueou o efeito neuroprotetor, sugerindo que a ação neuroprotetora da quetiapina requer a ativação global de mGluRs do Grupo I para ocorrer (Baskys et al., 2005).

Neste trabalho demonstramos que efeito protetor de FPY-3 contra a morte neuronal induzida por glutamato parece não estar relacionado com sua capacidade de interagir com receptores NMDA, mGluR2/3 e mGluR5, cuja ativação (mGluR2/3) ou inativação (NMDA e mGluR5) pode resultar em aumento dos níveis de glutamato e consequente excitotoxicidade. Porém, até o momento, não temos dados sobre o perfil de ligação de FPY-3 a esses receptores. Sabe-se que ele não se liga a receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> e GABA<sub>A</sub> (Betti, 2009). Por outro lado, FPY-3 pertence ao mesmo grupo químico (tiazolidinônico) da troglitazona, um ligante de receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR), com ação

neuroprotetora demonstrada no mesmo modelo utilizado neste trabalho. A troglitazona protegeu neurônios cerebelares da toxicidade induzida pelo glutamato em cultura primária quando adicionada após a exposição ao glutamato, sem bloquear o influxo de cálcio mediado pelos receptores NMDA, sugerindo que seu efeito neuroprotetor é devido a outros produtos consequentes da ativação dos receptores NMDA (Uryu et al., 2002).

Receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR) são membros da superfamília de receptores hormonais nucleares, os quais são fatores de transcrição ativados por ligantes. Até o presente momento, três isotipos foram relatados: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ . Inicialmente, pensava-se que a atividade de PPAR era limitada ao metabolismo lipídico e à homeostase glicêmica. Estudos posteriores mostraram que a ativação de PPAR regula a resposta anti-inflamatória, a proliferação e a diferenciação celular, assim como a apoptose (Houseknecht et al., 2002; Sung et al., 2004). Inúmeros estudos atuais apontam o efeito neuroprotetor de agonistas PPAR $\gamma$  (Rosa et al., 2008; Swanson et al., 2011; Semple e Haeusslein, 2011; Martin et al., 2012). PPAR $\gamma$  é expresso em vários tipos celulares no Sistema Nervoso Central, como microglia, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Carta et al., 2011).

Devemos levar em consideração também que o modelo de toxicidade celular aqui utilizado é uma fonte de estresse e, este último, está fortemente associado com uma resposta inflamatória (García-Bueno et al., 2010). Evidências sugerem uma hipótese neuroinflamatória na esquizofrenia (Monji et al., 2009). Dados neuropsicofarmacológicos demonstram que antipsicóticos atípicos (clozapina, olanzapina e risperidona) e típicos (haloperidol) modulam a produção de citosinas pró-inflamatórias (Kato et al., 2007) e sua normalização está correlacionada à melhora de sintomas psicóticos (Monji et al., 2009). Agonistas PPAR $\gamma$  reduzem a expressão de mediadores pró-inflamatórios (Dantzer et al., 2008) e ativam vias antioxidantes (Park et al., 2004).

Os receptores PPAR também são de grande interesse no contexto da esquizofrenia porque regulam o metabolismo lipídico e diabetes e, em especial, o equilíbrio entre a gordura visceral e periférica, equilíbrio este alterado em pacientes esquizofrênicos, que ainda pode ser agravado com o uso de antipsicóticos (Horrobin, 2003). No capítulo anterior, demonstramos em um estudo de toxicidade em camundongos, que os parâmetros bioquímicos e hematológicos e o ganho de massa corporal não foram alterados de forma

significativa durante 14 dias de tratamento com FPY-3 (15 e 30 mg/kg, v.o.). Estes resultados podem indicar uma possível vantagem de FPY-3 sobre os antipsicóticos visto que estudos têm atribuído ao uso de antipsicóticos atípicos a ocorrência de síndrome metabólica. Henderson e colaboradores (2000) demonstraram que mais de um terço dos pacientes esquizofrênicos tratados com clozapina durante cinco anos desenvolveram diabetes. Um estudo no qual os camundongos foram tratados pela via oral durante sete dias com antipsicóticos, verificou que clorpromazina, clozapina e ziprasidona aumentaram os níveis plasmáticos de triglicérides (Arulmozhi et al., 2006). Também é atribuída à clorpromazina e à clozapina a indução de hiperglicemia em camundongos (Dwyer e Donohoe, 2003; Arulmozhi et al., 2006), e o aumento de peso corporal dos animais (Cope et al., 2005).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a hipótese neurodegenerativa da esquizofrenia, o efeito neuroprotetor encontrado para FPY-3 é um dado promissor e merece um estudo mais aprofundado, como o estudo de marcadores envolvidos no processo de apoptose, por exemplo Bcl-2, Bax e caspase-3.

## 8. REFERÊNCIAS

ANDERSEN, S.L.; TEICHER, M.H. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. **Trends in Neurosciences** 31(4): 183-191, 2008.

ANEJA, D.K.; LOHAN, P.; ARORA, S.; SHARMA, C.; ANEJA, K.R.; PRAKASH, O. Synthesis of new pyrazolyl-2, 4-thiazolidinediones as antibacterial and antifungal agents. **Organic and Medicinal Chemistry Letters** 1: 15-26, 2011.

ARULMOZHI, D.K.; DWYER, D.S.; BODHANKAR, S.L. Antipsychotic induced metabolic abnormalities: An interaction study with various PPAR modulators in mice. **Life Sciences** 79: 1865–1872, 2006.

BAO, W.L.; WILLIAMS, A.J.; FADEN, A.I.; TORTELLA, F.C. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. **Brain Research** 922: 173–179, 2001.

BARROS, C.D.; AMATO, A.A.; OLIVEIRA, T.B.; IANNINI, K.B.R.; DA SILVA, A.L.; DA SILVA, T.G.; LEITE, E.S.; HERNANDES, M.Z.; DE LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; NEVES, F.S.R.; PITTA, I.R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR $\alpha$  ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 18: 3805–3811, 2010.

BASKYS, A.; BAYAZITOV, I.; FANG, L.; BLAABJERG, M.; POULSEN, F.R.; ZIMMER, J. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis **Neuropharmacology** 49: 146-156, 2005.

BEHL, C.; RUPPRECHT, R.; SKUTELLA, T.; HOLSBOER, F. Haloperidol-induced cell death--mechanism and protection with vitamin E in vitro. **Neuroreport** 7(1):360-364, 1995.

BENES, F.M.; BERRETTA, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology** 25: 1-27, 2001.

BETTI, A.H. Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados *N*-fenilpiperazínicos e isómeros: *N*-benzilimidazolinas e *N*-benziltiazolidinas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2009.

BLAABJERG, M.; FANG, L.; ZIMMER, J.; BASKYS, A. Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. **Experimental Neurology** 183: 573–580, 2003.

D'MELLO, S.R.; GALLI, C.; CIOTTI, T.; CALISSANO, P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(23): 10989-10993, 1993.

BRASIL. Ministério Público. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Publicada no DOU 9.10.2008.

BRUNO, V.; BATTAGLIA, G.; COPANI, A.; D'ONOFRIO, M.; DI IORIO, P.; DE BLASI, A.; MELCHIORRI, D.; FLOR, P.J.; NICOLETTI, F. Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes as Targets for Neuroprotective Drugs. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 21: 1013–1033, 2001.

CARROLL, F.Y.; CHEUNG, N.S.; BEART, P.M. Investigations of non-NMDA receptor-induced toxicity in serum-free antioxidant-rich primary cultures of murine cerebellar granule cells. **Neurochem Int** 33(1): 23-28, 1998.

CARTA, A.R.; PISANU, A.; CARBONI, E. Do PPAR-Gamma Agonists Have a Future in Parkinson's Disease Therapy? **Parkinson's Disease** 2011: 1-14, 2011.

CHATTOPADHYAYA, B.; DI CRISTO, G.; HIGASHIYAMA, H.; KNOTT, G.W.; KUHLMAN, S.J.; WELKER, E.; HUANG, Z.J. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. **J. Neurosci.** 24: 9598-9611, 2004.

CHUANG, DM.; GAO, XM.; PAUL, S.M. N-Methyl-D-aspartate Exposure Blocks Glutamate Toxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells. **Molecular Pharmacology** 42: 210-216, 1992.

COBB, S.R.; BUHL, E.H.; HALASY, K.; PAULSEN, O.; SOMOGYI, P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. **Nature** 378: 75-78, 1995.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução nº 714, de 26/08/2002.

COPE, M.B.; NAGY, T.R.; FERNANDEZ, J.R.; GEARY, N.; CASEY, D.E.; ALLISON, D.B. Antipsychotic drug-induced weight gain: development of an animal model. **International Journal of Obesity** 29: 607-614, 2005.

COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.

CONTESTABILE, A. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival *in vivo* and *in vitro*. **The Cerebellum** 1: 41-55, 2002.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G.; JOHNSON, R.W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Review Neuroscience** 9: 46-56, 2008.

DAVIS, K.L.; KAHN, R.S.; KO, G.; DAVIDSON, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. **Am. J. Psychiatry** 148: 1474-1486, 1991.

DIDIER, M.; HEAULME, M.; SOUBRI, P.; BOCKAERT, J.; PIN, J.P. Rapid, sensitive and simple method for quantification of both neurotoxic and neurotrophic effects of NMDA on cultured cerebellar granule cells. **J. Neurosci. Res.** 27: 25-35, 1990.

DWYER, D.S.; DONOHOE, D. Induction of hyperglycemia in mice with atypical antipsychotic drugs that inhibit glucose uptake. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 75: 255-260, 2003.

ENNACEUR, A., & DELACOUR, J. A. New one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research** 31:47-59, 1988.

FACCI, L.; SKAPER S.D. Culture of Rat Cerebellar Granule Neurons and Application to Identify Neuroprotective Agents. **Methods Mol Biol** 846: 23-37, 2012.

GALILI-MOSBERG, R.; GIL-AD, I.; WEIZMAN, A.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Haloperidol-induced neurotoxicity--possible implications for tardive dyskinesia. **J Neural Transm** 107(4): 479-90, 2000.

GALLO, V.; CIOTTI, M.T.; COLETTI, A.; ALOISI, F.; LEVI, G. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. **Proc Natl Acad Sci** 79: 7919–7923, 1982.

GARCÍA-BUENO, B.; PÉREZ-NIEVAS, B.G.; LEZA, J.C. Is there a role for the nuclear receptor PPARc in neuropsychiatric diseases? **International Journal of Neuropsychopharmacology** 13: 1411–1429, 2010.

GASPAR, P.A.; BUSTAMANTE, M.L.; SILVA, H.; ABOITIZ, F. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **Journal of Neurochemistry** 111:891–900, 2009.

GIL-AD, I.; SHTAIF, B.; SHILOH, R.; WEIZMAN, A. Evaluation of the Neurotoxic Activity of Typical and Atypical Neuroleptics: Relevance to Iatrogenic Extrapyrmidal Symptoms. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 21(6): 705-716, 2002.

GLANTZ, L.A.; GILMORE, J.H.; LIEBERMAN, J.A.; JARSKOG, L.F. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. **Schizophrenia Research** 81: 47– 63, 2006.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

HARVEY, R.; CHINTALA, S.K. Inhibition of Plasminogen Activators Attenuates the Death of Differentiated Retinal Ganglion Cells and Stabilizes Their Neurite Network In Vitro. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 48(4): 1884-1891, 2007.

HASHIMOTO, T.; NGUYEN, Q.L.; ROTARU, D.; KEENAN, T.; ARION, D.; BENEYTO, M.; GONZALEZ-BURGOS, G.; LEWIS, D.A. Protracted developmental trajectories of GABAa receptor a1 and a2 subunit expression in primate prefrontal cortex. **Biol. Psychiatry** 65: 1015-1023, 2009.

HENDERSON, D.C.; CAGLIERO, E.; GRAY, C.; NASRALLAH, R.A.; HAYDEN, D.L.; SCHOENFELD, D.A.; GOFF, D.C. Clozapine, diabetes mellitus, weight gain and lipid abnormalities: a five year naturalistic study. **American Journal of Psychiatry** 157: 975-981, 2000.

HOUSEKNECHT, K. L.; COLE, B. M.; STEELE, C. P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. **Domest. Anim. Endocrinol** 22(1): 1-23, 2002.

HOLOPAINEN, I.; KONTRO, P. Glutamate release from cerebellar granule cells differentiating in culture: modulation of the K<sup>+</sup>-stimulated release by inhibitory amino acids. **Neurochemistry International** 12(2): 155-161, 1988.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. **J. Neurosci** 27: 11496-11500, 2007.



HORROBIN, D.F. Peroxis Ome-Proliferator Activated Receptors (Ppar): Possible Involvement In Schizophrenia. International Congress on Schizophrenia Research, 2003.

JAVITT, D.C. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. **J. Clin. Psychiatry** 9: 12-35, 1987.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; LIPINA, T.; VUKOBRADOVIC, I.; RODER, J.; WOODGETT, J.R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **JoVE. (Journal of Visualized Experiments)** 48: 1-5, 2011.

KATO, T.; MONJI, A.; HASHIOKA, S.; KANBA, S. Risperidone significantly inhibits interferon-gamma-induced PPARc in neuropsychiatric diseases 1425 microglial activation in vitro. **Schizophrenia Research** 92: 108–115, 2007.

KLAWANS, H.L.; GOETZ, C.; WESTHEIMER, R. Pathophysiology of schizophrenia and the striatum. **Dis. Nerv. Syst.** 33: 711-719, 1972.

KOHARA, A.; TAKAHASHI, M.; YATSUGI, S.; TAMURA, S.; SHITAKA, Y.; HAYASHIBE, S.; KAWABATA, S.; OKADA, M. Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models. **Brain Research** 1191: 168 – 179, 2008.

KOLOMEETS, N.S.; ORLOVSKAYA, D.D.; RACHMANOVA, V.I.; URANOVA, N.A. Ultrastructural alterations in hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia: a postmortem morphometric study. **Synapse** 57(1): 47-55, 2005.

KONRADI, C.; HECKERS, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. **Pharmacology & Therapeutics** 97: 153– 179, 2003.

KOPRIVICA , V.; REGARDIE, K.; WOLFF, C.; FERNALLD, R.; MURPHY, J.J.; KAMBAYASHI, J.; KIKUCHI, T.; JORDAN, S. Aripiprazole protects cortical neurons from glutamate toxicity. **European Journal of Pharmacology** 651: 73–76, 2001.

KRÄMER, D.; MINICHELLO, L. Cell Culture of Primary Cerebellar Granule Cells. **Mouse Cell Culture, Methods in Molecular Biology** 633, DOI 10.1007/978-1-59745-019-5\_17, 2010.

LAW, A.J.; DEAKIN, J.F. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. **Neuroreport** 12(13): 2971-2974, 2001.

LAWRIE, S.M.; ABUKMEIL, S.S. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. **Br J Psychiatry** 172: 110-120, 1998.

LEWIS, D.A.; HASHIMOTO, T.; VOLK, D.W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. **Nat Rev Neurosci** 6(4): 312-324, 2005.

- LIEBERMAN, J.A.; BYMASTER, F.P.; MELTZER, H.Y.; DEUTCH, A.Y.; DUNCAN, G.E.; MARX, C.E.; APRILLE, J.R.; DWYER, D.S.; LI, X.M.; MAHADIK, S.P.; DUMAN, R.S.; PORTER, J.H.; MODICA-NAPOLITANO, J.S.; NEWTON, S.S.; CSERNANSKY, J.G. Antipsychotic drugs: comparison in animal models of efficacy, neurotransmitter regulation, and neuroprotection. **Pharmacol. Rev** 60: 358-403, 2008.
- LIM, D.K.; HO, I.K. Responses to N-methyl-D-aspartate and kainic acid in cerebellar granule cells of lead-exposed rat pups. **Neurotoxicology** 19(1): 49-55, 1998.
- LISMAN, J. E.; OTMAKHOVA, N. A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: Elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. **Hippocampus** 11:551–568, 2001.
- LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron** 46:703–713, 2005.
- LUPIEN, S.J.; MCEWEN, B.S.; GUNNAR, M.R.; HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience** 10: 434-445, 2009.
- MARTIN, H.L.; MOUNSEY, R.B.; MUSTAFA, S.; SATHE, K.; TEISMANN, P. Pharmacological manipulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) reveals a role for anti-oxidant protection in a model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology** 235: 528–538, 2012.
- MEYER-LINDENBERG, A. Neuroimaging and the question of neurodegeneration in schizophrenia. **Progress in Neurobiology** 95: 514–516, 2011.
- MILES, R.; TÓTH, K.; GULYÁS, A.I.; HÁJOS, N.; FREUND, T.F. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. **Neuron** 16: 815-823, 1996.
- MONJI, A.; KATO, T.; KANBA, S. Cytokines and schizophrenia : microglia hypothesis of schizophrenia. **Psychiatry and Clinical Neurosciences** 63: 257-265, 2009.
- MOVSESYAN, V.A.; FADEN, A.I. Neuroprotective Effects of Selective Group II mGluR Activation in Brain Trauma and Traumatic Neuronal Injury. **Journal of Neurotrauma** 23(2): 117-127, 2006.
- MUKHIN, A.G.; IVANOVA, S.A.; FADEN, A.I. mGluR modulation of post-traumatic neuronal death: role of NMDA receptors. **NeuroReport** 8: 2561–2566, 1997.
- MYSKIW, J.C.; ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory** 89:338–351, 2008.
- NAKAZAWA, K.; ZSIROS, V.; JIANG, K.; NAKAO, K.; KOLATA, S.; ZHANG, S.; BELFORTE, J.E. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. **Neuropharmacology** 62: 1574-1583, 2012.

OHNO, Y.; OKANO, M.; IMAKI, J.; TATARA, A.; OKUMURA, T.; SHIMIZU, S. Atypical antipsychotic properties of blonanserin, a novel dopamine D2 and 5-HT2A antagonist. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 96: 175–180, 2010.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science** 164: 719–721, 1969.

OLNEY, J.W.; FARBER, N.B. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry** 52: 998-1007, 1995.

PANTELIS, C.; VELAKOULIS, D.; MCGORRY, P.D.; WOOD, S.J.; SUCKLING, J.; PHILLIPS, L.J.; YUNG, A.R.; BULLMORE, E.T.; BREWER, W.; SOULSBY, B.; DESMOND, P.; MCGUIRE, P.K. Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison. **Lancet** 361: 281-288, 2003.

PARK, E.Y.; CHO, I.J.; KIM, S.G. Transactivation of the PPAR-responsive enhancer module in chemopreventive glutathione S-transferase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor heterodimer. **Cancer Research** 64: 3701-3713, 2004.

REYNOLDS, G.P.; BEASLEY, C.L. GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex development and deficits in schizophrenia. **J. Chem. Neuroanat.** 22: 95-100, 2001.

ROSA, A.O.; EGEE, J.; MARTÍNEZ, A.; GARCÍA, A.G.; LÓPEZ, M.G. Neuroprotective effect of the new thiadiazolidinone NP00111 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Implication of ERK1/2 and PPAR $\gamma$  receptors **Experimental Neurology** 212: 93–99, 2008.

SCHERK, H.; FALKAI, P. Effects of antipsychotics on brain structure. **Current Opinion in Psychiatry** 19:145–150, 2006.

SCHORI, H.; YOLE, E.; WHEELER, L.A.; RAVEH, T.; KIMCHI, A.; SCHWARTZ, M. Immune-related mechanisms participating in resistance and susceptibility to glutamate toxicity. **Eur J Neurosci** 16(4): 557-564, 2002.

SEMPLE, B.D.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L.J. Broad-spectrum neuroprotection against traumatic brain injury by agonism of peroxisome proliferator-activated receptors. **Experimental Neurology** 229: 195–197, 2011.

SNYDER S.H. Catecholamines in the brain as mediators of amphetamine psychosis. **Arch. Gen. Psychiatry** 27: 169-179, 1972.

STAHL, S.M. Beyond the dopamine hypothesis to the NMDA glutamate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. **CNS Spectrums** 12: 265-268, 2007.

SUNG, B.; PARK, S.; YU, B.P.; CHUNG, H.Y. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 59(10): 997-1006, 2004.

SWANSON, C.R.; JOERS, V.; BONDARENKO, V.; BRUNNER, K.; SIMMONS, H.A.; ZIEGLER, T.E.; KEMNITZ, J.W.; JOHNSON, J.A.; EMBORG, M.E. The PPAR-g agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. **Journal of Neuroinflammation** 8: 91-105, 2011.

SZYDLOWSKA, K.; KAMINSKA, B.; BAUDE, A.; PARSONS, C.G.; DANYSZ, W. Neuroprotective activity of selective mGlu1 and mGlu5 antagonists *in vitro* and *in vivo* **European Journal of Pharmacology** 554: 18–29, 2007.

TAMMINGA, C.A. Schizophrenia and glutamatergic transmission. **Crit Rev Neurobiol** 12: 21-36, 1998.

TSCHÖPE, D.; BRAMLAGE, P.; BINZ, C.; KREKLER, M.; PLATE, T.; DEEG, E.; GITT, A.K. Antidiabetic pharmacotherapy and anamnestic hypoglycemia in a large cohort of type 2 diabetic patients - an analysis of the DiaRegis registry. **Cardiovascular Diabetology** 10: 66-73, 2011.

UKAI, W.; OZAWA, H.; TATENO, M.; HASHIMOTO, E.; SAITO, T. Neurotoxic potential of haloperidol in comparison with risperidone: implication of Akt-mediated signal changes by haloperidol. **Journal of Neural Transmission** 111: 667–681, 2004.

URYU, S.; HARADA, J.; HISAMOTO, M.; ODA, T. Troglitazone inhibits both post-glutamate neurotoxicity and low-potassium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons. **Brain Research** 924: 229–236, 2002.

USER'S MANUAL. SigmaStat<sup>®</sup> 2.0 for Windows<sup>®</sup>. United States of America: ImageStream<sup>®</sup> Graphics & Presentation Filters, 1997.

VAN HAREN, N.E.; HULSHOFF POL, H.E.; SCHNACK, H.G.; CAHN, W.; BRANS, R.; CARATI, I.; RAIS, M.; KAHN, R.S. Progressive brain volume loss in schizophrenia over the course of the illness: evidence of maturational abnormalities in early adulthood. **Biol Psychiatry** 63(1): 106-113, 2007.

VAUDRY, D.; GONZALEZ, B.J.; BASILLE, M.; FOURNIER, A.; VAUDRY, H. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 9415–9420, 1999.

WANG, H.; XU, H.; DYCK, L.E.; LI, X.M. Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from beta-amyloid peptide(25–35)-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis. **J. Neurosci. Res** 81: 572-580, 2005.

#### ***CAPÍTULO IV***

*PT-31, a new  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice*

---



**PT-31, a new  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, is effective in schizophrenia cognitive symptoms in mice**

Andresa Heemann Betti<sup>a</sup>, Camila Boque Antonio<sup>a</sup>, Vivian Herzfeldt<sup>a</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima<sup>b</sup>, Marina Galdino da Rocha Pitta<sup>b</sup>, Ivan da Rocha Pitta<sup>b</sup>, Jean-Luc do Rego<sup>c</sup>, Jean-Claude do Rego<sup>c,d</sup>, David Vaudry<sup>c</sup>, Stela Maris Kuze Rates<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

*<sup>b</sup>Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil*

*<sup>c</sup>Equipe Facteurs Neurotrophiques et Différenciation Neuronale, INSERM U982 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 982), Université de Rouen, France*

*<sup>d</sup>Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB), Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Rouen, France*

\*Corresponding author:

Stela Maris Kuze Rates Ph.D.

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752 – Lab 505C, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS - Brazil

E-mail: stela.rates@ufrgs.br

Phone: 55-51-33085455; FAX: 55-51-33085437

## ABSTRACT

Neurochemical bases of schizophrenia are still not fully understood. Although disturbances on dopaminergic and serotonergic neurotransmission are currently considered as pivotal in schizophrenia etiology, several studies provided evidences of changes in the central noradrenergic activity in schizophrenic patients. Norepinephrine (NE) is one of the key neurotransmitters involved in cognition, particularly in cognitive functions mediated by the prefrontal cortex (PFC). The NE operates in different families of the adrenergic receptors, but the  $\alpha_2$ -adrenoceptor demonstrated beneficial effects on memory and neuroprotection. In this study we evaluated a new imidazolidine derivative, 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione PT-31, an  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor agonist, in mice models predictive of efficacy in the treatment of schizophrenia positive symptoms (apomorphine-induced climbing and ketamine-induced hyperlocomotion) and on models related to cognitive symptoms (prepulse inhibition and novel object recognition task); it was also evaluated *in vitro* in cerebellum primary cell culture of rats, in the presence and absence of glutamate (100  $\mu$ M), searching for a possible neuroprotective effect. PT-31 prevented the apomorphine-induced climbing (0.3, 1, 3 and 10 mg/kg) and the ketamine-induced hyperlocomotion (0.3 and 1 mg/kg), without inducing catalepsy neither motor impairment. PT-31 (1 and 3 mg/kg) protected the PPI impairment induced by apomorphine, ( $\pm$ )-DOI and ketamine. PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg) did not affect mice short nor long-term memory *per se*, but it (30 mg/kg) protected against the ketamine-induced memory impairment when administered at different stages of memory process in the novel object recognition task: acquisition, consolidation and retrieval. In addition, PT-31 was tested on cerebellum granule cells ( $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M) and it was not toxic *per se*, but it had a neuroprotective effect ( $10^{-12}$ M, 48 hours of incubation). In conclusion, the present study characterizes PT-31 as a promising antipsychotic compound, since it presents a pre-clinical pharmacology predictive of efficacy in relieving schizophrenia positive and cognitive symptoms, as well as neuroprotective properties.

**Keywords:** novel object recognition task, prepulse inhibition, cerebellum granule cells,  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor, imidazolidine derivative.



## 1. INTRODUCTION

Although the neurochemical bases of schizophrenia are not fully understood, the dominant hypothesis has focused on the dopamine metabolism disturbance in the brain. In the last decades, other neurotransmitters such as serotonin, glutamate, GABA, among others, have also been considered. Norepinephrine (NE) has received little attention, but since the early 70's the involvement of this catecholamine has been also proposed (Stein and Wise, 1971; Hartmann, 1976). NE is one of the key neurotransmitters involved in cognition, particularly in cognitive functions mediated by the prefrontal cortex (PFC) (Arnsten and Li, 2005; Ramos and Arnsten, 2007). Studies on the involvement of the noradrenergic system in schizophrenia demonstrated that clonidine, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor partial agonist, improved cognition, as well as the positive and negative symptoms (Freedman et al., 1982; Fields et al., 1988; Maas et al., 1995). On the other hand, increased levels of NE activity in the PFC  $\alpha_1$ -adrenoceptors can impair cognitive function (Arnsten et al., 1999).

The NE operates in five different families of the adrenergic receptors:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  (IUPHAR, Goldman-Rakic et al., 1990), but with higher affinity for the  $\alpha_2$  receptors (Mac Donald et al., 1997, Ramos and Arnsten, 2007). The  $\alpha_2$ -adrenoceptor participates in the regulation of a wide range of physiological functions by modulating the release of hormones such as insulin and adrenaline (Peterhoff et al., 2003; Moura et al., 2006), and neurotransmitters such as serotonin and glutamate (Scheibner et al., 2001; Pan et al., 2002; Dong et al., 2008). The beneficial actions of NE in the PFC result from the stimulation of the  $\alpha_2$ -adrenoceptors, where a high density of these receptors has been observed (Goldman-Rakic et al., 1990).

Different response profiles are produced by  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists which can be attributed to the three subtypes of  $\alpha_2$  receptors, cloned in humans:  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$  (Kobilka et al., 1987; Regan et al., 1988; Lomasney et al., 1990). Immunocytochemical studies in monkeys' brain have shown that  $\alpha_{2A}$  subtype is largely expressed in the PFC, being the subtype predominant in this region (Aoki et al., 1994). It has been shown that the ability of guanfacine (an anti-hypertensive drug) to improve cognitive function in the PFC is due to its selectivity to the  $\alpha_{2A}$  site (Uhlen et al., 1995). In addition, studies with

knockout mice have emphasized the importance of the  $\alpha_{2A}$  receptor subtype, since animals with mutations in this subtype lost the beneficial effect on working memory after guanfacine treatment (Franowicz et al., 1998). The  $\alpha_2$  receptor is also responsible for mediating a variety of others pharmacological effects, such as analgesic, anticonvulsant, anesthetic and neuroprotective (Dong et al., 2008).

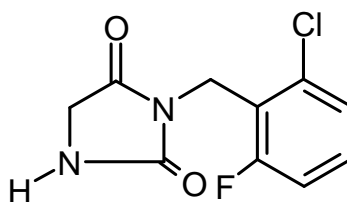
Studies have shown that neurons dissociated from  $\alpha_2$ -adrenoceptors agonists modulate glutamate and NMDA receptor responses, reducing the damage caused by glutamate on cultured retinal neurons (Baptiste et al., 2002). These results suggest the possibility of a direct modulation of the  $\alpha_2$ -adrenoceptor on the activity of the NMDA receptor, as a mechanism of neuroprotection. Dong and coworkers (2008) reported that in experimental models of glaucoma and retinal excitotoxicity, the modulation of NMDA receptor function by  $\alpha_2$  seems to be the main mechanism mediating the neuroprotective effect of exogenous  $\alpha_2$  agonists. Ma and coworkers (2004) in turn, showed that the neuroprotective effect of dexmedetomidine, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, in mixed cultures of cortical neurons and glial cells of mice was completely reversed by an  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor antagonist.

In this work, we performed the pre-clinical investigation of the antipsychotic and neuroprotective properties of a new  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor agonist, the 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione named PT-31 (Sudo et al., 2010). PT-31 was evaluated in animal models of positive and cognitive symptoms of schizophrenia and in cerebellum granule cells exposed or not to glutamate neurotoxic concentration.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemistry**

The preparation of the 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione PT-31 compound was performed by the Nucleus in Therapy Innovation (NUPIT), from the Federal University of Pernambuco, Brazil (UFPE), as described by Sudo and coworkers (2010).



**Figure 1.** Molecular structure of PT-31 (3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione).

## 2.2 Behavioral Experiments

### 2.2.1 Animals

Adult male CF1 mice (25 – 35 g) from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS) breeding colony and Wistar rats (7 to 9 days), from INSERM U982 (Université de Rouen, France) were used. Mice were housed in plastic cages in groups of five mice (17 x 28 x 13 cm) with free access to food (Nuvital®) and water. Animals were kept at constant room temperature ( $22 \pm 2$  °C), 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. Mice were only tested once. All experiments were performed by human observers blind to treatment and according to a randomized protocol.

### 2.2.2 Ethics

The study was approved by the Local Ethical Committee (CEP), which is linked to the National Commission of Research Ethics (CONEP) (Protocols 2007975 and 17613), 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) and with the European Communities Council Directive of November 24<sup>th</sup>, 1986 (86/609/EEC).

Immediately after the experiments, mice were euthanized by cervical dislocation, while the rats were sacrificed by decapitation to remove the cerebral structure of interest.

### 2.2.3 Drugs and treatments

Apomorphine hydrochloride hemihydrate (SIGMA, Brazil), ketamine (CRISTÁLIA, Brazil), (±)-DOI hydrochloride (SIGMA, Brazil), clozapine (NOVARTIS, Brazil), haloperidol (GALENA, Brazil), sodium pentobarbital (CRISTÁLIA, Brazil), L-glutamic acid (SIGMA, France), MPEP hydrochloride (TOCRIS, France), EGLU (TOCRIS, France) and (+)-MK-801 hydrogen maleate (SIGMA, France) were used as reference drugs. PT-31 was synthesized and characterized by hydrogen nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR).

PT-31 and haloperidol were suspended in saline with addition of 1% (v/v) of polissorbate 80 (Tween®). Sodium pentobarbital was directly dissolved in saline. Apomorphine was dissolved in saline with addition of 0.1% ascorbic acid and clozapine was dissolved in saline with addition of 0.1% acetic acid 0.1 M. Vehicle groups received saline with 1% (v/v) polissorbate 80. In the *in vivo* studies, the drugs were administered by intraperitoneal and oral (gavage) routes (10 mL/kg body weight) or subcutaneously (5 mL/kg body weight).

### 2.2.4 Apomorphine-induced climbing

Mice were treated with PT-31 (0.3; 1; 3; 10 and 30 mg/kg p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg p.o.), clozapine (5 mg/kg p.o.) 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 immediately treated with apomorphine 4 mg/kg or vehicle s.c. (second treatment). The climbing behavior score was evaluated as: normal behavior (0 point), increased activity and sniffing (1 point), occasional clinging to sides of cage with forepaws (2 points), intermittent clinging to sides or 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 period of observation in each interval was 1 min. The climbing index was calculated as the sum of all scores obtained by the same animal at each time interval.

### 2.2.5 Ketamine-induced hyperlocomotion

Mice were treated with vehicle, haloperidol (0.01 mg/kg, p.o.), clozapine (1 mg/kg, p.o.) or PT-31 (0.3; 1; 3; 10 and 30 mg/kg p.o.) and allowed to freely explore during 30 minutes the locomotor cage, an area made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 x 30 x 45 cm) divided into 24 squares of equal area. Then ketamine was subcutaneously injected at 10 mg/kg. Immediately after ketamine injection, locomotor activity was recorded for 20 minutes.

### 2.2.5 Prepulse inhibition of startle reflex (PPI)

The PPI test was performed in a startle chamber (Insight®, Brazil), in which a loudspeaker produced a continuous background noise of 65 dB of sound as well as the acoustic startle pulses. A white noise pulse was used as the startle stimulus, which had an intensity of 115 dB and duration of 50 ms; three different noise intensities (80, 85 and 90 dB, duration 20 ms) were used as prepulses. An acclimatization time of 5 min, during which the mice received no stimulus except the background noise, was followed by 5 initial startle stimuli. After this habituation program, the test program was started with five different trial types presented in a random order: (1) pulse alone, (2) control (no stimulus), (3) pulse with preceding prepulse of 80 dB, (4) pulse with preceding prepulse of 85 dB and (5) pulse with preceding prepulse of 90 dB. A total of 10 presentations of each trial type were given with an inter-stimulus interval randomized between 10 s and 30 s. Percent PPI of the startle response was calculated as follows:  $100 - [(response\ to\ acoustic\ prepulse\ plus\ startle\ stimulus\ trials / startle\ response\ alone\ trials) \times 100]$ . Mice were treated with vehicle, PT-31 (1, 3, 10 and 30 mg/kg p.o.), clozapine (15 mg/kg, p.o.) or haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) and 30 min later they were injected s.c. with either saline or the PPI disrupting drugs: apomorphine (3 mg/kg), a dopaminergic agonist; ketamine (30 mg/kg), a NMDAR antagonist, or ( $\pm$ )2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-DOI (0.5 mg/kg), a 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist. The animals treated with apomorphine or ketamine were immediately placed in the startle chambers and the PPI measurement was started. The animals who received ( $\pm$ )-DOI were placed in the startle chambers 15 min after treating and the PPI measurement was started.

## **2.2.6 Novel object recognition task**

The animal model used in this study was adapted from Moura and coworkers (2006) and is based on the fact that rodents preferentially explore unfamiliar (novel) objects (Ennaceur and Delacour, 1988; Myskiw et al. 2008). The test was performed in an acrylic box with three closed walls and one transparent wall (45 x 30 x 30 cm). Before starting the experiment (day 1), animals were gently handled once a day for five days.

### *2.2.6.1 Effect on short-term memory*

On day 1 (habituation) the animals were placed in the box for 10 minutes and allowed to freely explore the environment. On day 2, the animals were treated by gavage with vehicle, PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg), clozapine (1 mg/kg), haloperidol (0.01 mg/kg) or intraperitoneally with ketamine (10 mg/kg) one hour before the training session. In the training session, the animals were placed in the box for 10 minutes in the presence of two identical objects (A, A); those animals that did not explore one of the objects were excluded from the experiment. Ninety minutes later the animals were placed once again in the box containing the familiar object (A) and the unfamiliar (B) object. The time exploring each object was measured during 10 minutes. All objects had the same color, texture and size, but different shapes.

### *2.2.6.2 Effect on long-term memory*

Habituation, training session and treatments were carried out as described above by using another group of animals. Twenty four hours after the training session, the animals were placed again in the box in the presence of a familiar object (A) and a new object (C). The time exploring each object was recorded for 10 minutes.

### *2.2.6.3 Effect on long term memory impairment induced by ketamine*

On day 1 the animals were placed in the box for 10 minutes and allowed to freely explore the environment. On day 2, mice were treated intraperitoneally with vehicle or

ketamine (10 mg/kg) one hour before the training session. In the training session, they were placed in the box during 10 minutes in the presence of two identical objects (A, A). Twenty four hours later, the animals were placed again in the box containing the familiar object (A) and a different object (C).

PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg), clozapine (1 mg/kg) and haloperidol (0.01 mg/kg) were administered by gavage at three different moments, as follows:

Experiment 1: the drugs were administered one hour before training (at the same moment of ketamine or vehicle administration).

Experiment 2: the drugs were administered right after training.

Experiment 3: the drugs were administered one hour before long-term memory testing.

In all experiments, the object exploration index was calculated by the following formula: Exploration index = time observing each object (A, B or C)/ time observing both objects.

### **2.2.7 Models of potential antipsychotic adverse effect**

The potential of PT-31 to induce three classical antipsychotic adverse effects was evaluated: catalepsy, motor coordination impairment and sedation/hypnosis.

#### *2.2.7.1 Spontaneous locomotor activity*

Locomotor activity was monitored in an arena made of acrylic divided into squares of equal area. Mice were treated with PT-31 (0.3; 1; 3; 10 and 30 mg/kg p.o.) or vehicle and sixty minutes later positioned at the apparatus center. After a five-minutes habituation period, mice were observed during 60 minutes. The following parameters were recorded by the software Noldus®: number of crossings, rearings and total distance. All procedure was performed in twilight environment.

### 2.2.7.2 *Catalepsy test*

Mice were treated with vehicle, PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) or clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.). After 30, 60 and 90 minutes, 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 30 seconds) was recorded.

### 2.2.7.3 *Rota-rod test*

Rodent motor impairment was evaluated through rota-rod test. The apparatus consisted of a cylinder of 3 cm of diameter rotating at 5 rpm. One day before the test the mice were trained during five minutes. On the test day the mice that were able to stay at least 90 seconds balanced on the rotating rod were selected for testing. Animals' performance was measured by human observers before and 60 minutes after drug administration. Mice were treated with vehicle, PT-31 (10 and 30 mg/kg p.o.), haloperidol (0.5 mg/kg, p.o.) or clozapine (5 and 15 mg/kg, p.o.). The integrity of motor coordination was assessed on the basis of the longest time of permanence and the number of falls in a 5 minutes period.

## 2.3 *In vitro* assays

The *in vitro* assays were performed in the Equipe Facteurs Neurotrophiques et Différenciation Neuronale, INSERM U982 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 982), Université de Rouen, France.

### 2.3.1 *Culture of rat cerebellar granule cells*

Cerebellar granule cells were prepared from 7 to 9 days rats, as previously described (Gallo et al., 1982; Krämer and Minichiello, 2010; Facci and Skaper, 2012). Briefly, cells were dissociated from the cerebellum by mechanical chopping and treatment with trypsin and DNase and were then plated in poly-D-lysine precoated 24-well plates, at a density of  $1.2 \times 10^6$  cells/mL. Dissociated cells were cultured in basal



medium (DMEN, HAM F12, antibiotic, Gibco®) containing 10% fetal bovine serum (Lonza®) and 25 mM KCl. Cytosine arabinoside (10  $\mu$ M) was added 24 hours later, to arrest the growth of non-neuronal cells. It has been well established that these cultures consist of more than 90% neurons after 8 days of culture. The cultures were maintained in an incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3.2 *The neuroprotective effect of PT-31 in a model of excitotoxicity in cerebellar granule cells*

For routine neurotoxicity assay, glutamate (100  $\mu$ M) was added directly to the culture medium when cells were 5 days, and cell loss was assessed 24, 48 and 72 hours later by fluorescein production from fluorescein diacetate (FlexStation3) (Didier et al., 1990), and confirmed visually by the calcein technique (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity, Molecular Probes) followed by fluorescence microscopy (MetaMorph, Leica) (Harvey and Chintala, 2007). For characterization of the neuroprotective effect of PT-31, different concentrations (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-13</sup>M) were added 120 min before glutamate exposure and were coincubated with glutamate in the culture medium during the course of the experiment. PT-31 was also incubated alone. The PT-31 dilutions were prepared in culture medium from a stock solution (10 mM, 100% DMSO). The DMSO maximum final concentration in the culture was 0.01%. Each treatment was performed in quadruplicate and repeated 3 to 5 times in independent cultures. The plates were treated by direct addition of the PT-31 dilution (20  $\mu$ L) to the medium culture plates.

## 2.4 Statistical Analysis

Catalepsy and rota-rod results were analyzed by two-way repeated-measures (RM) analysis of variance (ANOVA), with treatment as the first factor and time interval or session (second factor) as the repeated-measure. Apomorphine-induced climbing, ketamine-induced hyperlocomotion, prepulse inhibition and locomotor activity were submitted to a one-way ANOVA, as the *in vitro* assays. Novel object recognition was analyzed by Student's paired *t*-test. The analyses were performed using Sigma Stat 2.03

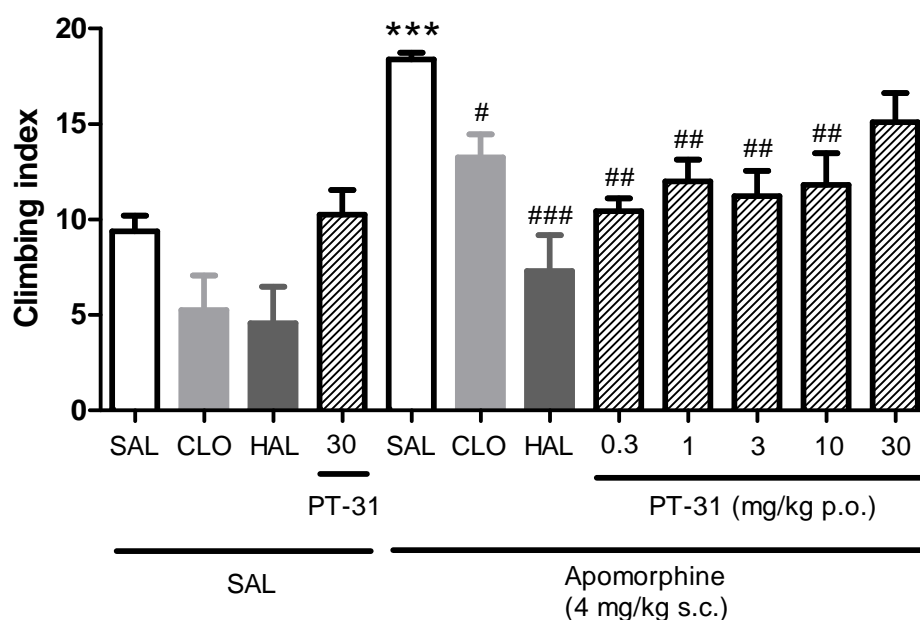
software (Jandel Scientific Corporation). Differences were considered statistically significant at  $P<0.05$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1 Behavioral experiments

##### 3.1.1 Apomorphine-induced climbing

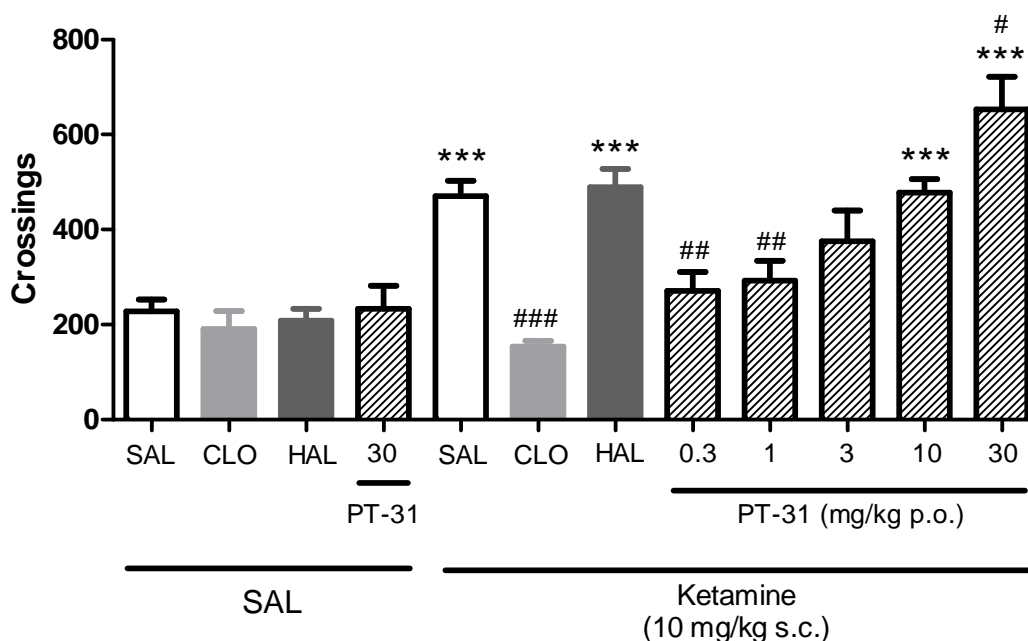
One-way ANOVA revealed a significant main effect of PT-31 [ $F(11,108)=8.050$ ,  $P<0.001$ ] in the apomorphine-induced climbing (Fig. 2). *Post hoc* Student Newman Keuls analysis indicated a significant decrease in the apomorphine-induced climbing by the administration of PT-31 at the doses of 0.3 ( $P=0.001$ ), 1 ( $P=0.004$ ), 3 ( $P=0.003$ ) and 10 mg/kg ( $P=0.005$ ), as the antipsychotics haloperidol 0.5 mg/kg ( $P<0.001$ ) and clozapine 5 mg/kg ( $P=0.026$ ) when compared with vehicle-apomorphine group. PT-31 did not prevent the climbing behavior effect at the highest tested dose (30 mg/kg) ( $P=0.076$ ).



**Fig. 2.** Effect of PT-31 (0.3; 1; 3; 10 and 30 mg/kg p.o.) in the apomorphine-induced climbing behavior. Clozapine (CLO 5 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M (n=8-10/group). ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL+SAL \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+Apomorphine # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ .

### 3.1.2 Ketamine-induced hyperlocomotion

Fig. 3 shows a significant main effect of PT-31 [One-Way ANOVA  $F(11,94)=13.455$ ,  $P<0.001$ ] in the ketamine-induced hyperlocomotion. *Post hoc* Student Newman Keuls indicated a significant decrease in the ketamine-induced hyperlocomotion by the administration of PT-31 at the lowest doses of 0.3 ( $P=0.006$ ) and 1 mg/kg ( $P<0.010$ ), as clozapine 1 mg/kg ( $P<0.001$ ), when compared with vehicle-ketamine group, but not haloperidol 0.01 mg/kg ( $P=0.943$ ). Doses of clozapine (1 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.01 mg/kg) were chosen on the basis of absence of effect on animals' spontaneous locomotion and the results obtained are in accordance with literature data (Satow et al., 2009).



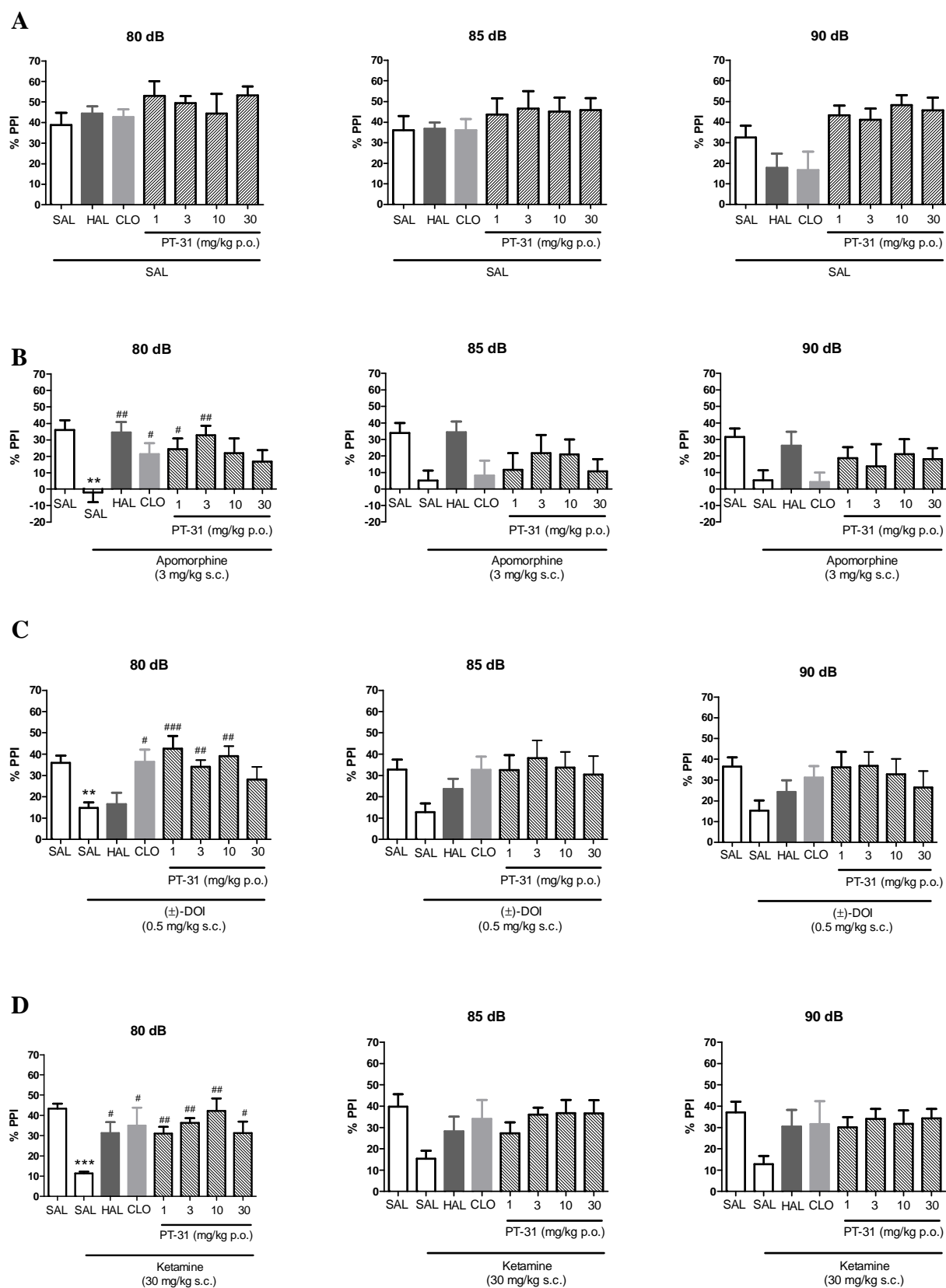
**Fig. 3.** Effect of PT-31 (0.3; 1; 3; 10 and 30 mg/kg p.o.) on ketamine-induced hyperlocomotion. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M (n=7-8/group). ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Parameter observed: number of crossings. Different from SAL+SAL \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+ Ketamine # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ .

### 3.1.3 Prepulse inhibition

PT-31 (1, 3, 10 and 30 mg/kg, p.o.), neither the antipsychotics tested altered the normal prepulse inhibition (PPI) response of animals [One-Way ANOVA: 80 dB

F(6,51)=0.926,  $P=0.485$ , 85 dB F(6,51)=0.508,  $P=0.799$ , 90 dB F(6,51)=4.162,  $P<0.002$ ] (Fig. 4A). Apomorphine (3 mg/kg s.c.), ( $\pm$ )-DOI (0.5 mg/kg s.c.) and ketamine (30 mg/kg s.c.) induced prepulse inhibition impairment as expected: apomorphine (3 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB F(7,70)=3.821,  $P<0.002$ , 85 dB F(7,70)=2.067,  $P=0.060$ , 90 dB F(7,70)=1.505,  $P=0.182$ ] (Fig. 4B), ( $\pm$ )-DOI (0.5 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB F(7,64)=5.674,  $P<0.001$ , 85 dB F(7,64)=1.903,  $P=0.086$ , 90 dB F(7,64)=1.721  $P=0.122$ ] (Fig. 4C), and ketamine (30 mg/kg s.c.) [One-Way ANOVA: 80 dB F(7,64)=3.891,  $P<0.002$ , 85 dB F(7,64)=1.765,  $P=0.112$ , 90 dB F(7,64)=1.370,  $P=0.236$ ] (Fig. 4D).

*Post hoc* Student Newman Keuls revealed that the lowest doses of PT-31, 1 ( $P<0.036$ ) and 3 mg/kg ( $P=0.005$ ) prevented the deficit induced by apomorphine only when the prepulse intensity was 80 dB. The same profile of action was observed for clozapine ( $P=0.038$ ) and haloperidol ( $P<0.002$ ) (Fig. 4B). In the serotonergic model, PT-31 1 ( $P<0.001$ ), 3 ( $P<0.010$ ) and 10 mg/kg ( $P<0.002$ ) were effective in preventing the PPI disruption at 80 dB, as clozapine ( $P=0.018$ ). Haloperidol did not prevent the prepulse inhibition deficit in neither of the prepulses intensities. PT-31 in all tested doses: 1 ( $P<0.008$ ), 3 ( $P<0.008$ ), 10 ( $P<0.001$ ) and 30 mg/kg ( $P<0.019$ ) also prevented the ketamine induced impairment of prepulse inhibition at 80 dB, as well as clozapine ( $P=0.013$ ) and haloperidol ( $P=0.033$ ).

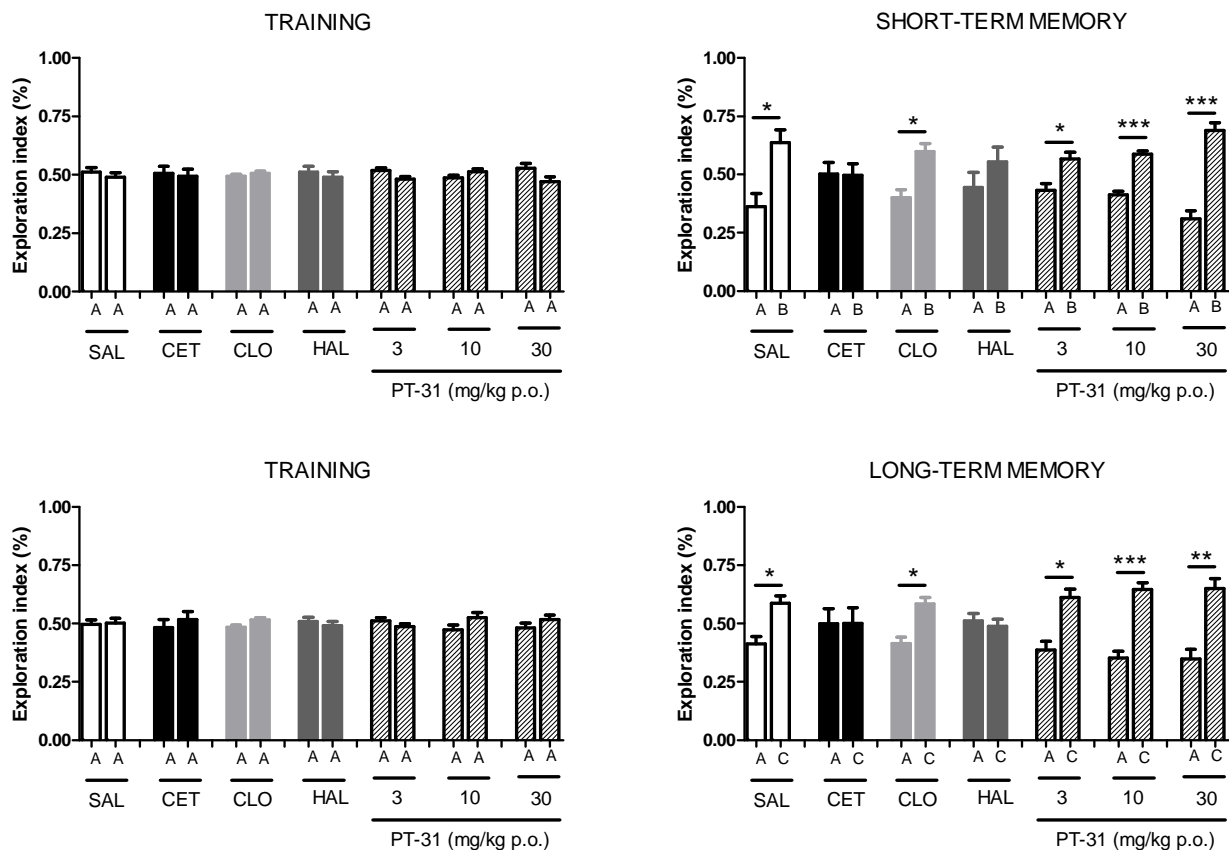


**Fig. 4.** Effect of PT-31 (1, 3, 10 and 30 mg/kg p.o.) *per se* on prepulse inhibition (PPI) (n=6-9/group) (A) and effect of PT-31 with apomorphine (n=8-10/group) (B), (±)-DOI (n=6-8/group) (C) and ketamine (n=8-9/group) (D). Clozapine (CLO 15 mg/kg p.o.) and

haloperidol (HAL 0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Parameter observed: %PPI. Different from SAL+SAL \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ ; different from SAL+Apomorphine, SAL+(±)-DOI or SAL+Ketamine # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ .

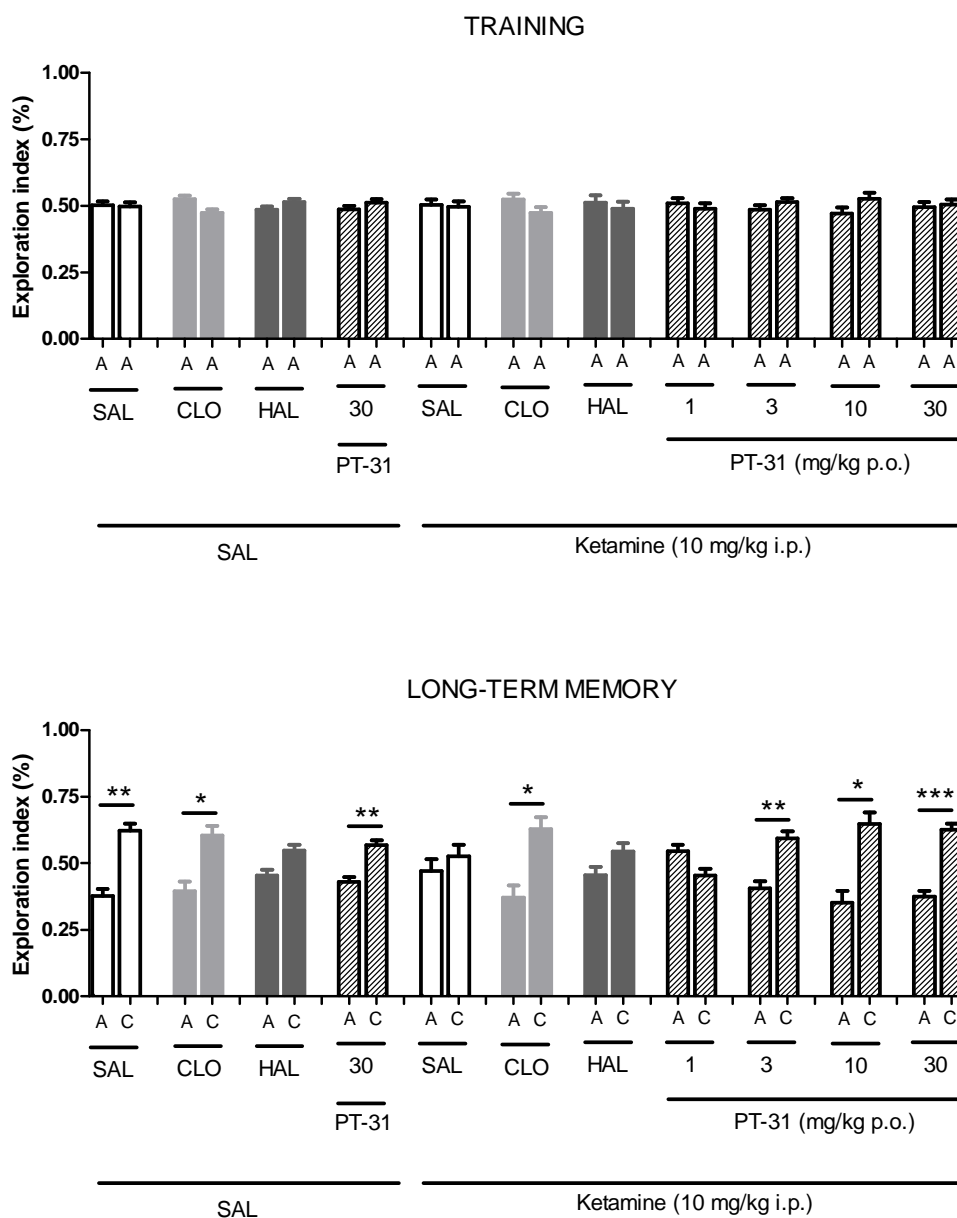
### 3.1.4 Novel object recognition

Student's paired *t*-test revealed that PT-31 did not impair short-term memory (STM) nor long-term memory (LTM) *per se*, at all tested doses: 3 (STM  $P=0.039$ , LTM  $P=0.012$ ), 10 (STM  $P<0.001$ , LTM  $P<0.001$ ) and 30 mg/kg (STM  $P<0.001$ , LTM  $P<0.008$ ), as clozapine (1 mg/kg) (STM  $P=0.018$ , LTM  $P=0.016$ ). Unlike, haloperidol (0.01 mg/kg) (STM  $P=0.424$ , LTM  $P=0.702$ ) and the NMDAR antagonist, ketamine (10 mg/kg) (STM  $P=0.948$ , LTM  $P=0.984$ ), impaired both types of memory (Fig. 5).



**Fig. 5.** Effect of PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg p.o.) *per se* on short and long-term memory at the novel object recognition task. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A, B and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M (n=6-10/group). Paired *t*-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ .

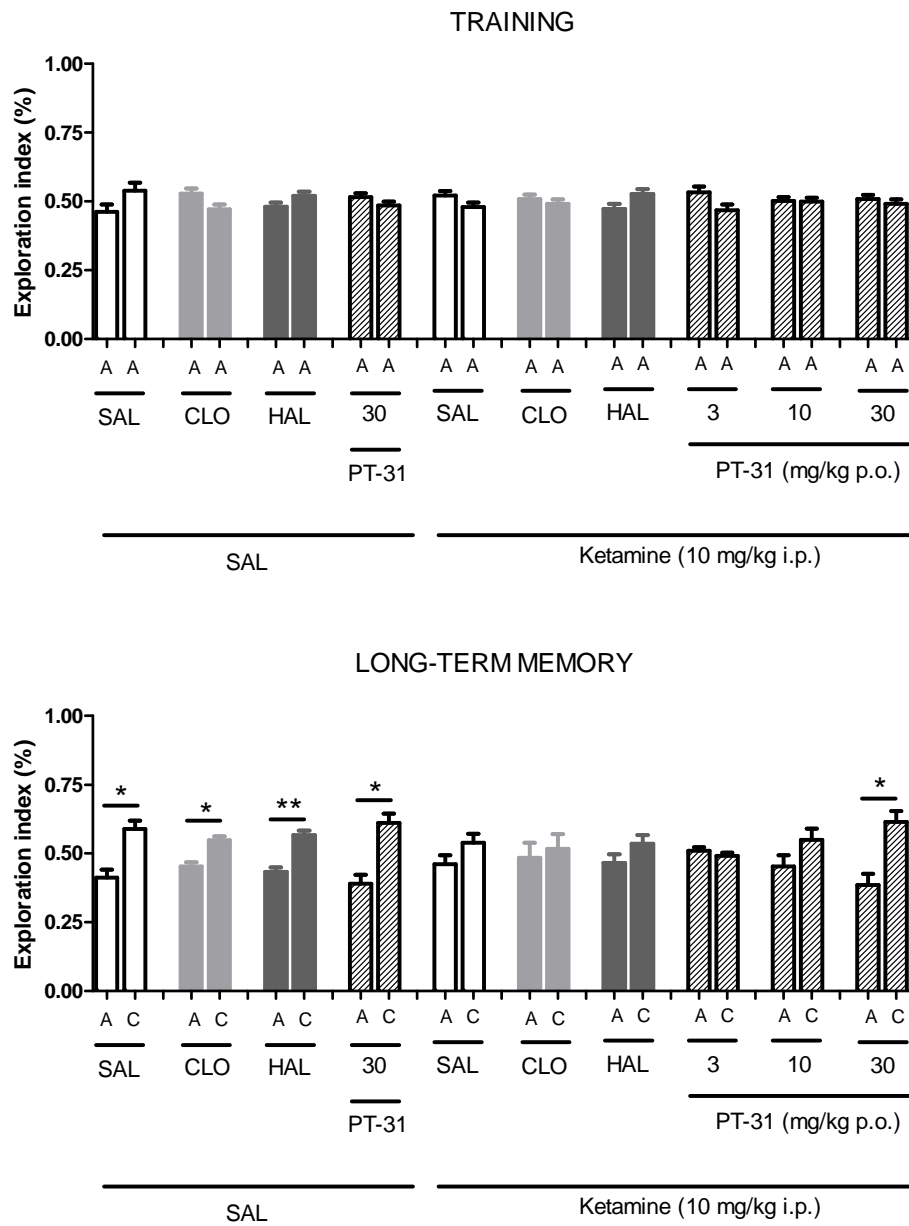
Further we investigated the ability of PT-31 to prevent or reverse memory impairment induced by ketamine, by administering it at different moments of the memory formation process. When administered with ketamine before training (encoding and consolidation), PT-31 3 ( $P<0.009$ ), 10 ( $P<0.012$ ) and 30 mg/kg ( $P=0.001$ ), as clozapine ( $P=0.024$ ), were able to prevent the memory impairment induced by ketamine, but not PT-31 1 mg/kg ( $P=0.108$ ) neither haloperidol ( $P=0.210$ ) (Fig.6).



**Fig. 6.** Effect of PT-31 (1, 3, 10 and 30 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). PT-31 was treated one hour before the training session. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M

(n=8-9/group). Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .

When administered right after training (consolidation), PT-31 demonstrated a dose-response effect: the highest tested dose 30 mg/kg ( $P < 0.020$ ), but not 10 mg/kg ( $P = 0.270$ ) and 3 ( $P = 0.451$ ) reversed the ketamine-memory impairment. Clozapine ( $P = 0.774$ ) also protected memory, but not haloperidol ( $P = 0.317$ ) (Fig.7).

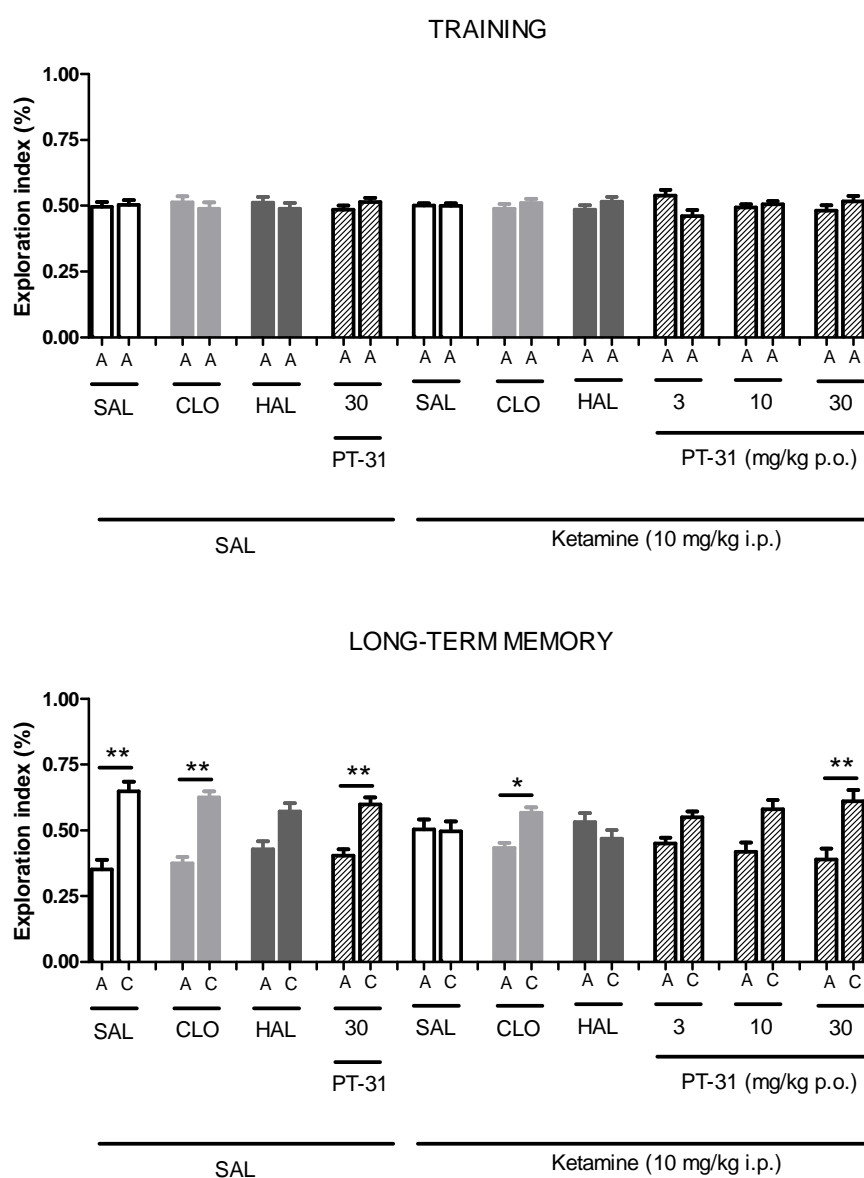


**Fig. 7.** Effect of PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). PT-31 was administered after the training session.



Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean+S.E.M (n=7-10/group). Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ .

Finally, when treated one hour before the long-term memory test (retrieval), PT-31 demonstrated the same profile: reversing the ketamine-induced memory deficit at the highest dose 30 mg/kg ( $P=0.035$ ), but not at 10 ( $P=0.053$ ) and 3 mg/kg ( $P=0.053$ ). Clozapine ( $P=0.012$ ) also protected memory, but not haloperidol ( $P=0.387$ ) (Fig.8).



**Fig. 8.** Effect of PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg p.o.) on long-term memory impairment induced by ketamine (10 mg/kg, i.p.). PT-31 was treated one hour before the long-term

memory session. Clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. A and C are different objects. Data are expressed as mean±S.E.M (n=7-9/group). Paired t-test. Parameter observed: exploration index. Different from object A in the same group \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ .

As a control, Table 1 shows that there was no alteration in the objects total exploration time of all groups of treatment when compared to the control group (vehicle+vehicle) [One-Way ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Acquisition: Training  $F(10,86)=3.346$ ,  $P<0.001$ ; LTM  $F(10,86)=2.852$ ,  $P<0.005$ ; Consolidation: Training  $F(9,82)=0.970$ ,  $P=0.472$ ; LTM  $F(9,82)=1.212$ ,  $P=0.301$ ; Retrieval: Training  $F(9,78)=3.247$ ,  $P<0.002$ ; LTM  $F(9,78)=1.943$ ,  $P=0.060$ ].

**Table 1.** Objects total exploration time (seconds) of PT-31 (1, 3, 10 and 30 mg/kg, p.o.), clozapine (CLO 1 mg/kg p.o.) and haloperidol (HAL 0.01 mg/kg p.o.) on the different protocols of the novel object recognition test.

Treatment	Acquisition		Consolidation		Retrieval	
	Training	LTM	Training	LTM	Training	LTM
SAL+SAL	172.6 ± 37.5	154.3 ± 42.4	137.6 ± 49.2	119.9 ± 38.0	182.1 ± 34.1	165.0 ± 84.3
KET+SAL	165.1 ± 31.5	163.6 ± 38.1	157.5 ± 43.8	142.2 ± 55.6	165.1 ± 29.5	139.4 ± 25.0
SAL+HAL	165.9 ± 28.5	133.6 ± 48.0	162.6 ± 48.3	99.3 ± 34.5	134.9 ± 46.6	123.9 ± 34.7
KET+HAL	178.4 ± 33.4	160.6 ± 62.8	133.5 ± 35.3	92.3 ± 38.5	201.8 ± 28.6	188.3 ± 54.7
SAL+CLO	171.7 ± 44.8	103.3 ± 44.1	157.6 ± 35.0	121.4 ± 27.5	154.4 ± 19.1	125.8 ± 17.3
KET+CLO	141.9 ± 41.7	135.0 ± 30.3	162.7 ± 31.5	123.4 ± 42.3	202.0 ± 40.0	98.6 ± 70.2
SAL+PT-31(30)	151.9 ± 34.9	99.1 ± 31.1	140.6 ± 41.4	118.0 ± 31.2	169.8 ± 23.0	138.1 ± 26.2
KET+PT-31(1)	116.8 ± 26.0	109.5 ± 29.0	NE	NE	NE	NE
KET+PT-31(3)	140.8 ± 34.3	123.1 ± 35.7	180.6 ± 21.9	120.9 ± 22.4	138.0 ± 32.7	126.9 ± 51.0
KET+PT-31(10)	117.1 ± 28.4	108.0 ± 22.7	164.8 ± 49.3	128.6 ± 52.5	158.4 ± 40.0	133.2 ± 40.0
KET+PT-31(30)	133.6 ± 22.8	119.5 ± 22.7	154.0 ± 42.6	141.2 ± 52.7	176.7 ± 55.1	131.3 ± 40.9

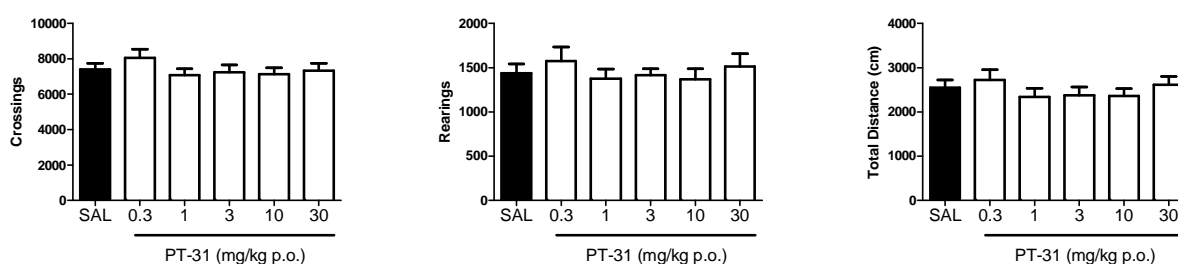
Data are expressed as mean±S.D. ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls.

LTM (long-term memory); NE (not evaluated).

### 3.1.5 PT-31 effects on models of potential antipsychotic adverse effect

#### 3.1.5.1 Spontaneous locomotor activity

As shown in Fig. 9, One-Way ANOVA demonstrated that PT-31 does not have an effect over mice locomotor activity [crossings  $F(5,59)=0.779$ ,  $P=0.570$ ], exploratory behavior (rearings [ $F(5,59)=0.458$ ,  $P=0.806$ ]) neither total distance [ $F(5,59)=0.715$ ,  $P=0.615$ ].



**Fig. 9.** Effect of PT-31 (0.3, 1, 3, 10 and 30 mg/kg, p.o.) on locomotor activity of mice. Parameters evaluated: number of crossings, rearings and total distance. Data are expressed as mean±S.E.M (n=10/group). ANOVA.

#### 3.1.5.2 Catalepsy test

Two-Way RM ANOVA showed a significant effect of treatment [ $F(6,179)=17.041$ ,  $P<0.001$ ], time [ $F(2,179)=0.749$ ,  $P=0.475$ ] and treatment x time interaction [ $F(12,179)=4.404$ ,  $P<0.001$ ]. *Post hoc* analyses indicated that, after 30 minutes, haloperidol 0.5 mg/kg ( $P=0.004$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P=0.005$ ) increased the time spent by mice at the imposed uncomfortable position. After 60 minutes, haloperidol 0.5 mg/kg ( $P<0.001$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P=0.007$ ) maintained the catalepsy effect, and after 90 minutes, just haloperidol did ( $P<0.001$ ). PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg) did not cause catalepsy in neither of the time evaluated (Table 2).

**Table 2.** Effect of PT-31 (3, 10 and 30 mg/kg p.o.) in catalepsy test at 30, 60 and 90 minutes after treatment. Clozapine and haloperidol were used as reference drugs.

Treatment	Dose	30 minutes (T30)	60 minutes (T60)	90 minutes (T90)
SAL	1 mL/100g	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	2.3 ± 1.7
Haloperidol	0.5 mg/kg	11.5 ± 11.5**	19.2 ± 13.9***	24.5 ± 9.9***
Clozapine	5 mg/kg	3.1 ± 3.9	1.5 ± 0.9	1.6 ± 1.5
Clozapine	15 mg/kg	11.4 ± 11.4**	11.1 ± 8.0**	3.8 ± 3.8
PT-31	3 mg/kg	1.3 ± 0.4	1.9 ± 0.9	1.6 ± 1.2
PT-31	10 mg/kg	1.8 ± 1.7	1.2 ± 1.0	0.7 ± 0.2
PT-31	30 mg/kg	2.4 ± 1.7	3.5 ± 2.8	4.1 ± 4.8

Data are expressed as mean+S.D (n=8-10/group). Two-way RM ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from SAL at the same time of measure \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.1.5.3 Rota rod test

Two-way RM ANOVA demonstrated that mice presented alterations in the permanence time (treatment factor  $F(5,111)=4.498$ ,  $P=0.002$ ; time factor  $F(1,111)=30.065$ ,  $P < 0.001$ ; treatment x time interaction  $F(5,111)=5.765$ ,  $P < 0.001$ ) and in the number of falls (treatment factor  $F(5,111)=8.765$ ,  $P < 0.001$ ; time factor  $F(1,111)=23.228$ ,  $P < 0.001$ ; treatment x time interaction  $F(5,111)=9.333$ ,  $P < 0.001$ ) when compared to their own performance before the treatment. As expected, *post hoc* analysis indicated that haloperidol 0.5 mg/kg ( $P < 0.001$ ) and clozapine 15 mg/kg ( $P < 0.001$ ) decreased the maximum permanence time on the apparatus and increased the number of falls (haloperidol  $P < 0.001$ , clozapine  $P < 0.001$ ). PT-31 (10 and 30 mg/kg) did not affect the maximum permanence time neither the number of falls (Table 3).

**Table 3.** Effect of PT-31 (10 and 30 mg/kg, p.o.) in the rota-rod test. Clozapine and haloperidol were used as reference drugs.

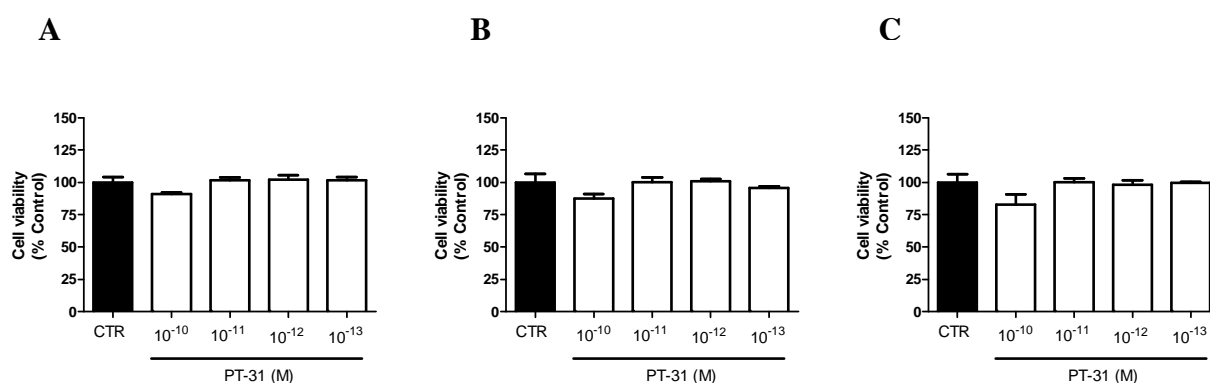
Treatment	Dose	Permanence time		Number of falls	
		T0	T60	T0	T60
SAL	1 mL/100g	224.2 ± 59.7	224.6 ± 64.6	1.4 ± 1.6	1.1 ± 1.5
Haloperidol	0.5 mg/kg	255.3 ± 59.3	79.2 ± 75.5***	0.7 ± 1.0	15.3 ± 12.0***
Clozapine	5 mg/kg	249.6 ± 65.5	216.2 ± 74.5	0.9 ± 1.1	1.0 ± 0.9
Clozapine	15 mg/kg	238.3 ± 74.5	86.9 ± 89.8***	1.3 ± 1.4	21.3 ± 17.5***
PT-31	10 mg/kg	233.0 ± 68.5	223.2 ± 65.2	1.9 ± 1.5	1.3 ± 0.9
PT-31	30 mg/kg	274.0 ± 57.4	212.4 ± 86.6	0.5 ± 0.8	2.4 ± 3.5

Data are expressed as mean+S.D (n=8-10/group). Two-way RM ANOVA *post hoc* Student Newman Keuls. Different from the first measure (basal, T0) at the same treatment group \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.2 In vitro assays

#### 3.2.1 Effect of different concentrations of PT-31 in primary cell culture

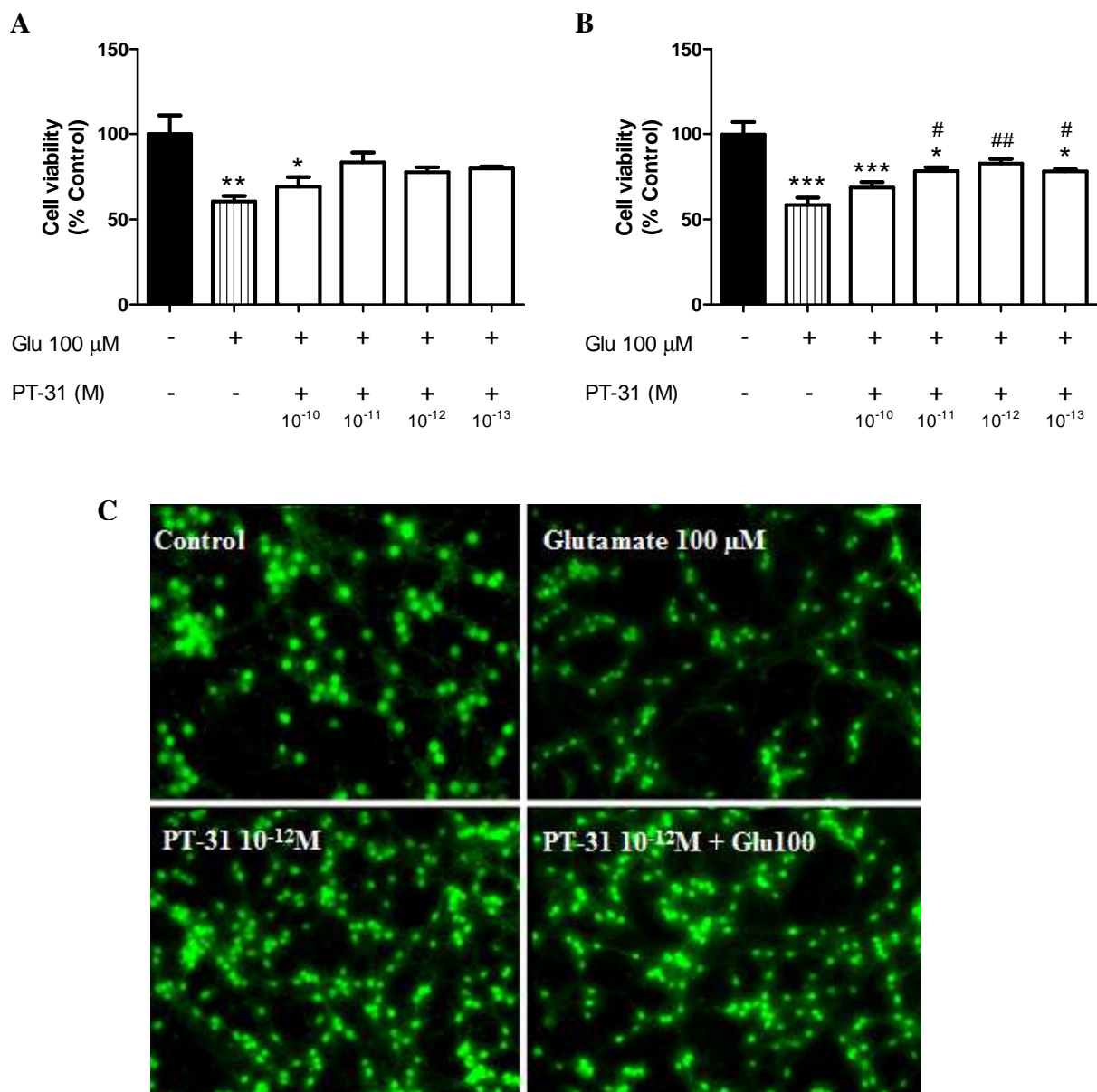
PT-31 ( $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M) did not affect cell viability at 24h (Fig. 10A) [F(4,18)=1.551,  $P=0.242$ ], 48h (Fig. 10B) [F(4,15)=1.480,  $P=0.274$ ] and 72h (Fig. 10C) [F(4,17)=2.259,  $P=0.119$ ], when added directly to the cerebellum granule cells.



**Fig. 10.** Effect of PT-31 ( $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M) in cerebellum granule cells (3-5 plates, quadruplicate). Data are expressed as mean+S.E.M. ANOVA *post hoc* Dunnet. A) 24h treatment; B) 48h treatment; C) 72h treatment.

### 3.2.2 Effect of PT-31 in a model of neurotoxicity in primary cell culture

In the presence of glutamate (100  $\mu$ M), PT-31 ( $10^{-12}$ M) demonstrated a significant neuroprotective effect against the excitotoxicity after 48 hours (Fig. 11B). The PT-31 concentrations  $10^{-11}$  and  $10^{-13}$ M, also at 48h, showed a tendency to protect neurons against the glutamate-induced toxicity. This tendency can be already observed within 24 hours, when these concentrations are not different from the control group (Fig. 11A). Fig. 11C illustrates the results obtained after 48 hours PT-31 treatment in the presence or not of glutamate.



**Fig. 11.** Effect of PT-31 ( $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M) in cerebellum primary culture in the presence of 100  $\mu$ M glutamate (3-4 plates quadruplicate). Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ANOVA *post hoc* Bonferroni. Different from control \* $P$ <0.05 \*\* $P$ <0.01 \*\*\* $P$ <0.001.

Different from glutamate <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ . A) 24h treatment; B) 48h treatment; C) Images of cerebellum primary cultures after 48h treatment.

#### 4. DISCUSSION

A previous study by Sudo and coworkers (2010) characterized PT-31, a new imidazolidine derivative, as an  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor agonist with antinociceptive synergic effect with morphine. Alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors mediate regulatory influence over various physiological, behavioral and endocrine functions, and are implicated in conditions such as hypertension, anxiety, endogenous depression and cognitive functions (Maze and Tranquilli, 1991). More than two decades has passed since the neuroprotective effect of clonidine and desmedetomidine,  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists, was demonstrated (Ma et al., 2005). However, this effect has not yet received adequate attention. Furthermore, some studies on the involvement of the noradrenergic system in schizophrenia demonstrated that clonidine, when administered alone or in combination with antipsychotics, improved cognition, as well as the positive and negative symptoms (Freedman et al., 1982; Fields et al., 1988; Maas et al., 1995). In this study we demonstrated that PT-31 is effective on schizophrenia positive and cognitive symptoms, without inducing extrapyramidal side effects in mice and has a neuroprotective effect against the excitotoxicity. These results point to the involvement of the noradrenergic system in schizophrenia, which has been neglected in the past years.

In the apomorphine-induced climbing, PT-31 was effective in all tested doses, except the highest one (30 mg/kg). This result indicates an antipsychotic effect and also suggests a biphasic effect. Once this model is based on the induction by apomorphine of a hyperdopaminergic state in animals, it is connected to motor agitation, and it can also respond to substances that induce motor impairments (Costall et al., 1978; Geyer and Ellenbroek, 2003). However, PT-31 was active at doses that did not induce catalepsy neither affect spontaneous locomotion nor altered the performance of animals in the rotarod, indicating that the effect observed in the climbing behavior is genuinely an effect suggestive of action on positive symptoms. There is not much information in the literature about the effect of  $\alpha$ -adrenoceptors ligands in this animal model, but an old

study (Quock et al., 1984) demonstrated that the pretreatment with low doses of an  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist, BE-2254, failed to suppress apomorphine-induced climbing.

The biphasic effect of PT-31 was also seen in the ketamine-induced hyperlocomotion. The lowest doses (0.3 and 1 mg/kg) were effective, but not the highest ones. Unlike the effect induced by dopaminergic agents, the PCP-induced hyperlocomotion and its analogs (ketamine and MK-801) is blocked only by atypical antipsychotic (Jentsch and Roth, 1999; Geyer and Ellenbroek, 2003). As far as we know this is the first time that the effect of an  $\alpha$ -adrenoceptor agonist in the ketamine-induced hyperlocomotion was demonstrated. Another study, published by Irifune and coworkers (1991), demonstrated that phenoxybenzamine, a non-selective  $\alpha$ -adrenergic antagonist, did not reverse the ketamine-induced hyperlocomotion. Sallinen and coworkers (1998) demonstrated that dexmedetomidine, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, inhibited the D-amphetamine-induced hyperlocomotion.

The results from the prepulse inhibition (PPI) are in line with the putative atypicality of PT-31 as well as replicate its biphasic effect. The PT-31 lowest doses (1 and 3 mg/kg) protected against the PPI deficits induced by apomorphine, ( $\pm$ )-DOI and ketamine whereas PT-31 10 mg/kg was effective in preventing the deficit induced by ( $\pm$ )-DOI and ketamine and the highest dose (30 mg/kg) prevented only the PPI deficit induced by ketamine. As expected haloperidol was able to prevent apomorphine and ketamine-induced PPI deficits only, while clozapine prevented also the PPI impairment induced by ( $\pm$ )-DOI. The prepulse inhibition (PPI) models in animals the preattentive deficits observed in schizophrenic patients, with translational and face validity (Jones et al. 2011; Porsolt et al. 2010). Apomorphine and ketamine can disrupt PPI in rodents, which can be prevented by typical and atypical antipsychotics, whereas 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonists induce PPI disruption that is prevented by atypical antipsychotics only (Auclair et al., 2006; Geyer et al., 2001; Martin et al., 2003; Schall et al., 1999; Swerdlow et al., 1998). Therefore, these results point to the potential effect of PT-31 in improving the disruption of preattentive processes, which remains crucial to the treatment of schizophrenia (Young et al., 2011). Several preclinical studies suggested that  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  noradrenergic receptors are involved in PPI: Swerdlow and coworkers (2006) showed that clonidine protected against the disruption of PPI induced by cirazoline, an  $\alpha_1$ -



adrenergic agonist, in rats. Alsene and Bakshi (2011) evaluated the regulation of PPI by the locus coeruleus (LC), the primary source of NE to forebrain, and demonstrated that PPI deficits in rats were prevented by the pre-treatment with clonidine or prazosin ( $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist) as well as by the antipsychotics olanzapine and quetiapine. In schizophrenic patients under stable medication, the sensorimotor impairment was normalized by adding low doses of clonidine to their treatment (Oranje and Glenthøj, 2013).

In the novel object recognition task, none of the tested doses (3, 10 and 30 mg/kg) impaired neither short nor long-term memories when administered to normal mice. When long-term memory was impaired by the pre-administration of ketamine, PT-31 at the highest dose (30 mg/kg) was able to protect against ketamine effects when administered at different moments: before training, after training and before long-term memory. The lower doses (3 and 10 mg/kg) were effective in preventing the memory impairments when administered concomitantly with ketamine (acquisition phase) only, being apparently ineffective on consolidation and retrieval processes. All types of memory depend on the integrated activity of various brain sites and involve more than one receptor or post-receptor mechanism, but evidences point to a complex interaction among adrenoceptors, indicating an inhibitory role of  $\alpha_1$  on memory consolidation and a favourable effect of  $\alpha_2$  by enhancing influence of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  receptors on consolidation (Izquierdo et al., 2004). Jentsch and Anzivino (2004) demonstrated that the deficits of visual attention and spatial memory produced by the NMDA antagonist PCP are attenuated by the pre-treatment with clonidine, which is highly effective in preventing many of the behavioral effects of NMDA antagonists. A possible mechanism by which clonidine suppresses PCP-induced behavioral deficits is by preventing abnormal monoamine or acetylcholine transmission in brain produced by the psychotomimetic drugs. Within neocortical regions, such as PFC, there are a large number of postsynaptic, as well as presynaptic,  $\alpha_2$  receptors (Aoki et al., 1998). Data from monkeys indicate that a significant portion of the neurocognitive effects of clonidine is mediated by postsynaptic receptors because destruction of the presynaptic catecholamines terminals potentiates, rather than decreases, the pro-cognitive effects of  $\alpha_2$  agonists in tests of working memory (Arnten and Goldman-Rakic, 1985). Thus we may suppose that  $\alpha_2$  agonists, such as

clonidine and also PT-31, may act via postsynaptic mechanisms to enhance excitatory transmission in cortical circuits, opposing the effects of PCP. Supporting this conclusion, clonidine was found to increase synaptically evoked excitatory postsynaptic potentials in PFC neurons recorded *in vitro* (Carr et al., 2007).

The dorsolateral PFC is involved in attention, and a loss of synaptic circuitry in this area may be a cause of attentional defects (Nandra and Agius, 2012). In schizophrenia, there is a reduction in the grey matter of the brain (Lieberman et al., 2005) and it occurs in the frontal cortex, and results in an expansion of the lateral and third ventricles (Glantz and Lewis, 2000). In addition, while it was originally thought that D<sub>2</sub> antagonism and dopamine disruption in the substance nigra was the cause of tardive dyskinesia, a new theory suggests that haloperidol is instead killing the cells of the substance nigra to cause the parkinsonism-like effects (Nandra and Agius, 2012). Thus, besides searching for a drug helpful in alleviating cognitive symptoms is desirable to find antipsychotics with neuroprotective properties.

PT-31 was tested on cerebellum granule cells ( $10^{-10}$  to  $10^{-13}$ M), where it was not toxic *per se* and showed a neuroprotective effect against the toxicity induced by glutamate (100  $\mu$ M), only at  $10^{-12}$ M, suggesting an inverted U-shaped pattern, which has already been reported to other adrenergic substances. Paris and coworkers (2006) demonstrated that the neuroprotective effect of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury was mediated by the  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor subtype and it displayed a U-shaped dose-response curve, decreasing neuroprotective properties with large doses; although this phenomenon is not fully understood, it has been attributed to a partial agonism at the  $\alpha_2$ -adrenergic receptors (Marien et al., 2004). The effect of PT-31 is in agreement with studies that demonstrated that  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists modulate glutamate and NMDA receptor-mediated responses in neuroprotection models (Baptiste et al., 2002; Dong et al., 2008). The antagonism of the presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors results in trophic effects such as the production of BDNF (Marien et al., 2004). Sanders and coworkers (2009) proposed that the administration of an  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist during the critical phase of synaptogenesis activates the endogenous postsynaptic norepinephrine-mediated trophic system, which couples to a pERK-Bcl-2 pathway to produce its antiapoptotic effect. Laudenbach and coworkers (2002) demonstrated the neuroprotective effects of clonidine

and dexmedetomidine in primary cortical neuronal cultures exposed to NMDA. Furthermore, it has been postulated that  $\alpha_2$ -adrenergic agonists, such as clonidine and dexmedetomidine, that present an imidazoline ring in their structure also interact with the imidazoline receptors (Khan et al., 1999). A role for imidazoline receptors in neuroprotection has been suggested by the findings that idazoxan, an imidazole antagonist, and rilmenidine, an imidazole agonist, protect neurons against ischemic damage and reduce the volume of infarction (Maiese et al., 1992). The reputed neuroprotective effect associated with  $I_2$  receptor binding comes from the observation that drugs occupying these receptor binding sites, including clonidine and rilmenidine, increase the influx of  $Ca^{2+}$  into cells and thus create a  $Ca^{2+}$  sink, which could be neuroprotective (Ma et al., 2005). It's conceivable that PT-31 binds to this receptor, but this assumption deserves further studies.

## 5. CONCLUSION

The results discussed so far characterize the imidazolidine derivative 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-imidazolidine-2,4-dione PT-31, an  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor agonist, as a new chemical entity with a pre-clinical pharmacology predictive of effects in relieving schizophrenia cognitive and positive symptoms without inducing extrapyramidal side effects. These findings are relevant since the extrapyramidal side effects and the lack of efficacy on treating cognitive symptoms remain a big challenge on schizophrenia therapeutic. In addition, this study adds evidence that  $\alpha_{2A}$ -adrenoceptor could represent a target for antipsychotic drugs, as well as reinforces the notion that this receptor plays a role in cognition and neuroprotection.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Institute of Science and Technology to Pharmaceutical Innovation (INCT-IF), Brazil. The authors are grateful to CAPES and CNPq for the fellowships.

## References

- Alsene, K.M., Bakshi, V.P. 2011. Pharmacological Stimulation of Locus Coeruleus Reveals a New Antipsychotic-Responsive Pathway for Deficient Sensorimotor Gating. *Neuropsychopharmacology* 36, 1656–1667.
- Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S. 1985. Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* 230, 1273–1276.
- Arnsten, A.F., Mathew, R., Ubriani, R., Taylor, J.R., Li, B.M. 1999. Alpha-1 noradrenergic receptor stimulation impairs prefrontal cortical cognitive function. *Biol Psychiatry*. 45(1), 26-31.
- Arnsten, A.F., Li, B.M. 2005. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 57(11), 1377-1384.
- Aoki, C., Go, C.G., Venkatesan, C., Kurose, H. 1994. Peri-Karyal and synaptic localization of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain Res* 650(2), 181–204.
- Aoki, C., Venkatesan, C., Go, C.G., Forman, R., Kurose, H. 1998. Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cereb Cortex*. 8(3), 269-277.
- Auclair, A.L., Kleven, M.S., Besnard, J., Depoortere, R., Newman-Tancredi, A., 2006. Actions of novel antipsychotic agents on apomorphine-induced PPI disruption: influence of combined serotonin 5-HT1A receptor activation and dopamine D2 receptor blockade. *Neuropsychopharmacology* 31, 1900-1909.
- Baptiste, D.C., Hartwick, A.T., Jollimore, C.A., Baldrige, W.H., Chauhan, B.C., Tremblay, F., Kelly, M.E. 2002. Comparison of the neuroprotective effects of adrenoceptor drugs in retinal cell culture and intact retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2666-2676.

BRASIL, 2008. Ministério Público. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Published in DOU 9.10.

Carr, D.B., Andrews, G.D., Glen, W.B., Lavin, A. 2007.  $\alpha$ 2-Noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J Physiol*. 584, 437-50.

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

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

Didier, M., Heaulme, M., Soubri, P., Bockaert, J., Pin, J.P. 1990. Rapid, sensitive and simple method for quantification of both neurotoxic and neurotrophic effects of NMDA on cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res*. 27, 25-35.

Dong, C.J., Guo, Y., Agey, P., Wheeler, L., Hare, W.A. 2008.  $\alpha$ 2 Adrenergic Modulation of NMDA Receptor Function as a Major Mechanism of RGC Protection in Experimental Glaucoma and Retinal Excitotoxicity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49(10), 4515-4522.

Ennaceur, A., Delacour, J. A., 1988. New one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31, 47-59.

Facci, L., Skaper S.D. 2012. Culture of rat cerebellar granule neurons and application to identify neuroprotective agents. *Methods Mol Biol* 846, 23-37.

Fields, R.B., Van Kammen, D.P., Peters, J.L., Rosen, J., Van Kammen, W.B., Nugent, A., Stipetic, M., Linnoila, M. 1998. Clonidine improves memory function in schizophrenia independently from change in psychosis. Preliminary findings. *Schizophr Res* 1, 417-423.

Franowicz, J.S., Arnsten, A.F. 1998. The  $\alpha$ -2a noradrenergic agonist, guanfacine, improves delayed response performance in young adult rhesus monkeys. *Psychopharmacol. (Berl)* 136, 8-14.

- Freedman, R., Kirch, D., Bell, J., Adler, L.E., Pecevich, M., Pachtman, E., Denver, P. 1982. Clonidine treatment of schizophrenia. Double-blind comparison to placebo and neuroleptic drugs. *Acta Psychiatr Scand* 65: 35–45.
- Gallo, V., Ciotti, M.T., Coletti, A., Aloisi, F., Levi, G. 1982. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci* 79, 7919–7923.
- Geyer, M.A., Ellenbroek, B., 2003. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic activity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 1071-1079.
- Geyer, M.A., Krebs-Thomson, K., Braff, D.L., Swerdlow, N.R., 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156(2-3), 117-154.
- Glantz, L.A., Lewis, D.A. 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 57(1), 65-73.
- Goldman-Rakic, P.S., Lidow, M.S., Gallager, D.W. 1990. Overlap of dopaminergic, adrenergic and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* 10, 2125-2138.
- Hartmann, E. 1976. Schizophrenia: a theory. *Psychopharmacology* 49: 1-15.
- Harvey, R., Chintala, S.K. 2007. Inhibition of Plasminogen Activators Attenuates the Death of Differentiated Retinal Ganglion Cells and Stabilizes Their Neurite Network In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (4), 1884-1891.
- Irifune, M., Shimizu, T., Nomoto, M. 1991. Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 40(2), 399-407.
- IUPHAR Database. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Available at: <http://www.iuphar-db.org/>.

- Izquierdo, I., Cammarota, M., Medina, J.H., Bevilaqua, L.R. 2004. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. *Neural Plast.* 11(3-4), 159-189.
- Jentsch, J.D., Anzivino, L.A. 2004. A low dose of the alpha2 agonist clonidine ameliorates the visual attention and spatial working memory deficits produced by phencyclidine administration to rats. *Psychopharmacol. (Berl)* 175, 76-83.
- Jentsch, J.D., Roth, R.H. 1999. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20, 201-225.
- Jones, C.A., Watson, D.J., Fone, K.C., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol.* 164(4), 1162-1194.
- Khan, Z.P., Ferguson, C.N., Jones, R.M. 1999. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia* 54, 146-165.
- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Regan, J.W. 1987. Cloning and sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha-2 adrenergic receptor. *Science* 238, 650-656.
- Krämer, D., Minichiello, L. 2010. Cell culture of primary cerebellar granule cells. *Methods Mol Biol.* 633, 233-239.
- Laudenbach, V., Mantz, J., Lagercrantz, H., Desmonts, J.M., Evrard, P., Gressens, P. 2002. Effects of alpha(2)-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine. *Anesthesiology.* 96(1), 134-141.
- Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S.E., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353, 1209-1223.
- Lomasney, J.W., Lorenz, W., Allen, L.F., King, K., Regan, J.W., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1990. Expansion of the  $\alpha_2$  Adrenergic family: Cloning and

characterization of human  $\alpha_2$  adrenergic subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5094–5098.

Ma, D., Hossain, M., Rajakumaraswamy, N., Arshad, M., Sanders, R.D., Franks, N.P., Maze, M. 2004. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the  $\alpha_2A$ -adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol.* 502, 87–97.

Maas, J.W., Miller, A.L., Tekell, J.L., Funderburg, L., Silva, J.A., True, J., Velligan, D., Berman, N., Bowden, C.L. 1995. Clonidine plus haloperidol in the treatment of schizophrenia/psychosis. *J Clin Psychopharmacol* 15, 361–364.

Macdonald, E., Kobilka, B.K., Scheinin, M. 1997. Gene targeting—homing in on  $\alpha_2$ -adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci* 18, 211–219.

Maiese, K., Pek, L., Berger, S.B., Reis, D.J. 1992. Reduction in focal cerebral ischemia by agents acting at imidazole receptors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 12(1), 53-63.

Marien, M.R., Colpaert, F.C., Rosenquist, A.C. 2004. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Rev* 45, 38-78.

Martin, R.S., Secchi, R.L., Sung, E., Lemaire, M., Bonhaus, D.W., Hedley, L.R., Lowe, D.A., 2003. Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat. *Psychopharmacology* 165, 128-135.

Maze, M., Tranquilli, W. 1991. Alpha-2 adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology.* 74(3), 581-605.

Moura, E., Afonso, J., Hein, L., Vieira-Coelho, M.A., 2006.  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br J Pharmacol* 149, 1049-1058.

Myskiw, J.C., Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2008. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 89, 338–351.

Nandra, K.S., Agius, M. 2012. The differences between typical and atypical antipsychotics: the effects on neurogenesis. *Psychiatr Danub.* 24(1), 95-99.



- Oranje, B., Glenthøj, B.Y. 2013. Clonidine Normalizes Sensorimotor Gating Deficits in Patients With Schizophrenia on Stable Medication. *Schizophr Bull.* 39(3), 684-691.
- Pan, Y.Z., Li, D.P., Pan, H.L. 2002. Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II(o) neurons by presynaptic  $\alpha(2)$ -adrenergic receptors. *J Neurophysiol* 87, 1938–1947.
- Paris, A., Mantz, J., Tonner, P.H., Hein, L., Brede, M., Gressens, P. 2006. The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the  $\alpha(2A)$ -adrenoceptor subtype. *Anesth Analg.* 102(2), 456-461.
- Peterhoff, M., Sieg, A., Brede, M., Chao, C.M., Hein, L., Ullrich, S. 2003. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in  $\alpha(2)$ -adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol* 149, 343–350.
- Porsolt, R.D., Moser, P.C., Castagne, V., 2010. Behavioral Indices in Antipsychotic Drug Discovery. *J Pharm Exp Ther* 333(3), 632-638.
- Quock, R.M., Bloom, A.S., Sadowski, J.A. 1984. Possible noradrenergic involvement in naloxone potentiation of apomorphine-induced stereotypic climbing in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 21(5), 733-736.
- Ramos, B.P., Arnsten, A.F.T. 2007. Adrenergic pharmacology and cognition: Focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther* 113, 523–536.
- Regan, J.W., Kobilka, T.S., Yang Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K. 1988. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an  $\alpha(2)$  adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6301– 6305.
- Sallinen, J., Haapalinna, A., Viitamaa, T., Kobilka, B.K., Scheinin, M. D. 1998. Amphetamine and L-5-hydroxytryptophan-induced behaviours in mice with genetically-altered expression of the  $\alpha(2C)$ -adrenergic receptor subtype. *Neuroscience* 86, 959-965.
- Sanders, R.D., Xu, J., Shu, Y., Januszewski, A., Halder, S., Fidalgo, A., Sun, P., Hossain, M., Ma, D., Maze, M. 2009. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology.* 110(5), 1077-1085.

- Satow, A., Suzuki, G., Maehara, S., Hikichi, H., Murai, T., Murai, T., Kawagoe-Takaki, H., Hata, M., Ito, S., Ozaki, S., Kawamoto, H., Ohta, H., 2009. Unique antipsychotic activities of the selective metabotropic glutamate receptor 1 allosteric antagonist 2-cyclopropyl-5-[1-(2-fluoro-3-pyridinyl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-2,3-dihydro-1H-isoindol-1-one. *JPET* 330, 179-190.
- Schall, U., Keyzers, C., Kast, B., 1999. Pharmacology of sensory gating in the ascending auditory system of the pigeon (*Columba livia*). *Psychopharmacology* 145(3), 273-282.
- Scheibner, J., Trendelenburg, A.U., Hein, L., Starke, K. 2001.  $\alpha$ 2-Adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol* 132, 925-933.
- Stein, L., Wise, C.D. 1971. Possible etiology of schizophrenia: progressive damage to the noradrenergic reward system by 6-hydroxydopamine. *Science* 171, 1032-1036.
- Sudo, R.T., Calasans-Maia, J.A., Galdino, S.L., Lima, M.C.A., Zapata-Sudo, G., Hernandez, M.Z., Pitta, I.R. 2010. Interaction of Morphine With a New  $\alpha$ 2-Adrenoceptor Agonist in Mice. *The Journal of Pain* 11(1), 71-78.
- Swerdlow, N.R., Bakshi, V., Waikar, M., Taaid, N., Geyer, M.A., 1998. Seroquel, clozapine and chlorpromazine restore sensorimotor gating in ketamine-treated rats. *Psychopharmacology* 140(1), 75-80.
- Uhlen, S., Muceniece, R., Rangel, N., Tiger, G., Wikberg, J. 1995. Comparison of the binding activities of some drugs on  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B,  $\alpha$ 2C adrenoceptors in noradrenergic imidazoline sites in the guinea pig. *Pharmacol Toxicol* 76, 353-364.
- Young, J.W., Powell, S.B., Scott, C.N., Zhou, X., Geyer, M.A., 2011. The effect of reduced dopamine D4 receptor expression in the 5-choice continuous performance task: Separating response inhibition from premature responding. *Behav Brain Res.* 222(1), 183-192.

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquizofrenia é uma doença que acomete cerca de 1% da população mundial. Entre 25 e 50% dos pacientes esquizofrênicos tentam suicídio, e aproximadamente 10% conseguem, contribuindo para uma taxa de mortalidade oito vezes maior que a da população em geral. A expectativa de vida dos pacientes esquizofrênicos está diminuída em 20 a 30 anos, não apenas devido à alta taxa de mortalidade, mas também devido ao aparecimento prematuro de doenças cardiovasculares (Crismon e Dorson, 1997; Elkis et al., 2008; Rang et al., 2008; Stahl, 2008). Além disso, estudos demonstram que pelo menos um terço dos pacientes com esquizofrenia são refratários ao tratamento com antipsicóticos (Ascher-Svanum et al., 2007). Um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos demonstrou que 74% dos pacientes descontinuam o uso com dezoito meses de terapia pela baixa tolerabilidade ou pela eficácia incompleta, indicando a necessidade de novas terapias (Snyder e Murphy, 2008). Geralmente, o transtorno tem início com um episódio agudo, e pode ser caracterizado por cinco diferentes tipos de manifestações: sintomas positivos, negativos, cognitivos, agressivos e afetivos (Stahl, 2008).

Existem mais de vinte fármacos antipsicóticos para uso clínico, mas as diferenças entre eles são pequenas. Os antipsicóticos são divididos em típicos ou de primeira geração (clorpromazina e haloperidol), e atípicos ou de segunda geração (clozapina, olanzapina, ziprasodona, quetiapina, risperidona) (Ascher-Svanum et al., 2007; Elkis e Meltzer, 2007; Rang et al., 2008). Os antipsicóticos típicos agem primariamente como antagonistas dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>. Os sintomas positivos da esquizofrenia respondem bem ao tratamento com estes fármacos, mas os sintomas negativos tendem a piorar com estes medicamentos, além dos sintomas extrapiramidais, que surgem em doses terapêuticas (Rang et al., 2008; Stahl, 2008). Os antipsicóticos atípicos, uma classe com baixa tendência para causar efeitos extrapiramidais, são potentes antagonistas de múltiplos subtipos de receptores, incluindo receptores de dopamina e serotonina. Entretanto, uma significativa parte dos pacientes continua refratária ao tratamento, além desta nova classe induzir graves efeitos adversos, como agranulocitose (clozapina), aumento de peso e diabetes (Rang et al., 2008; Stahl, 2008). Eficácia semelhante entre antipsicóticos típicos e atípicos foi encontrada no tratamento de pacientes não-refratários

em um grande estudo clínico (CATIE: clinical antipsychotic trial on intervention effectiveness) (Lieberman, 2006). Nesse estudo, a eficácia de alguns antipsicóticos típicos e atípicos em pacientes com esquizofrenia crônica foi investigada e o principal efeito adverso dos antipsicóticos atípicos, como a olanzapina, foi associado a um ganho de peso e alterações na glicose e no metabolismo lipídico. Os resultados obtidos nesse estudo revelam que os antipsicóticos atípicos não são ideais para o tratamento da esquizofrenia, existindo ainda uma necessidade de desenvolvimento de antipsicóticos com diferentes mecanismos de ação e menor incidência de efeitos adversos (Jafari et al., 2012). Além disso, os fármacos antipsicóticos em geral não conseguem tratar os sintomas cognitivos da doença, como problemas de atenção e memória de trabalho, os quais estão diretamente relacionados ao fato da esquizofrenia ser uma doença incapacitante (Insel, 2010).

No âmbito desta Tese de Doutorado, inserida em um Programa de Desenvolvimento de Novos Fármacos, novas moléculas com padrões moleculares distintos (derivados *N*-fenilpiperazínico, *N*-benziltiazolidínico e imidazolidínico) foram estudadas, visando à descoberta de novos agentes terapeuticamente úteis no tratamento da esquizofrenia. Sabe-se que os medicamentos são instrumentos essenciais à preservação, manutenção e promoção da Saúde. O acesso ao medicamento representa um importante fator de inclusão social que depende da disponibilidade do fármaco que, em 85% dos casos, é de origem sintética. Neste cenário, configura-se a importância do *saber-fazer* fármacos e medicamentos para viabilizar as políticas de Saúde autônomas, necessárias às demandas das Nações soberanas (Barreiro e Fraga, 2008).

Diversas estratégias podem ser utilizadas no planejamento de novas moléculas candidatas a fármacos. A principal é aquela baseada no mecanismo de ação pretendido, também denominada de abordagem fisiológica, a qual se fundamenta no conhecimento prévio dos processos fisiológicos e das alterações envolvidas na desordem em questão (Barreiro e Fraga, 2008; Wermuth, 2008). Alternativamente, quando a estrutura do alvo terapêutico não é conhecida, o desenho molecular de novos padrões estruturais do candidato a composto-protótipo desejado pode ser conduzido a partir do emprego de estratégias de planejamento estrutural da química medicinal como a identificação de novos análogos ativos do substrato natural do receptor ou do agonista da enzima

eventualmente eleita como alvo-terapêutico. O planejamento molecular racional destes análogos-ativos pode se dar pela introdução de modificações estruturais em um composto-protótipo, objetivando sua otimização, seja farmacocinética ou farmacodinâmica (Barreiro e Fraga, 2008; Wermuth, 2008). Outra estratégia largamente utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos baseia-se na modificação estrutural de fármacos conhecidos, levando à identificação de novos compostos-protótipos que atuam pelo mecanismo farmacológico do primeiro, sendo denominados de fármacos *me-too* (Barreiro e Fraga, 2008). Entretanto, essa estratégia vem sendo considerada, por alguns autores, como responsável por inovações parciais, uma vez que origina fármacos muito similares àqueles já existentes (Milne, 2003). Esse problema surgiu no início dos anos 80 e 90, quando a indústria farmacêutica percebeu que poderia arrecadar milhões de dólares por ano com versões levemente modificadas de fármacos já aprovados como medicamentos. Dessa forma, o investimento em verdadeiras inovações praticamente não ocorreu, uma vez que se conseguia lucrar muito apenas com fármacos *me-too*. Essa crise também teve reflexo na descoberta de novos fármacos para tratar a esquizofrenia, que pouco avançou nos últimos cinquenta anos (Pratt et al., 2012; Milne, 2003).

A indústria farmacêutica, infelizmente, possui boas razões para ver investimentos no desenvolvimento de novos fármacos para o SNC como mais arriscados que em outras áreas. Fármacos que atuam no SNC custam mais e levam mais tempo para chegar ao mercado. Ainda, apenas 8% dos fármacos que chegam a ensaio clínico, são realmente aprovados, o que representa metade da taxa de sucesso das demais áreas terapêuticas. Geralmente o fracasso de fármacos do SNC ocorre em estágios mais avançados dos estudos clínicos, após um investimento bastante significativo da indústria. Adicionado a esses problemas, modelos animais, particularmente para desordens psiquiátricas, estão longe de serem perfeitos para prever quais compostos serão realmente efetivos em humanos, além dos ensaios clínicos serem geralmente mais complicados para desordens do SNC. Todas essas questões, juntas, fazem da descoberta e desenvolvimento em Neurociência mais arriscada (Miler, 2010).

Frente ao exposto, acreditamos que a principal contribuição dessa Tese foi a identificação de três novas moléculas com potencial antipsicótico, LASSBio-1422, um derivado *N*-fenilpiperazínico, FPY-3, um derivado *N*-benziltiazolidínico e PT-31, um

derivado imidazolidínico. Para isso, buscamos novas abordagens no estudo de antipsicóticos, deixando de lado a abordagem clássica de fármacos *me-too*. Essas moléculas parecem não ter como alvo biológico os receptores clássicos envolvidos na esquizofrenia, dopaminérgicos e/ou serotoninérgicos (Snyder e Murphy, 2008). Entretanto, apesar de LASSBio-1422, FPY-3 e PT-31 atuarem aparentemente em diferentes alvos biológicos, essas moléculas apresentam basicamente o mesmo perfil *in vivo*. Sabemos que a esquizofrenia, em função da sua diversidade de alvos, representa uma doença de difícil tratamento. Os modelos animais para desordens psiquiátricas complexas e heterogêneas, como a esquizofrenia, são ferramentas bastante úteis para investigar as bases neurobiológicas da desordem, uma vez que oferecem uma plataforma mais rápida para monitorar a progressão da doença que em humanos, e representam uma oportunidade para testar novas substâncias que não poderiam ser testadas diretamente em humanos. Entretanto, um problema com os modelos animais é que não existe um “padrão ouro” disponível para tratar todos os sintomas que possa ser usado como um controle positivo nos estudos pré-clínicos, apesar de fármacos como haloperidol e clozapina conseguirem reverter comportamentos relacionados aos diferentes sintomas. Estima-se que existam mais de vinte modelos animais de esquizofrenia (Carpenter e Koenig, 2008), mas o desenvolvimento de novos modelos mais confiáveis e preditivos das desordens psiquiátricas, como a esquizofrenia, ainda é essencial para aumentarmos o entendimento das bases neurobiológicas da desordem e, conseqüentemente, desenvolvermos novos fármacos eficazes na terapia (Pratt et al., 2012).

A funcionalização dos análogos de LASSBio-579, derivado *N*-fenilpiperazínico, protótipo para o desenvolvimento de novos antipsicóticos, resultou em compostos muitos semelhantes do ponto de vista farmacodinâmico; porém, LASSBio-1422 mostrou-se eficaz em modelos animais preditivos de sintomas positivos da esquizofrenia, sem causar prejuízo motor nem sedação. Além disso, mostrou-se ativo no tratamento de prejuízo pré-atencional e memória, o que representa um avanço em relação à maioria dos antipsicóticos disponíveis. LASSBio-1422 atua como um antagonista de receptores do tipo D<sub>4</sub>. Acreditamos que a grande contribuição dessa molécula foi retomar a importância de um alvo, que por muito tempo permaneceu desacreditado, mas que mostrou ser muito importante no tratamento dessa doença. LASSBio-1422 pode ser uma importante



ferramenta molecular para o desenvolvimento de novos antipsicóticos. A partir desses resultados, verificamos que a otimização farmacológica de LASSBio-579 atingiu seu objetivo, uma vez que a sua funcionalização resultou em um composto muito semelhante *in vivo*; porém, com um diferente perfil de ligação aos receptores estudados e sem comprometimento motor (Neves et al., 2003; 2008; 2013).

A segunda molécula estudada, FPY-3, um derivado *N*-benziltiazolidínico, também foi efetiva nos modelos animais preditivos de sintomas positivos da esquizofrenia, sem causar efeitos motores e sedação. Entretanto, a maior contribuição dessa molécula foi seu perfil sobre o metabolismo lipídico, quando comparado aos antipsicóticos atípicos, pois a ausência de toxicidade após 14 dias de tratamento sugere menor potencial para indução de síndrome metabólica, um dos principais efeitos adversos da segunda geração de antipsicóticos (Elkis et al., 2008). FPY-3 também protegeu neurônios primários cerebelares contra a toxicidade induzida pelo glutamato, o que representa uma vantagem em relação aos demais tratamentos se levarmos em consideração a excitotoxicidade, processo que ocorre na esquizofrenia (Benes e Berretta, 2001; Konradi e Heckers, 2003; Stone et al., 2007). Por se tratar de uma estrutura molecular inédita, os dados gerados nessa tese levaram à elaboração de um relatório de invenção para pedido de depósito de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), a fim de proteger a estrutura geral dos derivados *N*-benziltiazolidínicos. Ainda, FPY-3 pode representar um importante protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas que possam tratar doenças neurodegenerativas.

O derivado imidazolidínico PT-31, por sua vez, possui uma estrutura molecular inédita, nunca antes estudada para atividade antipsicótica. PT-31, um agonista  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico, mostrou-se eficaz no tratamento de sintomas cognitivos, que ainda representam um dos principais desafios no tratamento da esquizofrenia (Young et al., 2011). O sistema noradrenérgico foi estudado há décadas (Stein e Wise, 1971; Hartmann, 1976), porém o interesse por esse sistema foi se perdendo ao longo dos últimos anos (Oranje e Glenthøj, 2012). Recentemente, percebe-se uma retomada do interesse pelo sistema noradrenérgico e PT-31 vêm reforçar a importância do mesmo, uma vez que se mostrou eficaz em modelos animais preditivos de sintomas positivos e, principalmente, cognitivos da esquizofrenia, sem causar efeitos extrapiramidais, e ainda mostrou um

efeito neuroprotetor em cultura primária de neurônios. PT-31 já possui um depósito de patente no INPI referente à sua atividade antinociceptiva; porém, um novo pedido será solicitado pelo nosso grupo, em função do seu potencial antipsicótico.

Por fim, se considerarmos a existência de uma crise de criatividade no setor farmacêutico, relacionada com a diminuição constante do número de novas entidades químicas efetivamente inovadoras, e juntarmos com a pesquisa acadêmica para desenvolver os primeiros estágios da descoberta de novos fármacos, sugerimos que as moléculas estudadas no âmbito dessa Tese, LASSBio-1422, FPY-3 e PT-31, possam representar ferramentas ou protótipos em estratégias de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquizofrenia.

## REFERÊNCIAS

- ASCHER-SVANUM, H.; NYHUIS, A.W.; FARIES, D.E.; KINON, B.J.; BAKER, R.W.; SHEKHAR, A. Clinical, Functional, and Economic Ramifications of Early Nonresponse to Antipsychotics in the Naturalistic Treatment of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin** 21: 1-9, 2007.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2 ed., 2008.
- BENES, F.M.; BERRETTA, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology** 25: 1-27, 2001.
- CARPENTER, W.T.; KOENIG, J.I. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. **Neuropsychopharmacology**. 33(9): 2061-2079, 2008.
- CONRADO, D.J.; VERLI, H.; NEVES, G.; FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N-phenylpiperazine antipsychotic prototype. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60(6): 699-707, 2008.
- CRISMON, M.L.; DORSON, P.G. **Schizophrenia**. In: DIPIRO, J.T. *et al.* (Ed.) **Pharmacotherapy – A Pathophysiologic Approach**. 3 ed. Stamford: Appleton Lange, 1997.
- DONG, C.J.; GUO, Y.; AGEY, P.; WHEELER, L.; HARE, W.A.  $\alpha$ 2 Adrenergic Modulation of NMDA Receptor Function as a Major Mechanism of RGC Protection in Experimental Glaucoma and Retinal Excitotoxicity. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 49(10): 4515-4522, 2008.
- ELKIS, H.; GAMA, C.; SUPLICY, H.; TAMBASCIA, M.; BRESSAN, R.; LYRA, R.; CAVALCANTE, S.; MINICUCCI, W. Consenso Brasileiro sobre Antipsicóticos de Segunda Geração e Distúrbios Metabólicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 30(1): 77-85, 2008.
- ELKIS, H.E.; MELTZER, H.Y. Refractory Schizophrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 29 (Supl II): 41-47, 2007.
- HARTMANN, E. Schizophrenia: a theory. **Psychopharmacology** 49: 1-15, 1976.
- INSEL, T.R. Rethinking schizophrenia. **Nature** 468: 187-193, 2010
- JAFARI, S.; FERNANDEZ-HENRICHT, F.; HUANG, X.F. Structural contributions of antipsychotics drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects. **Journal of Neurochemistry** 120: 371-384, 2012.

KONRADI, C.; HECKERS, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. **Pharmacology & Therapeutics** 97: 153– 179, 2003.

KULAGOWSKI, J.J.; BROUGHTON, H.B.; CURTIS, N.R.; MAWER, I.M.; RIDGILL, M.P.; BAKER, R.; EMMS, F.; FREEDMAN, S.B.; MARWOOD, R.; PATEL, S.; PATEL, S.; RAGAN, C.I.; LEESON, P.D. 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1H-pyrrolo-2,3-b-pyridine: an antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor **Journal of Medicinal Chemistry** 39(10): 1941-1942, 1996.

LIEBERMAN, J.A. Comparative effectiveness of antipsychotic drugs. **Arch. Gen. Psychiatry** 63: 1069-1072, 2006.

MA, D.; HOSSAIN, M.; RAJAKUMARASWAMY, N.; ARSHAD, M.; SANDERS, R.D.; FRANKS, N.P.; MAZE, M. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the  $\alpha_2A$ -adrenoceptor subtype. **European Journal of Pharmacology** 502: 87– 97, 2004.

MENEGATTI, R. Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Candidatos a Protótipos de Agentes Anti-psicóticos. **Dissertação de Mestrado**. LASSBio/Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A.C.; FERREIRA, V.F.; PEREIRA, E.F.R.; EL-NABAWI, A.; ELDEFRAWI, A.T.; ALBUQUERQUE, E.X.; NEVES, G.; RATES, S.M.K.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 11: 4807-4813, 2003.

MILLER, G. Is Pharma running out of brainy ideas? **Science** 329: 502-504, 2010.

MILNE JR, G.M. Pharmaceutical productivity – The imperative for new paradigms. **Annual Reports in Medicinal Chemistry** 38: 383-396, 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.; RATES, S.M.K. Dopaminergic profile of new heterocyclic N-phenylpiperazine derivatives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36: 625-629, 2003.

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. Estudo de derivados N-fenilpiperazínicos candidatos a protótipos de fármacos antipsicóticos de segunda geração. **Tese de doutorado**. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2009.

NEVES, G.; ANTONIO, C.B.; BETTI, A.H.; PRANKE, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; NOEL, F.; RATES, S.M.K. New insights into pharmacological profile of LASSBio-579, a multi-target *N*-phenylpiperazine derivative active on animal models of schizophrenia. **Behavioural Brain Research** 237: 86-95, 2013.

ORANJE, B.; GLENTHOJ, B.Y. Clonidine Normalizes Sensorimotor Gating Deficits in Patients With Schizophrenia on Stable Medication. **Schizophrenia Bulletin** 39(3): 684-691, 2013.

PRATT, J.; WINCHESTER, C.; DAWSON, N.; MORRIS, B. Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. **Nature Reviews Drug Discovery** 11(7): 560-579, 2012.

RANG H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LDTA, 2008.

SNYDER, E.M.; MURPHY, M.L. Schizophrenia therapy: beyond atypical antipsychotics. **Drug Discovery** 7: 471-472, 2008.

STAHL, S.M. **Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications** 3<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

STEIN, L.; WISE, C.D. Possible etiology of schizophrenia: progressive damage to the noradrenergic reward system by 6-hydroxydopamine. **Science** 171: 1032-1036, 1971.

STONE, J.M.; MORRISON, P.D.; PILOWSKY, L.S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia – a synthesis and selective review. **Journal of Psychopharmacology** 21(4): 440-452, 2007.

WERMUTH, C.G.; GANELLIN, C.R.; IMHOF, P.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. Glossary of terms used in medicinal chemistry Part II, **IUPAC Recommendations** 2008.

YOUNG, J.W.; POWELL, S.B.; SCOTT, C.N.; ZHOU, X.; GEYER, M.A. The effect of reduced dopamine D4 receptor expression in the 5-choice continuous performance task: Separating response inhibition from premature responding. **Behavioural Brain Research** 222(1): 183-192, 2011.