

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

**Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados  
*N*-fenilpiperazínicos e *N*-benziltiazolidínicos**

**ANDRESA HEEMANN BETTI**

**PORTO ALEGRE, 2009.**



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

**Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados  
*N*-fenilpiperazínicos e *N*-benziltiazolidínicos**

Dissertação apresentada por **Andresa  
Heemann Betti** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado em 13.11.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Lídia Moreira Lima  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carmem Gottfried  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Vera Eifler Lima  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B565a Betti, Andresa Heemann  
Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados N-fenilpiperazínicos e N-benziltiazolidínicos / Andresa Heemann Betti. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xviii, 145 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

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

CDU: 547.9:615.214

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

*Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios de Psicofarmacologia Experimental (UFRGS) e Laboratório de Farmacologia Molecular e Bioquímica (UFRJ) que disponibilizaram todos equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.*



## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof. Dra. Stela Rates por ter me ensinado acima de tudo a ser ética nos meus experimentos e que despertou em mim esse enorme interesse pela Ciência. Stela, és um exemplo de pesquisadora para mim! Muito obrigada por ter acreditado em mim já no primeiro semestre da faculdade.

À CAPES pelo apoio financeiro através de bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. François Noël pelo acolhimento em seu laboratório na UFRJ e pelos ensinamentos.

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

Aos Prof. Dr. Ivan Pitta, Suely Galdino e Maria do Carmo pela síntese e caracterização das moléculas da série UFPe.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia – UFRGS: Gilda, Eveline, Diego, Camila, Mariana, Ana, Fernanda, Luísa, Thiaguinho, Gustavo e Andressa, pela amizade e ajuda prestada. Todos, cada um da sua forma, foram essenciais para a realização desse trabalho.

Muito obrigada a vocês de coração!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular – UFRJ, pelo acolhimento e ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

A minha família que tanto me apoiou: meus irmãos Diego e Mariana, pelo apoio e carinho, e minha mãe Maria Bernardete, eterna incentivadora e exemplo de vida!

Ao meu noivo Luciano pela compreensão, tolerância e presença nos momentos fundamentais. Ainda, por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava mais.





## RESUMO

Considerando a necessidade de antipsicóticos mais seguros e eficazes, uma série de derivados *N*-fenilpiperazínicos funcionalizados e *N*-benziltiazolidínicos foi planejada e sintetizada pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ) (LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 e LASSBio-1422) e pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT-UFPe) (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1), respectivamente. **Objetivos:** selecionar os derivados com potencial atividade antipsicótica através do ensaio de *climbing* induzido por apomorfina, um modelo preditivo de sintomas positivos da esquizofrenia. Avaliar a ocorrência de efeitos motores e neurotoxicidade por catatonía e rota-rod. Avaliar possíveis efeitos adversos por locomoção e tempo de sono barbitúrico. Verificar o perfil de afinidade a receptores através de ensaios de *binding*. **Métodos:** para os ensaios de *binding* foram utilizados cérebros de ratos Wistar para os receptores  $D_2$ -like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> e fígado de coelho e rato para os receptores  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1B}$ . Camundongos CF1 machos foram utilizados para os testes *in vivo*. As substâncias foram testadas no modelo de *climbing* induzido por apomorfina e apenas às substâncias capazes de inibir *climbing* foi dada continuidade ao estudo. **Resultados:** LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1422, FPT-2, FPT-4 e FPY-3 inibiram *climbing*, sem induzir sinais de catatonía, comprometimento motor, alteração do comportamento exploratório e efeito hipnótico-sedativo. Um estudo dose-resposta (0,5 - 30 mg/kg, v.o.) dessas substâncias indicou LASSBio-1412 como o composto mais potente *in vivo*. *In vitro*, observou-se que os derivados *N*-fenilpiperazínicos possuem uma moderada afinidade pelos receptores estudados, demonstrando um perfil de ligação multirreceptor; semelhante aos antipsicóticos atípicos. Por outro lado, os derivados *N*-benziltiazolidínicos possuem baixa afinidade por esses receptores, sugerindo um mecanismo de ação diferente. **Conclusão:** Essas moléculas podem representar protótipos promissores para o desenvolvimento de novos antipsicóticos.

**Palavras-chave:** esquizofrenia, derivados *N*-fenilpiperazínicos, derivados *N*-benziltiazolidínicos, *climbing* induzido por apomorfina, ensaios de *binding*.



## ABSTRACT

Considering that more effective and safer drugs to treat schizophrenia are still needed a series of functionalized *N*-phenylpiperazines and *N*-benziltiazolidines derivatives were planned and synthesized by Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas Group (LASSBio/UFRJ): (LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422), and Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Group/UFPE: (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1), respectively. The aim of this study was to search the derivatives with potential antipsychotic activity through apomorphine-induced climbing test and binding receptor assaying as well as to evaluate their potential extrapyramidal side-effects and neurotoxicity by catatonia and rota-rod tests. Adverse effects were also evaluated by open-field test and barbiturate sleeping time. **Methods:** Binding assays to *D*<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub>, and 5-HT<sub>2A</sub> receptors were performed in brain rat regions and binding to  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors were performed in rabbit and rat liver, respectively. All compounds were initially tested by mice apomorphine-induced climbing and only those able to inhibit climbing were selected to further studies. **Results:** LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1422, FPT-2, FPT-4 and FPY-3 inhibited climbing without inducing catatonic behavior, general motor impairment, exploratory behavior alterations or hypnotic-sedative effect. A dose-responde study pointed LASSBio-1412 as the most potent compound *in vivo*. *In vitro*, the *N*-fenilpiperazines derivatives demonstrated a moderate affinity to the studied receptors, demonstrating a multireceptor profile characteristic of atypical antipsychotics. In a different way, the *N*-benziltiazolidines derivatives have a low affinity to these receptors, suggesting that these compounds could be acting through a different action mechanism. **Conclusion:** These compounds are promising molecules to antipsychotics development.

**Keywords:** *N*-phenylpiperazine derivatives, *N*-benziltiazolidines derivatives, schizophrenia, antipsychotic prototypes, climbing induced by apomorphine, binding assays.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gênese estrutural de LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581.....	02
<b>Figura 1.1</b> Estrutura geral dos derivados <i>N</i> -benziltiazolidínicos, objeto desta proposta.....	35
<b>Figura 1.2</b> Efeito de FPY-1 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	47
<b>Figura 1.3</b> Efeito de FPY-2 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	48
<b>Figura 1.4</b> Efeito de FPY-3 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	49
<b>Figura 1.5</b> Efeito de FPY-5 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	50
<b>Figura 1.6</b> Efeito de FPY-6 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	51
<b>Figura 1.7</b> Efeito de FPT-1 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	52
<b>Figura 1.8</b> Efeito de FPT-2 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	53
<b>Figura 1.9</b> Efeito de FPT-4 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	54
<b>Figura 1.10</b> Efeito de FPW-1 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	55
<b>Figura 1.11</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	56
<b>Figura 1.12</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste indução de catatonia.....	57
<b>Figura 1.13</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	58
<b>Figura 1.14</b> Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de toxicidade aguda. Parâmetro: controle de ganho de massa corporal.....	59
<b>Figura 1.15</b> Efeito de FPY-3+APO no modelo de escalada induzido por apomorfina.....	60
<b>Figura 1.16</b> Efeito de FPY-3 no teste de potenciação do sono barbitúrico.....	61
<b>Figura 1.17</b> Efeito de FPY-3 no teste de exposição ao campo aberto.....	67

<b>Figure 2.1</b> Structure of LASSBio-579 .....	121
<b>Figure 2.2</b> LASSBio-579 derivatives synthesis route.....	122
<b>Figure 2.3</b> Apomorphine-induced climbing behavior.....	123
<b>Figure 2.4</b> Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 in catalepsy test.....	124
<b>Figure 2.5</b> Apomorphine-induced climbing test.....	125
<b>Figure 2.6</b> Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 on locomotor activity of mice.....	126
<b>Figure 2.7</b> Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 in the rotarod test.....	127
<b>Figure 2.8</b> Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 on barbiturate sleeping time.....	128
<b>Figure 2.9</b> Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 on gross behavior observation.....	129

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1** Percentual de inibição da ligação aos receptores na maior concentração de *screening*.....63

**Table 2.1** Affinities of LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422 for D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors.....117





## ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
ANILAB	Paulinha Animais de Laboratório
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
EPS	Sintomas Extrapiramidais
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GPIT	Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
HAL	Haloperidol
Cl <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50
i.p.	Intra-peritoneal
K <sub>i</sub>	Constante de Dissociação
k <sub>off</sub>	Constante de Velocidade de Dissociação
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LASSBio-579	1-[1-(4-clorofenil)-1 <i>H</i> -4-pirazolilmetil]-4-fenilexidropiperazina
LASSBio-1412	4-(4-((5-cloro-3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)piperazina-1-il)fenol
LASSBio-1413	1-((3,5-dimetil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)-4-fenilpiperazina
LASSBio-1414	4-(4-((3,5-dimetil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)piperazina-1-il)fenol
LASSBio-1415	1-((5-cloro-3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)-4-fenilpiperazina
LASSBio-1422	1-((5-cloro-3-metil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-il)metil)-4-(4-fluorofenil)piperazina
mGluR	Receptores Metabotrópicos de Glutamato
NDMC	<i>N</i> -desmetilclozapina

NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
PCP	Fenciclidina
PET	Tomografia de Emissão de Positron
p.o.	<i>per os</i>
POP	2,5-diphenyloxazole
POPOP	1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene
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	( <i>S</i> )- <i>N</i> -tert-butyl-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazin-1-il)-2-fenilpropanamida

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>05</b>
<b><i>CAPÍTULO I</i></b>	
Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados N-benziltiazolidínicos.....	07
<b>RESUMO.....</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
3.1 Esquizofrenia.....	25
3.2 Neurobiologia da esquizofrenia.....	26
3.2.1 Teorias neuroquímicas.....	26
3.2.1.1 <i>Esquizofrenia e as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica.....</i>	<i>26</i>
3.2.1.3 <i>Outras teorias.....</i>	<i>28</i>
3.3 Teorias atuais para atipicalidade de antipsicóticos.....	28
3.4 Tratamento da esquizofrenia.....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Preparação dos derivados.....	35
4.2 Animais.....	35
4.3 Ética.....	36
4.4 Tratamentos.....	36
4.5 Drogas e Fármacos.....	37

4.6 Testes comportamentais.....	37
4.6.1 Bloqueio do comportamento de escalada ( <i>climbing</i> ) induzido por apomorfina.....	37
4.6.2 Indução de catatonia.....	38
4.6.3 Avaliação do efeito sobre a coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	38
4.6.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea – Teste de exposição ao campo aberto ( <i>Open Field</i> ).....	39
4.6.5 Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	40
4.6.6 Observação de comportamento e estado físico .....	40
4.7 Ensaio <i>in vitro</i> .....	41
4.7.1 Radioligantes e Drogas.....	41
4.7.2 Preparação do Tecido.....	42
4.7.3 Ensaio de radioligação a receptores <i>D<sub>2</sub>-like</i> .....	42
4.7.4 Ensaio de radioligação a receptores 5-HT <sub>1A</sub> .....	43
4.7.5 Ensaio de radioligação a receptores 5-HT <sub>2A</sub> .....	43
4.8 Análise estatística.....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 Triagem para atividade antipsicótica: Bloqueio do comportamento de escalada ( <i>climbing</i> ) induzido por apomorfina.....	47
5.2 Avaliação de distúrbios motores.....	56
5.2.1 Indução de catatonia.....	56
5.2.2 Avaliação do efeito sobre a coordenação motora em aparelho de rota-rod.....	57
5.3 Observação de comportamento e estado físico.....	59
5.4 Avaliação farmacológica de FPY-3.....	60
5.4.1 Estudo de dose-resposta.....	60
5.4.2 Teste de potenciação do sono barbitúrico.....	60
5.4.3 Avaliação da atividade locomotora espontânea – Teste de exposição ao campo aberto ( <i>Open Field</i> ).....	62
5.5 Ensaio <i>in vitro</i> .....	62

<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b><i>CAPÍTULO II</i></b>	
New functionalized <i>N</i> -phenylpiperazine derivatives, LASSBio-1412 and LASSBio-1413, present an atypical antipsychotic profile in rodents.....	87
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>131</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>135</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>143</b>

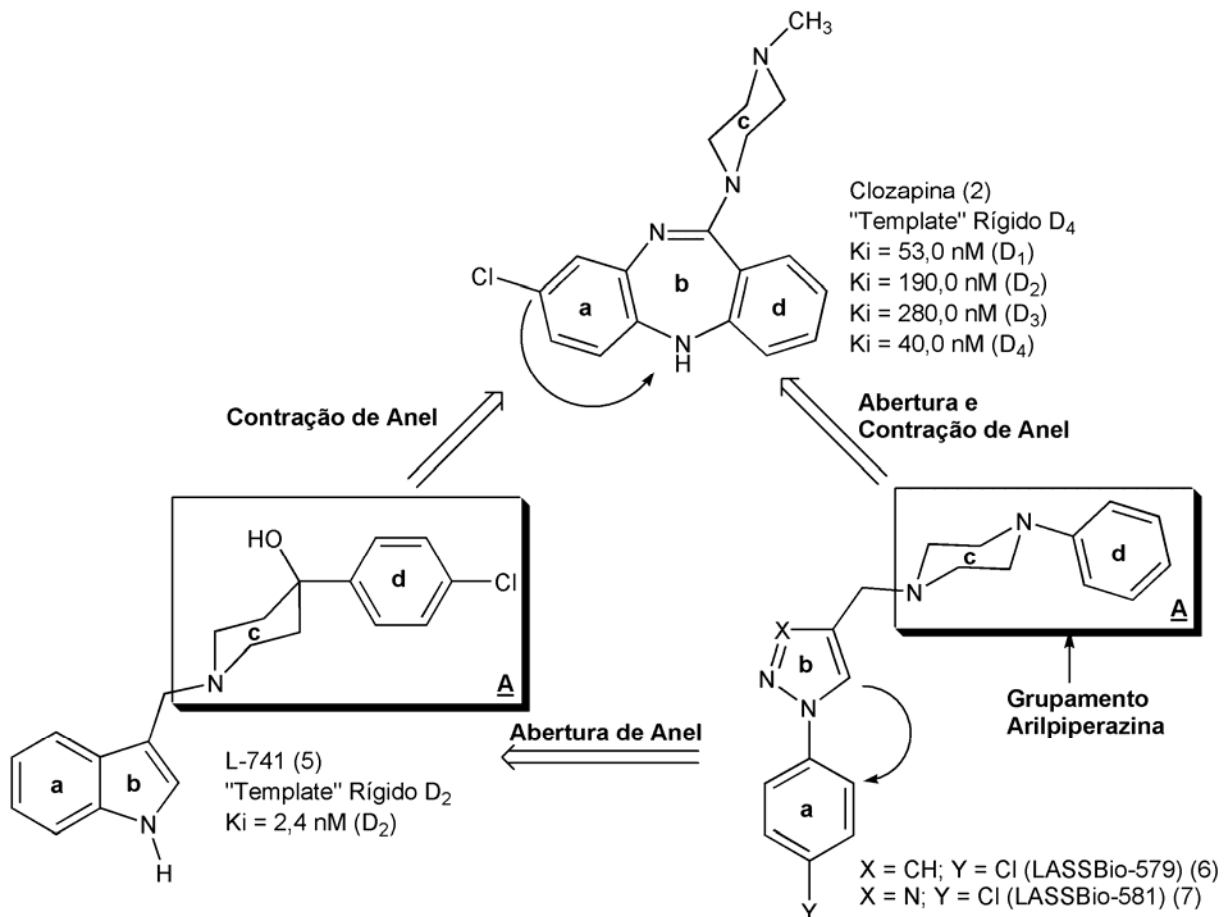


## APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido 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 Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica/UFPE, no âmbito do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - PROCAD – CAPES (processo 420.015/2005-1), e é apoiado pelo INCT de Fármacos e Medicamentos – INCT-INO FAR - 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).

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). A gênese estrutural destes compostos está apresentada no esquema abaixo.



**Figura 1.** Gênese estrutural de LASSBio-579, LASSBio-580 e LASSBio-581 a partir da estrutura da clozapina e do composto L-741 (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. 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 *binding* para receptores D<sub>2</sub>-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 *climbing* induzido 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 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 de LASSBio-579: LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 e LASSBio-1422, os quais foram avaliados no âmbito desta Dissertação de Mestrado.

O Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT – UFPe), por sua vez, sintetizou 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*.

Este trabalho será apresentado na forma de dois capítulos. No primeiro capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para as moléculas sintetizadas pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (UFPe), derivados *N*-benziltiazolidínicos. As estruturas químicas das mesmas não serão apresentadas, uma vez que essas se encontram sob sigilo. No segundo capítulo, serão abordados os resultados obtidos para as substâncias sintetizadas pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (UFRJ), derivados funcionalizados de LASSBio-579. Esses dados serão apresentados na forma de manuscrito a ser submetido ao periódico *European Journal of Pharmacology*.



## **OBJETIVOS GERAIS**

Considerando os resultados anteriormente expostos, o objetivo geral dessa Dissertação foi a avaliação farmacológica de uma série de derivados *N*-fenilpiperazínicos funcionalizados de LASSBio-579 planejados e sintetizados pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), assim como de derivados *N*-benziltiazolidínicos planejados e sintetizados pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPe), buscando novas substâncias com potencial utilização para o tratamento da esquizofrenia.



## ***CAPÍTULO I***

Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados *N*-benziltiazolidínicos

---

---



## RESUMO

Considerando a necessidade de antipsicóticos mais seguros e eficazes, sabendo que ao menos um terço dos pacientes são refratários ao tratamento com os antipsicóticos disponíveis, uma série de derivados *N*-benziltiazolidínicos foi planejada e sintetizada pelo GPIT-UFPe (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1). **Objetivos:** selecionar os derivados com potencial atividade antipsicótica através do ensaio de *climbing* induzido por apomorfina, um modelo preditivo de sintomas positivos da esquizofrenia. Avaliar a ocorrência de efeitos motores e neurotoxicidade por catatonía e rota-rod. Verificar o perfil de afinidade a receptores através de ensaios de *binding*. **Métodos:** para os ensaios de *binding* foram utilizados cérebros de ratos Wistar e radioligantes para os receptores D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>: [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2, [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT e [<sup>3</sup>H]-cetanserina, respectivamente. Camundongos CF1 machos foram utilizados para os testes *in vivo*. As substâncias (30 mg/kg, v.o.) foram testadas no modelo de *climbing* induzido por apomorfina e apenas as capazes de inibir *climbing*, foram submetidas aos testes de catatonía e rota-rod. **Resultados:** Os derivados possuem baixa afinidade pelos receptores estudados, uma vez que na concentração de 10 µM não causaram uma inibição significativa de *binding* a esses sítios, com exceção de FPY-3, que apresentou uma afinidade moderada pelos receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub>. FPT-2, FPT-4 e FPY-3 inibiram *climbing*, sem induzir sinais de catatonía e comprometimento motor. FPY-3 foi escolhido para continuar os estudos. Um estudo dose-resposta (5, 15 e 30 mg/kg, v.o.) indicou 15 mg/kg como a dose mínima efetiva. Na locomoção e no tempo de sono barbitúrico, FPY-3 não alterou nenhum dos parâmetros observados demonstrando que essa substância não apresenta efeito hipnótico-sedativo na dose testada. **Conclusão:** FPT-2, FPT-4 e FPY-3 são ativos no modelo de *climbing* induzido por apomorfina, sem afetar parâmetros motores, tornando-os moléculas promissoras para o desenvolvimento de antipsicóticos. Além disso, elas podem estar atuando via outro mecanismo que não o usual de antipsicóticos atípicos uma vez que não apresentaram uma alta afinidade pelos receptores D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>.

**Palavras-chave:** esquizofrenia, derivados *N*-benziltiazolidínicos, *climbing* induzido por apomorfina, ensaios de *binding*





## ABSTRACT

Considering the necessity of more effective and safer antipsychotics, having in mind that at least one third of the patients are refractory to treatment, a series of triazol and pyrazol *N*-benzylthiazolidine derivatives were planned by the Therapeutic Innovation Group from UFPe (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1). The aim of this study was to select the derivatives with potential antipsychotic activity through apomorphine-induced climbing and to evaluate their potential extrapyramidal side-effects and neurotoxicity by catatonia and rota-rod tests, as well as verify their receptor affinity profile through binding assays. **Methods:** Brain from adult male Wistar rats was used for *in vitro* assays. Binding assays for D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors were performed using [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2, [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT and [<sup>3</sup>H]-ketanserin, respectively. Adult male CF1 mice were used for *in vivo* assays. All compounds (30 mg/kg, p.o.) were tested in apomorphine-induced climbing, and only the active compounds were submitted to catatonia and rota-rod tests. The doses were chosen based on results from *N*-phenylpiperazine isosters. **Results:** All derivatives have low affinities for D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors since at 10 μM they did not cause any significant binding inhibition to these sites except FPY-3 that presents a moderate affinity for 5-HT<sub>2A</sub> receptor. Results from *in vivo* tests showed that FPT-2, FPT-4 and FPY-3 inhibited climbing. They did not induce any catatonic sign, neither impaired rota-rod performance. Among them, FPY-3 was chosen to continue the study. A climbing dose-response study (5, 15 and 30 mg/kg, p.o.) indicated 15 mg/kg as the minimal effective dose. FPY-3 did not affect any parameter observed in the open field (crossings, rearings and groomings) at the highest dose demonstrating that it does not present sedative effect at this dose. **Conclusion:** These results demonstrated that FPT-2, FPT-4 and FPY-3 are active on climbing behavior induced by apomorphine, a model of schizophrenia positive symptoms, without affecting motor coordination, making them promising molecules for antipsychotic development. Furthermore as they did not present high affinities for D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors they could be acting by other mechanism than usual atypical antipsychotics.

**Keywords:** schizophrenia, *N*-benzylthiazolidine derivatives, climbing induced by apomorphine, binding assays.



---

## 1. INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

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).

A descoberta de novos agentes terapeuticamente úteis é o objeto de estudo da química medicinal. Esta pode ser definida como uma área de conhecimento que engloba aspectos da química, ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cujo foco está no planejamento, identificação e preparação de substâncias farmacologicamente ativas, bem como na interpretação de seu mecanismo de ação em nível molecular e na construção de relações entre estruturas químicas e atividades biológicas (estudos de REA) (WERMUTH *et al.*, 1996; WILLIAMS E LEMKE, 2002).

Diversas estratégias podem ser utilizadas quando do planejamento de novas moléculas candidatas a fármacos. A principal é aquela baseada no mecanismo de ação pretendido, também denominada de abordagem fisiológica. Esta estratégia fundamenta-se no conhecimento prévio dos processos fisiológicos e das alterações envolvidas na desordem em questão. Com base nestas informações, busca-se selecionar o melhor alvo-terapêutico capaz de aliviar os sintomas ou curar a enfermidade (GANELLIN, 1991; WILLIAMS E LEMKE, 2002; PATRICK, 2005; 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 por estudos do metabolismo, ou pelo emprego da hibridação molecular e do bioisosterismo. Este último está envolvido na introdução de modificações estruturais em um composto-protótipo, objetivando sua otimização, seja farmacocinética ou farmacodinâmica. Essa técnica

tem permitido a identificação de novos derivados terapeuticamente úteis, por otimização de um composto-protótipo (BARREIRO E FRAGA, 2008; WERMUTH, 2008).

A esquizofrenia é uma doença que acomete cerca de 1% da população, a qual tem a expectativa de vida diminuída em 20% (ELKIS *et al.*, 2008). Estudos demonstram que pelo menos um terço dos pacientes com esquizofrenia são refratários a tratamentos com antipsicóticos (ASCHER-SVANUM *et al.*, 2007).

Existem mais de 20 fármacos antipsicóticos diferentes para uso clínico, mas as diferenças entre eles são pequenas. Os antipsicóticos são divididos em típicos ou de primeira geração, uma denominação mais recente, cujos principais representantes são clorpromazina e haloperidol, e os atípicos ou de segunda geração, como clozapina e risperidona. A distinção entre os grupos típico e atípico depende do perfil do receptor, da incidência de efeitos extrapiramidais (EPS) (menor no grupo atípico), da eficácia (especialmente da clozapina) no grupo de pacientes “refratários ao tratamento” e da eficácia contra sintomas negativos (maior no grupo atípico) (ASCHER-SVANUM *et al.*, 2007; ELKIS E MELTZER, 2007; RANG *et al.*, 2007). Apesar dos antipsicóticos atípicos possuírem menor probabilidade de causar distúrbios de movimento, como EPS, eles estão associados com ganho de peso, elevação de prolactina e glicose e, ainda, sedação.

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 com doses terapêuticas (RANG *et al.*, 2008; STAHL, 2000).

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 e outros efeitos, como aumento de peso (RANG *et al.*, 2008; STAHL, 2000).

Um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos demonstrou que 74% dos pacientes descontinuam o uso com 18 meses de terapia pela baixa tolerabilidade ou pela eficácia incompleta, indicando a necessidade de novas terapias (SNYDER E MURPHY, 2008) que representem alguma vantagem em relação às atuais, tais como a ausência de síndrome metabólica, agranulocitose e sintomas extrapiramidais.

Apesar dos alvos farmacológicos estudados para os antipsicóticos serem, em sua maioria, receptores dopaminérgicos e/ou serotoninérgicos, mais recentemente, tem surgido uma tendência de novos antipsicóticos atuarem sobre a neurotransmissão glutamatérgica (SNYDER E MURPHY, 2008).

Através de uma parceria entre o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da UFRJ e o Grupo de Inovação Terapêutica da UFPe, iniciou-se um projeto que objetiva o planejamento racional, a síntese e a avaliação farmacológica de novos derivados candidatos a fármacos antipsicóticos.

Visando aumentar a diversidade estrutural para buscar novos agentes terapêuticos com maior eficácia e menor incidência de efeitos adversos, o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT – UFPe) sintetizou 9 derivados *N*-benziltiazolidinas (FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPW-1).





---

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desse capítulo foi a avaliação farmacológica de uma série de derivados *N*-benziltiazolidínicos (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1) planejados e sintetizados pelo Grupo de Inovação Terapêutica da UFPe, buscando novas substâncias com potencial utilização para o tratamento da esquizofrenia.

### 2.2 Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos deste projeto:

- Selecionar os derivados com potencial antipsicótico através do modelo de *climbing* induzido por apomorfina;
- Avaliar os derivados ativos em modelos animais preditivos de efeitos extrapiramidais e comprometimento motor: catatonia e rota-rod;
- Avaliar o efeito hipnótico-sedativo dos derivados ativos no modelo de *climbing* induzido por apomorfina, através da avaliação da atividade locomotora espontânea e indução de sono barbitúrico;
- Realizar uma avaliação preliminar da toxicidade aguda dos derivados ativos no teste de *climbing* induzido por apomorfina, através da observação de comportamento e estado físico geral, bem como ganho de massa corporal;
- Investigar o perfil de ligação a receptores *D*<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, através de ensaios de radioligação (*binding*).



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico crônico e incapacitante, uma doença degenerativa de natureza complexa, com manifestações múltiplas e quadros variados. 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 importantes 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 freqüência 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).

## 3.2 Neurobiologia da esquizofrenia

### 3.2.1 Teorias neuroquímicas

#### 3.2.1.1 Esquizofrenia e as hipóteses dopaminérgica e glutamatérgica

A teoria dopaminérgica foi proposta por Carlsson, ganhador do Prêmio Nobel 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 continuado 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), ou, em específico, uma hipoatividade do 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 o 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 NMDA (JENTSCH E ROTH 1999).

Antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA, como fenciclidina, produzem sintomas psicóticos (alucinações, distúrbios do pensamento) em seres humanos, e concentrações reduzidas de glutamato e de densidades do receptor de glutamato foram relatadas 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. LY2140023, em ensaio clínico fase II, foi comparada com Zyprexa® (olanzapina), demonstrando menor eficácia em reduzir sintomas positivos, mas os pacientes não ganharam peso, ao contrário, perderam em média 0,5 kg, indicando que agonistas mGluR podem representar um avanço na pesquisa por antipsicóticos com melhor tolerabilidade. O mecanismo de ação desses mGluR ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que axônios de neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos convergem para neurônios espinais médios do estriado. Além disso, agonistas mGluR2/3 demonstraram inibir a liberação de dopamina, demonstrando uma interconectividade dessas duas vias de neurotransmissores. Ainda, permanece possível que agonistas mGluR2/3 podem, de fato, ter como alvo a via convencional de antagonistas dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>. Alternativamente, mGluR2/3 podem

formar um complexo com receptores 5-HT<sub>2A</sub>, sugerindo que a ativação de mGluR podem 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 favorecem (CEPEDA E LEVINE, 1998; ABI-DARGHAM E LARUELLE, 2005). Assim, tanto as interações glutamato/dopamina quanto as dopamina/glutamato parecem ser relevantes para a fisiopatologia da doença.

### 3.2.1.2 Outras teorias

Outros neurotransmissores que podem ser importantes são a serotonina (5-HT) e a noradrenalina. Muitas substâncias antipsicóticas eficazes além de bloquearem os receptores dopaminérgicos, também atuam como antagonistas do receptor serotoninérgico. A 5-HT tem efeito modulador sobre as vias dopaminérgicas, de modo que as duas teorias não são incompatíveis. A afinidade pelos receptores 5-HT<sub>2A</sub> é uma característica de muitas das substâncias antipsicóticas atípicas, que produzem menos efeitos extrapiramidais que os compostos seletivos dopaminérgicos mais antigos (RANG *et al.*, 2004).

## 3.3 Teorias atuais para a atipicalidade de antipsicóticos

Ainda não se sabe exatamente qual o mecanismo de ação responsável pela diferença clínica vista entre antipsicóticos típicos e atípicos; a determinação de tal mecanismo teria grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos 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<sub>2</sub> (isto é, em D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>), ou mesmo da relação de potência de bloqueio entre eles (por exemplo, D<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>) (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 5-HT<sub>2A</sub> serotoninérgicos, ou mesmo secundário à relação 5-HT<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> (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). Há ainda uma teoria recente que foca exclusivamente no receptor D<sub>2</sub>, a saber, a hipótese da rápida dissociação, a qual propõe que fármacos com dissociação rápida, quando usados em doses que levam ao bloqueio de receptores D<sub>2</sub>, modulam o sistema dopaminérgico de forma a permitir o funcionamento do sistema fisiológico, levando ao efeito antipsicótico atípico, sem precisar invocar atividade em outros receptores (KAPUR E SEEMAN, 2001).

### 3.4 Tratamento da esquizofrenia

As primeiras formas de tratamento da esquizofrenia introduzidas na prática médica foram o eletrochoque, a lobotomia e o choque insulínico. O tratamento farmacológico deste distúrbio teve início somente na década de 50, com a descoberta acidental dos efeitos da clorpromazina. Posteriormente a esta, diversos outros compostos com propriedades farmacológicas semelhantes foram desenvolvidos, dando origem à classe dos neurolépticos, antipsicóticos típicos ou, ainda, antipsicóticos de primeira geração. Mais tarde, surgiram os antipsicóticos atípicos ou de segunda geração. Os antipsicóticos em geral são efetivos contra os sintomas positivos da esquizofrenia; entretanto, os atípicos são mais efetivos que os típicos no controle de sintomas negativos, além de apresentarem menos efeitos extrapiramidais. Os antipsicóticos típicos podem ser dividido em três principais classes químicas: os fenotiazínicos (sendo clorpromazina a principal representante), os tioxantênicos (clorprotixeno) e as butirofenonas (haloperidol). Os antipsicóticos atípicos são, atualmente, preconizados como tratamento de primeira linha na

esquizofrenia. Os principais representantes deste grupo são clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona e aripiprazol. (GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; ELKIS *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação dos antipsicóticos típicos é o bloqueio de receptores de dopamina, mais especificamente os do tipo D<sub>2</sub>. Apesar do grande número de fármacos existentes, ensaios realizados não indicam maior eficácia de antipsicóticos típicos em relação aos atípicos. Diferem, contudo, 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 avaliar os sintomas positivos da esquizofrenia, são pouco eficazes no alívio dos sintomas negativos e cognitivos, além de um percentual de pacientes responderem pouco ou nada a estes medicamentos (GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; GARDNER *et al.*, 2005).

Os antipsicóticos de primeira geração ainda representam uma gama de importantes efeitos adversos. Os chamados efeitos extrapiramidais estão diretamente ligados ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos na via nigro estriatal. Os pacientes podem apresentar quadros de distonia muscular, acatisia, podendo desenvolver Parkinson 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 existentes no mercado conduziu ao desenvolvimento dos antipsicóticos atípicos. Não existe uma definição universal para inclusão de uma substância neste grupo de compostos.

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. Os principais representantes deste grupo são clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona e aripiprazol. Todos eles se caracterizam por apresentar um mecanismo de ação multireceptor, envolvendo a ligação tanto a receptores dopaminérgicos (especialmente D<sub>2</sub>) quanto serotoninérgicos (5-HT<sub>2</sub> e/ou 5-HT<sub>1A</sub>) (CRISMON E DORSON, 1997; GRAEFF *et al.*, 1999; BALDESSARINI E TARAZI, 2001; HIROSE *et al.*, 2004; FARAH, 2005; GARDNER *et al.*, 2005; YAGCIOGLU, 2007).

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. Em relação ao seu mecanismo de ação, apresenta seletividade funcional frente aos receptores dopaminérgicos, como uma maior afinidade pelo subtipo D<sub>4</sub>, além de efeito bloqueador de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<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).

Além disso, outros antipsicóticos atípicos também apresentam efeitos adversos limitantes de sua utilização terapêutica. A utilização crônica de olanzapina e quetiapina 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, ziprazidona e olanzapina pode levar ao desenvolvimento de efeitos extrapiramidais com o aumento da dose (OWENS, 1996; FARAH, 2005).

O aripiprazol, um antipsicótico que vem sendo chamado de antipsicótico de terceira geração, possui um perfil de efeitos adversos caracterizado por menor ganho de peso, menor sedação e ausência de elevação de prolactina quando comparado a outros antipsicóticos. Atua como agonista parcial de receptores  $D_2$  e possui uma afinidade pelo receptor  $D_2$  4 a 20 vezes menor do que haloperidol, clorpromazina ou outros antipsicóticos típicos. Além disso, apresenta atividade agonista parcial nos receptores  $5HT_{1A}$  e antagonismo em receptores  $5HT_{2A}$ . A maioria dos receptores  $5HT_{1A}$  no neocórtex localiza-se em neurônios piramidais glutamatérgicos. Esses receptores possuem ação inibitória, o que reduziria a ação glutamatérgica excitatória. Acredita-se que parte do controle dos episódios de mania no paciente poderiam ser devido a esse controle nas vias de projeção glutamatérgicas. Entretanto, seu custo elevado exige apoio governamental para que a população menos favorecida possa utilizá-lo (SOUZA *et al.*, 2004; MAMO *et al.*, 2007).

Mais recentemente, têm surgido os agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo R2/R3 (mGluR2/3) que, além de parecerem mais seguros que os antipsicóticos atípicos atuais, podem apresentar uma melhora em efeitos cognitivos e melhor tolerabilidade. Esse mecanismo parece tão promissor que grandes empresas farmacêuticas, como Eli Lilly, Merck, Johnson & Johnson e Pfizer estão competindo na busca de fármacos para tratar esquizofrenia com alvo nesses receptores (SNYDER E MURPHY, 2008).

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

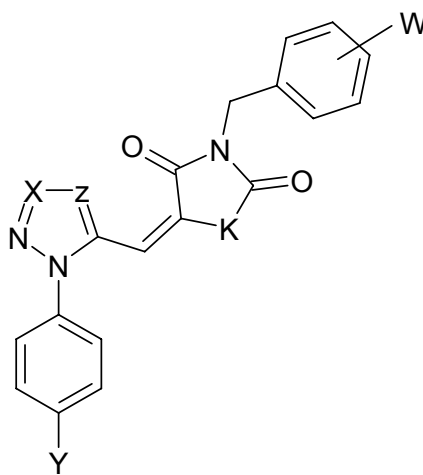




## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparação dos derivados

A preparação em escala de miligramas e multigramas dos compostos 1,2,3-triazólicos e pirazólicos funcionalizados com a subunidade *N*-benziltiazolidina foi realizada pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT) da UFPe. A estrutura geral destes derivados está apresentada na figura 1. Os métodos de preparação e as estruturas moleculares são sigilosos.



**Figura 1.** Estrutura geral dos derivados *N*-benziltiazolidínicos, objeto desta proposta.

### 4.2 Animais

Foram utilizados camundongos CF1, machos, adultos (20 - 30 g), provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS) e ratos Wistar, machos, adultos (200 - 250 g) provenientes de PAULINHA Animais de Laboratório (ANILAB-SP). 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.

### **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. Imediatamente após a finalização dos experimentos, camundongos foram submetidos isoladamente à eutanásia pelo método de deslocamento cervical, enquanto que os ratos foram sacrificados com guilhotina para retirada das estruturas cerebrais de interesse. As carcaças foram acondicionadas em embalagem plástica apropriada e armazenadas em freezer a - 20 °C até o recolhimento (semanal) da Aborgama do Brasil.

Os protocolos experimentais aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (projeto nº 2007975).

### **4.4 Tratamentos**

Os camundongos foram tratados com volume igual a 1mL/100g de massa corporal pela via oral, nas doses de 5, 15 ou 30 mg/kg e com 1mL/200g de massa corporal pela via subcutânea. Todos os grupos experimentais foram constituídos de 08 a 12 animais. O tamanho amostral foi calculado utilizando o programa estatístico Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®), considerando um valor de alfa de 0,05, poder do teste de 0,8 e o teste a ser utilizado em cada experimento. Como parâmetros para as diferenças entre médias e desvios padrão esperados foram utilizados as referências bibliográficas citadas em cada experimento proposto.

Para utilização nos ensaios biológicos, FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1 foram suspensos em solução salina acrescida de polissorbato 80 (Tween 80®) 1%. As demais drogas e fármacos foram dissolvidos

diretamente em solução salina ou suspensos com auxílio de polissorbato 80 1% e aparelho de ultra-som, quando necessário.

#### 4.5 Drogas e Fármacos

As substâncias FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1 foram sintetizadas e caracterizadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- $H^1$ ) pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT – UFPe). Todas foram mantidas em recipientes fechados, em dessecador.

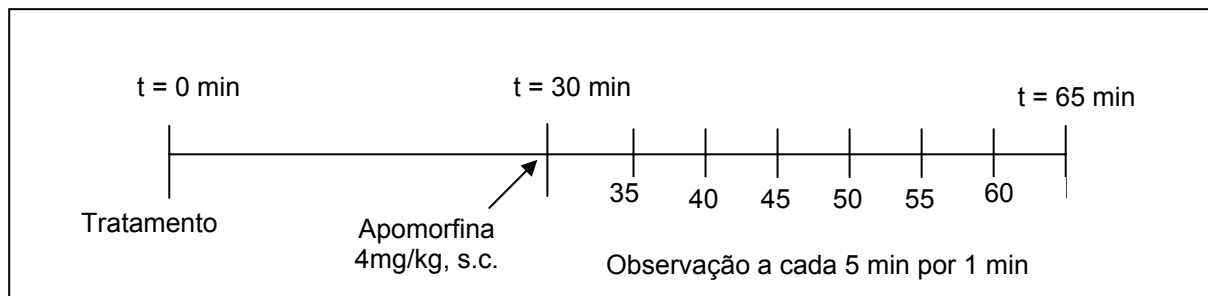
Outras drogas e fármacos utilizados foram: apomorfina (Aldrich®), haloperidol (Galena®), clozapina (Leponex®), e pentobarbital sódico (Cristália®), em grau farmacêutico.

#### 4.6 Testes comportamentais

##### 4.6.1 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, ângulo da escalada, presença de escalada contínua ou intermitente e presença ou ausência de estereotipia. Todos esses parâmetros contabilizados geram um índice de *climbing*, o qual é avaliado para fins estatísticos.

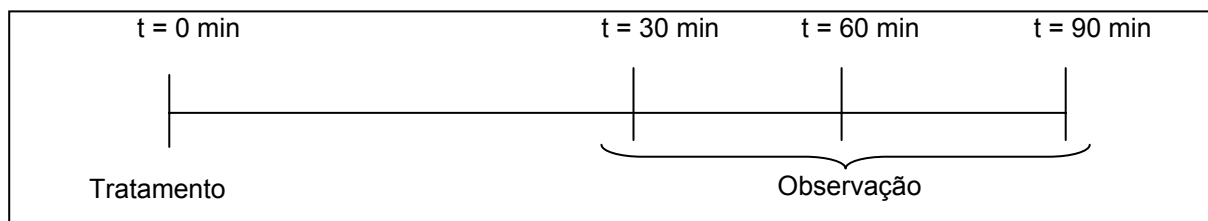


**Esquema 1.** Esquema de tratamento utilizado no experimento de bloqueio do comportamento de escalada (*climbing*) induzido por apomorfina em camundongos com a administração de substâncias teste por via oral.

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

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

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.). 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.

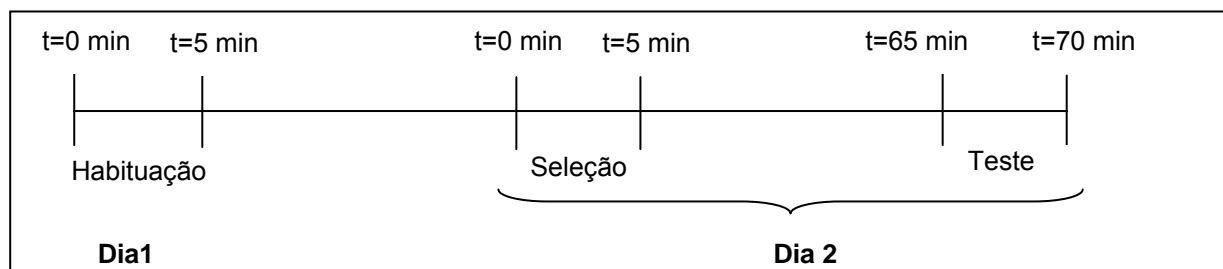


**Esquema 2.** Esquema de tratamento utilizado no experimento de indução de catatonia em camundongos com a administração de substâncias teste por via oral.

#### 4.6.3 Avaliação do efeito sobre a coordenação motora em aparelho de rota-rod (LOPEZ-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 a substância teste, veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (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.



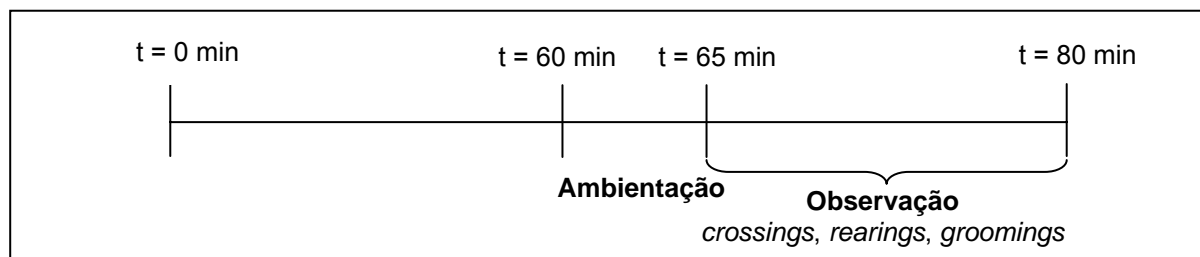
**Esquema 3.** Esquema de tratamento utilizado no experimento de avaliação do efeito sobre a coordenação motora de camundongos com a administração de substâncias teste por via oral.

#### 4.6.4 Avaliação da Atividade Locomotora Espontânea – Teste de Exposição ao Campo Aberto (*Open Field*) (WILLIANSO *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 a substância teste 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

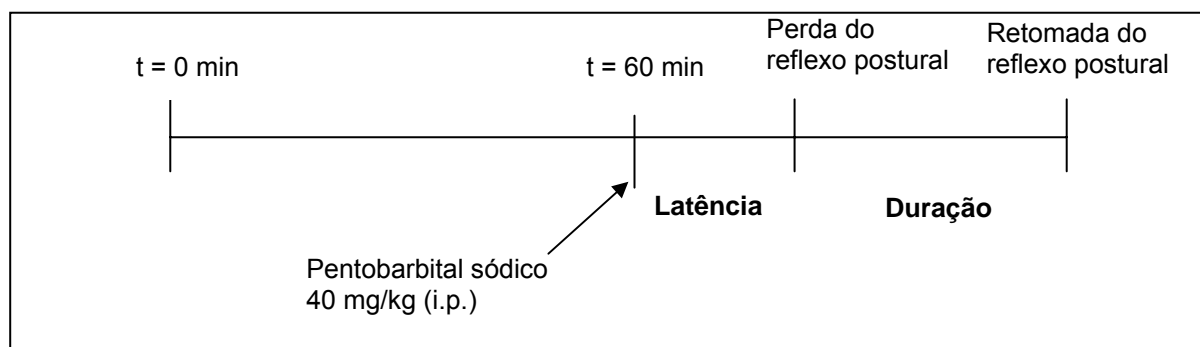
comportamentos de auto-limpeza (*groomings*). Todo procedimento foi realizado em ambiente de penumbra.



**Esquema 4.** Esquema de tratamento utilizado no experimento de avaliação da atividade locomotora espontânea de camundongos com a administração de substâncias teste por via oral.

#### 4.6.5 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 a substância teste, veículo (1mL/100g, v.o.), haloperidol (0,5 mg/kg, v.o.) ou clozapina (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 de indução (latência) e 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.



**Esquema 5.** Esquema de tratamento utilizado no experimento de potenciação do sono barbitúrico de camundongos com a administração de substâncias teste por via oral.

#### 4.6.6 Observação de comportamento e estado físico (LAPA *et al.*, 2003)

A avaliação preliminar da toxicidade aguda foi feita através da observação de comportamento geral. Camundongos foram tratados com a substância teste (30

mg/kg, v.o.) ou veículo (1mL/100g, v.o.) e observados durante 2h sem interrupções. Decorrido esse período, os animais foram observados nos tempos 6h e 12h após a administração dos tratamentos e, diariamente, por um período de 14 dias. Computou-se a frequência de mortes e observou-se a ocorrência de sinais de toxicidade, tais como: piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, locomoção, hipotermia (animais juntos no canto da caixa), tônus muscular, tremores, paralisia dos membros posteriores, salivação, secreção brônquica, convulsões. Também foi realizado um controle de ganho de massa corporal ao longo dos 14 dias.

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

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular junto ao Departamento de Farmacologia Básica e Clínica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob supervisão do Prof. Dr. François Noël. Este laboratório é registrado no CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) como área para uso de radioisótopos (Processo: 104147/70; Matrícula: 12740).

##### *4.7.1 Radioligantes e drogas*

Para os ensaios *in vitro* foram utilizados os seguintes radioligantes: [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (82,7 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (170,2 Ci/mmol) e [<sup>3</sup>H]-cetanserina (67 Ci/mmol) provenientes da New England Nuclear Life Science Products, EUA. Tartarato de cetanserina, pargilina hidrocloreada, prazosina hidrocloreada, serotonina hidrocloreada e (-)-sulpirida foram adquiridos da Sigma, São Paulo, Brasil.

As substâncias teste e (-)-sulpirida foram dissolvidas em DMSO, enquanto a prazosina foi dissolvida em etanol e os sais em água Mili-Q para fins de obtenção de solução estoque. Diluições subsequentes foram preparadas em tampão de incubação. Na concentração final, DMSO e etanol não apresentam efeito sobre os ensaios de *binding*.

#### 4.7.2 Preparação do tecido

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

Estriado foi homogeneizado em Potter de Teflon a  $4^{\circ}\text{C}$  a 20 volumes por grama de tecido de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo  $\text{MgCl}_2$  8mM e EDTA 5 mM. A suspensão resultante foi ultracentrifugada (ultracentrífuga Beckman, rotor SW28,  $r_{\text{máx}}=11,82$  cm) a  $48000 g_{\text{av}}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. O pellet foi ressuspenso em 20 volumes de tampão e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para remoção de neurotransmissores endógenos. Essa suspensão foi esfriada no gelo e ressuspendida 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  $4^{\circ}\text{C}$  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 (centrífuga Hettich, rotor 1415,  $r_{\text{máx}}=10,2$  cm) duas vezes a  $900 g_{\text{max}}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram juntados e ultracentrifugados a  $48000 g_{\text{av}}$  por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em tampão e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Posteriormente, essa suspensão foi esfriada no gelo e ultracentrifugada duas vezes ( $48\ 000 g_{\text{av}}$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ). O pellet final foi ressuspenso 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.

#### 4.7.3 Ensaio de radioligação a receptores $D_2$ -like (NIZNIK *et al.*, 1985; TERAJ *et al.*, 1989 ; HAMDJ *et al.*, 1992 ; ASSIÉ *et al.*, 1993)

Para a determinação da ligação dos compostos aos receptores de dopamina do tipo  $D_2$ -like, os homogenatos das estruturas de interesse, corpo estriado (50  $\mu\text{g}$



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.

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

Foi determinada a ligação dos compostos aos receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>. Os homogenatos das estruturas de interesse, hipocampo (50 µg de proteína), foram incubados 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.

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

Para a determinação da ligação dos compostos aos receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, os homogenatos das estruturas de interesse, córtex total (150 µg proteína), foram incubados 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).

#### **4.8 Análise Estatística**

Para a realização das análises estatísticas pertinentes a cada ensaio farmacológico foi utilizado o *software* Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation ®). Aceitou-se o nível de significância  $p < 0,05$  (USER'S MANUAL, 1997).

---

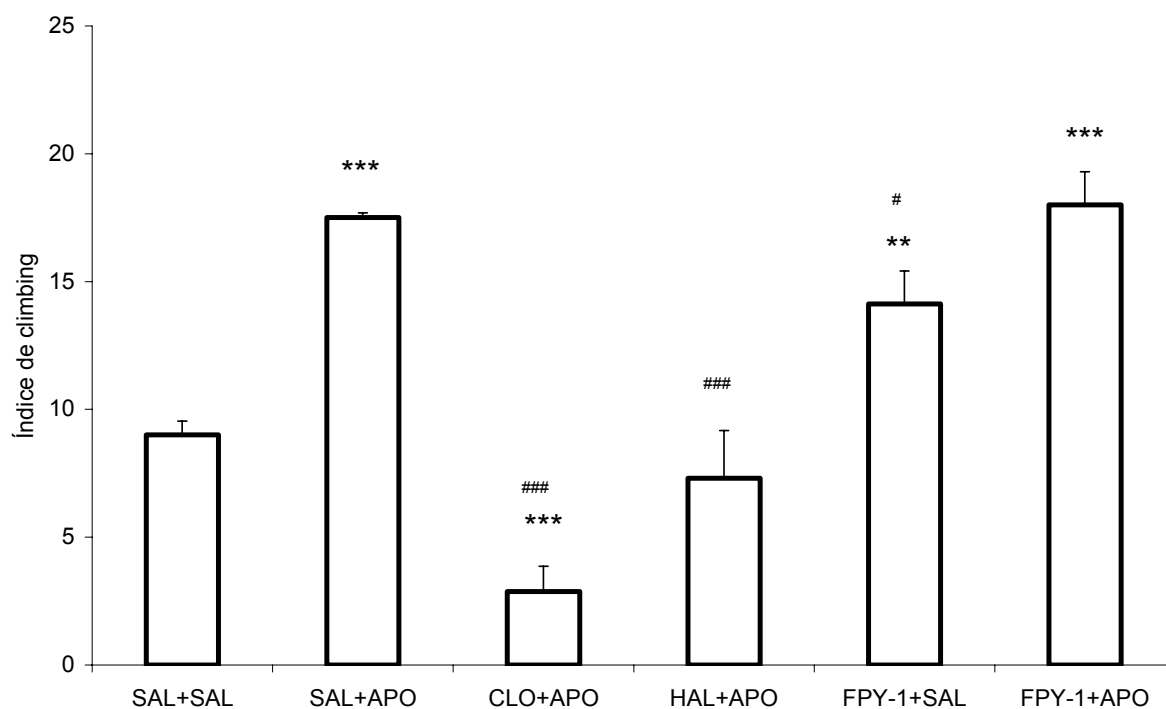
## **5. RESULTADOS**



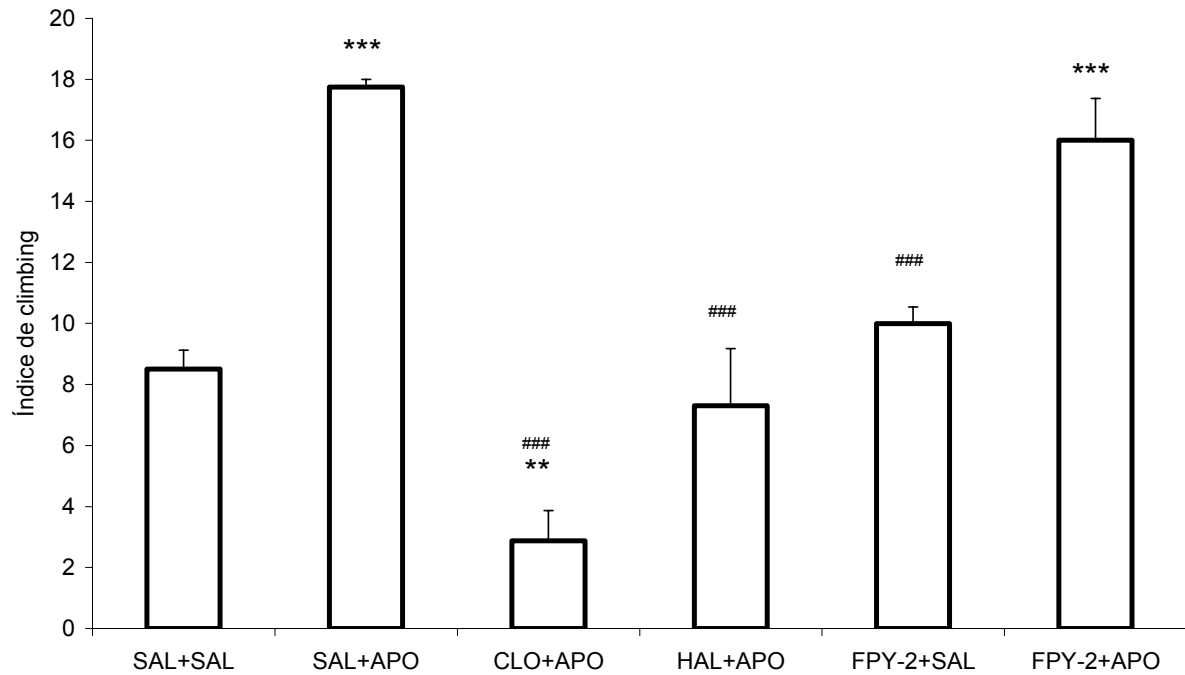
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Triagem das substâncias candidatas a antipsicóticos: Bloqueio do comportamento de escalada (*climbing*) induzido por apomorfina

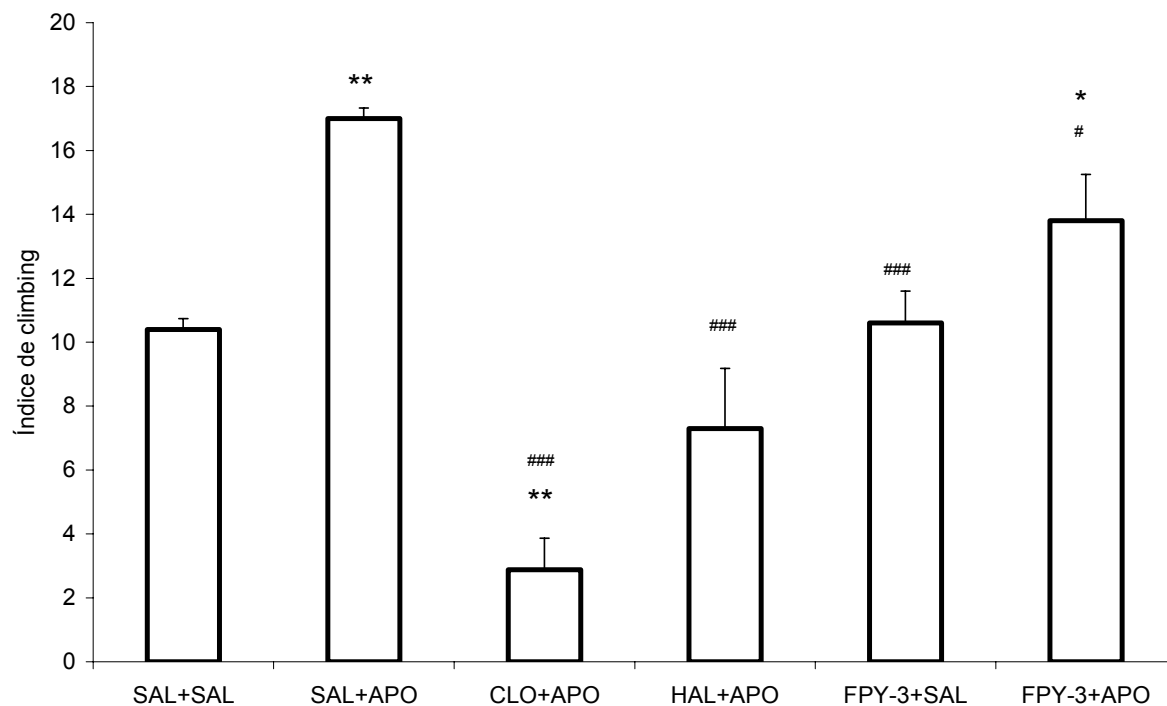
Dentre as substâncias estudadas, FPY-3 (figura 4), FPT-2 (figura 8), e FPT-4 (figura 9) inibiram *climbing* induzido por apomorfina, demonstrando o potencial antipsicótico dessas substâncias. FPY-1 induziu *climbing per se*, enquanto as demais substâncias, quando administradas com solução salina 0,9% s.c., não alteraram o índice de *climbing* (figuras 2, 3, 5, 6, 7, 10). Não houve diferença estatisticamente significativa na magnitude do efeito de redução do comportamento de *climbing* induzido por apomorfina entre as substâncias, FPT-2, FPT-4 e FPY-3 (Figura 11).



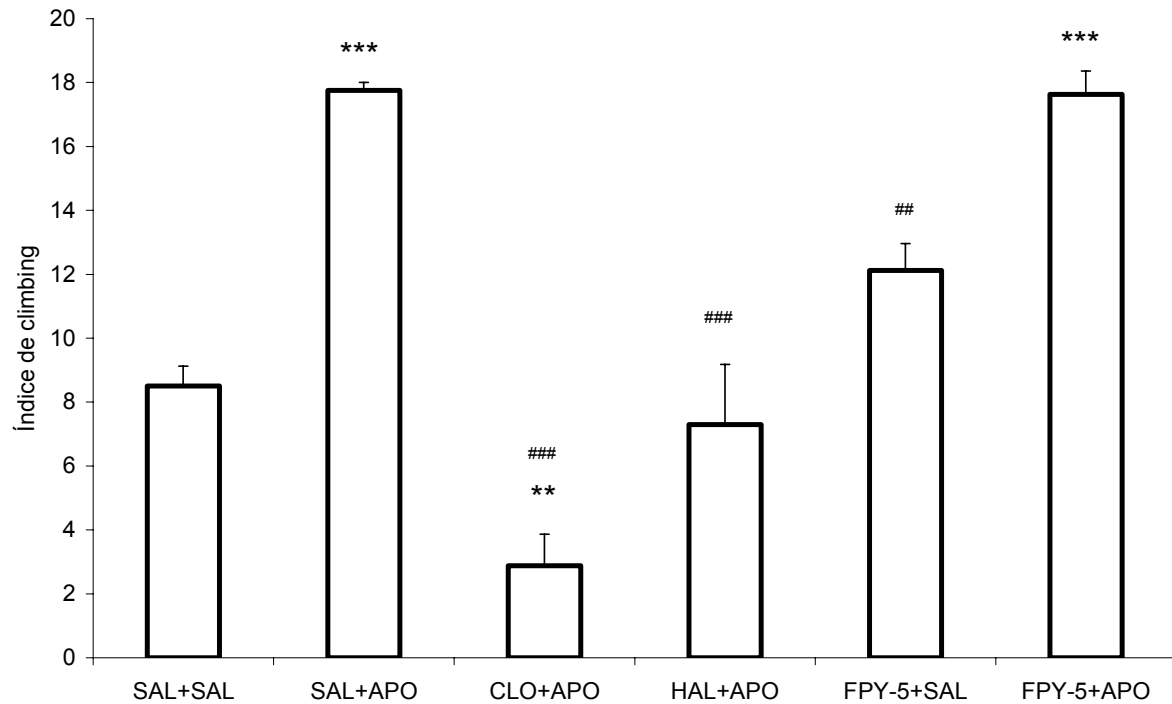
**Figura 2.** Efeito de FPY-1 (30 mg/kg, n=08), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,49}=22,853$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .



**Figura 3.** Efeito de FPY-2 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,59}=15,741$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .

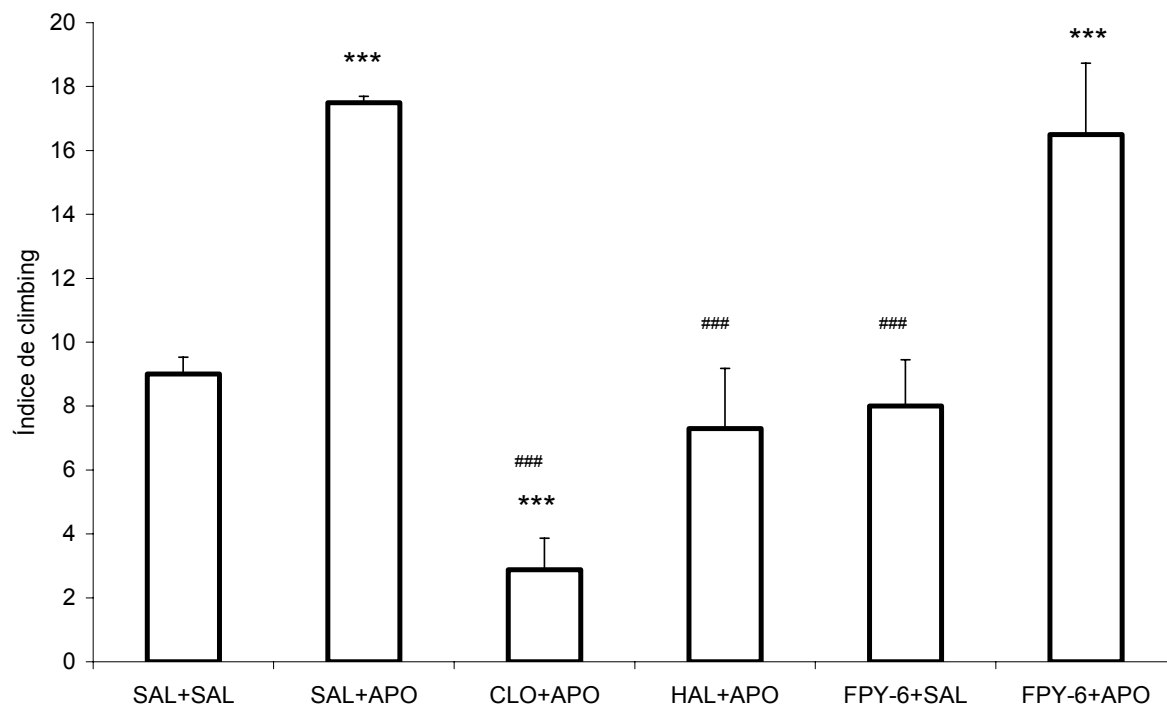


**Figura 4.** Efeito de FPY-3 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,53}=16,190$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .

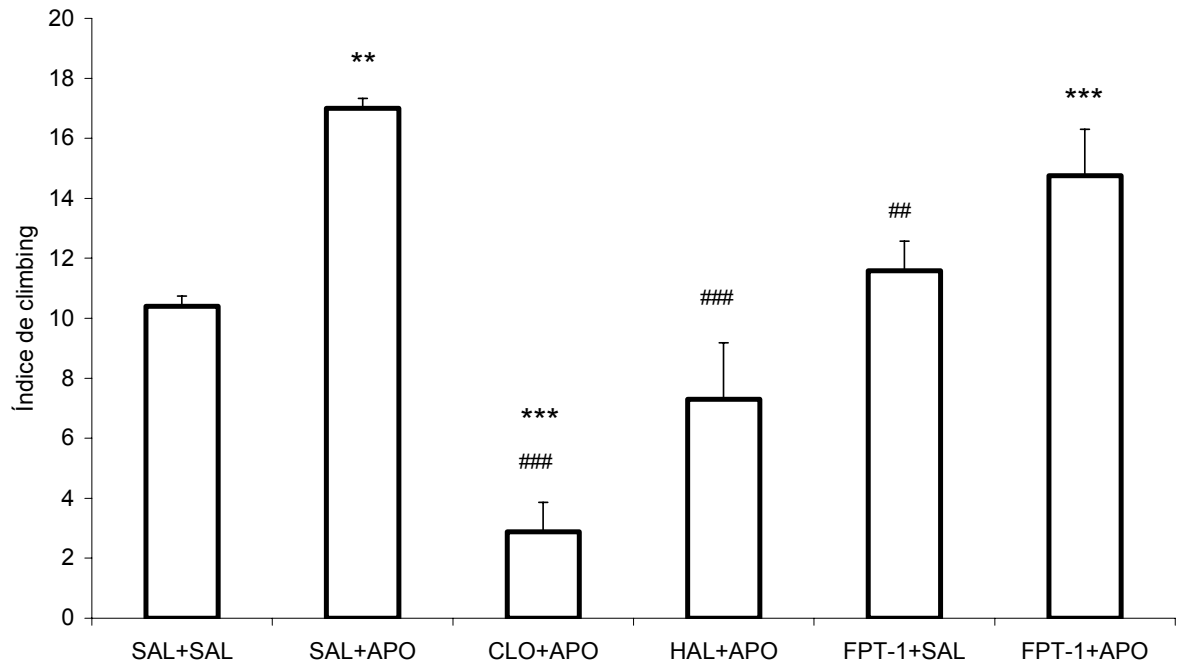


**Figura 5.** Efeito de FPY-5 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,59}=15,747$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .

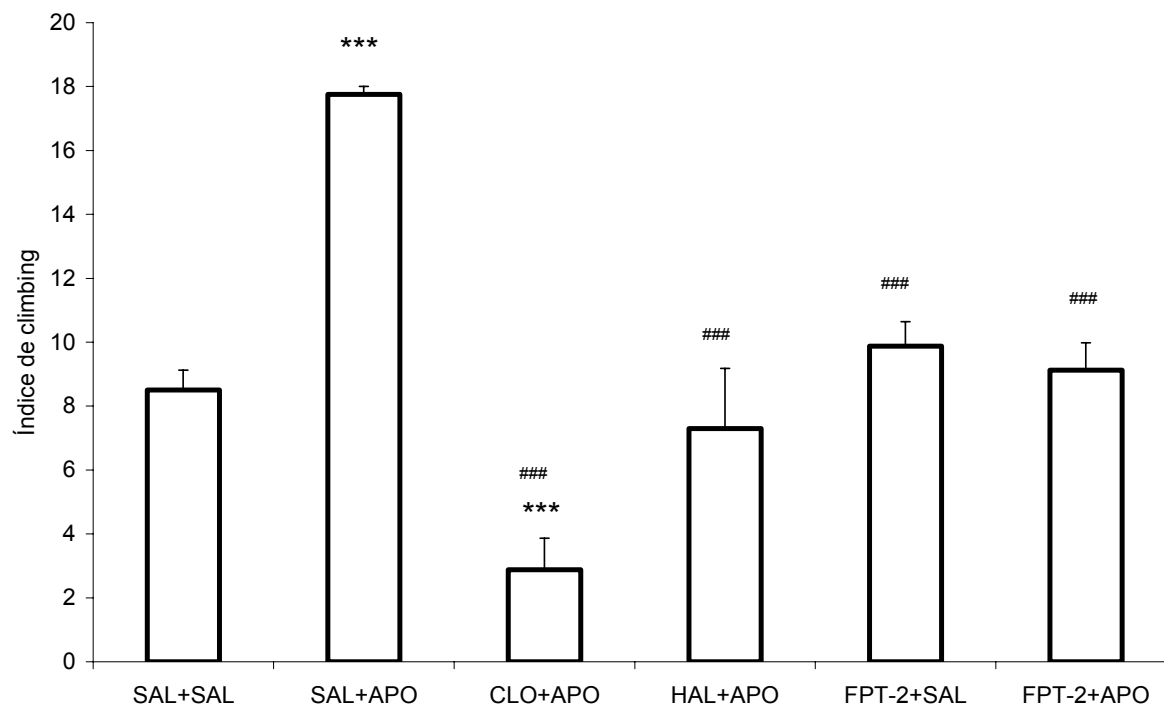




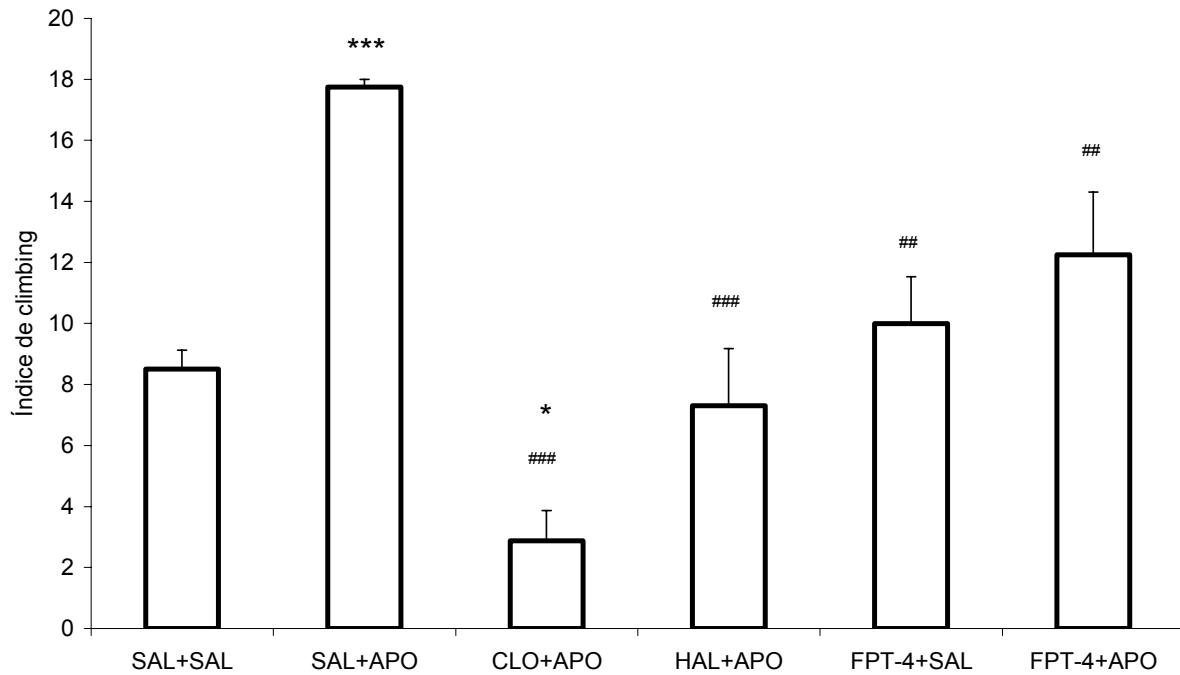
**Figura 6.** Efeito de FPY-6 (30 mg/kg, n=08), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,49}=14,575$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .



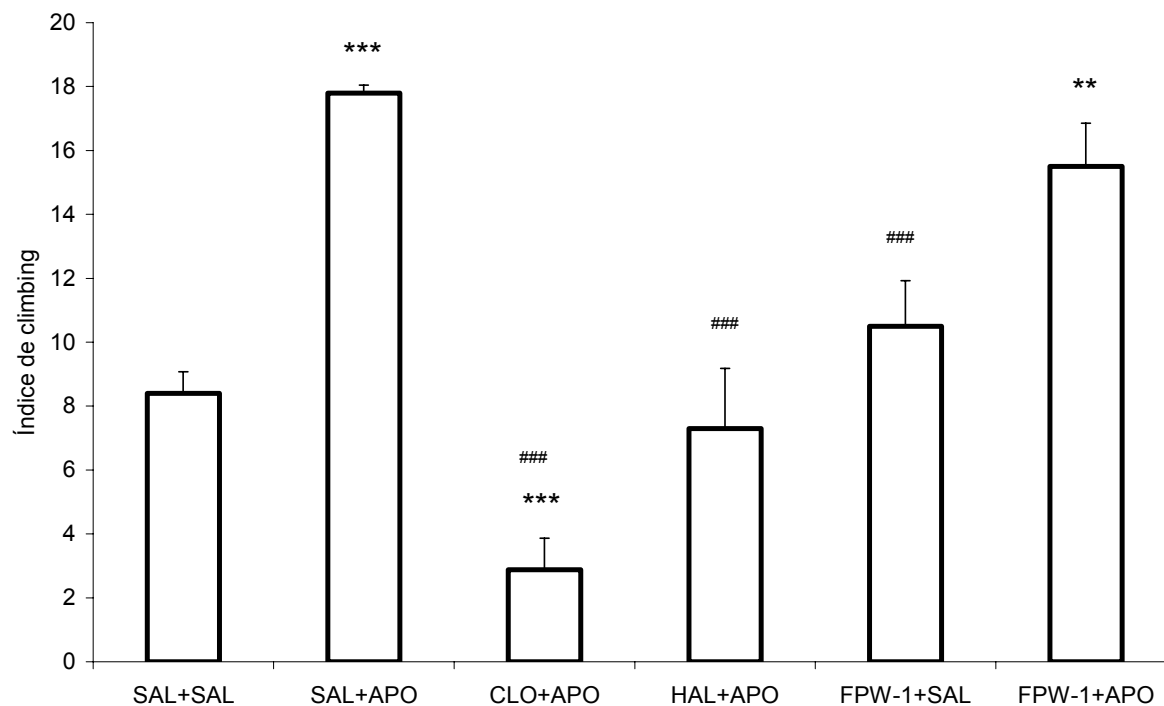
**Figura 7.** Efeito de FPT-1 (30 mg/kg, n=12), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,61}=16,006$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .



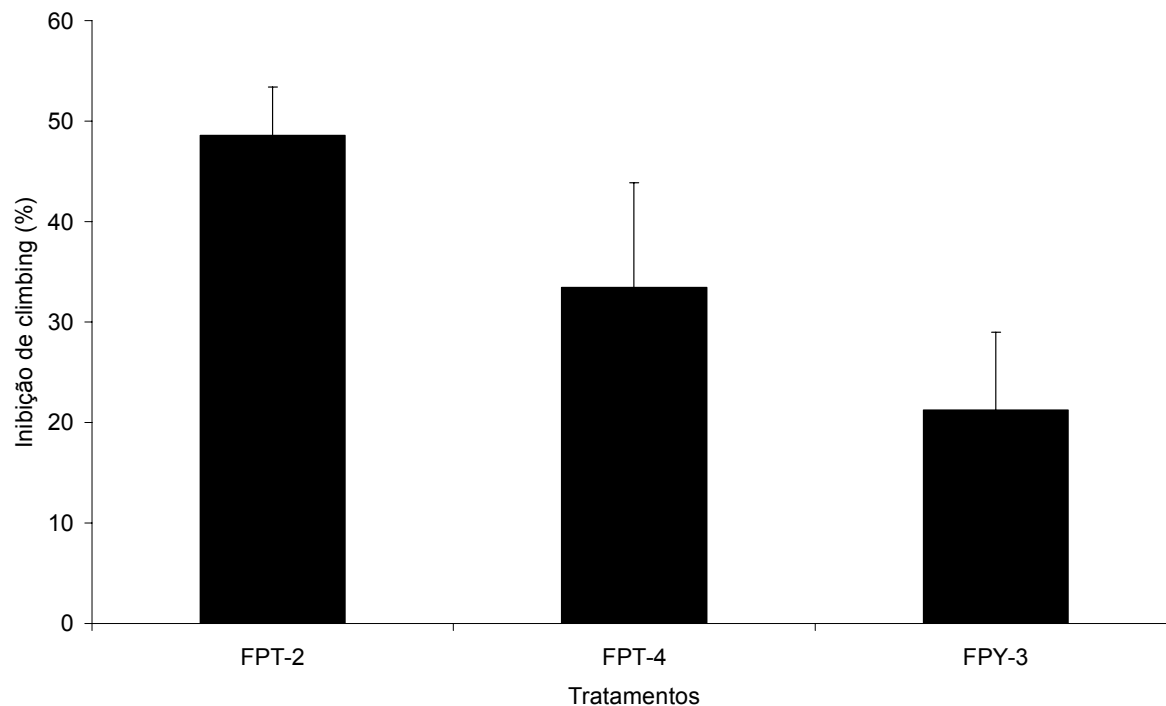
**Figura 8.** Efeito de FPT-2 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,59}=13,260$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .



**Figura 9.** Efeito de FPT-4 (30 mg/kg, n=08), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,49}=11,912$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .



**Figura 10.** Efeito de FPW-1 (30 mg/kg, n=10), no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{5,57}=17,105$ ;  $p<0,001$ ). Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Diferença significativa em relação ao grupo SAL+APO # $p<0,05$ ; ## $p<0,01$ ; ### $p<0,001$ .

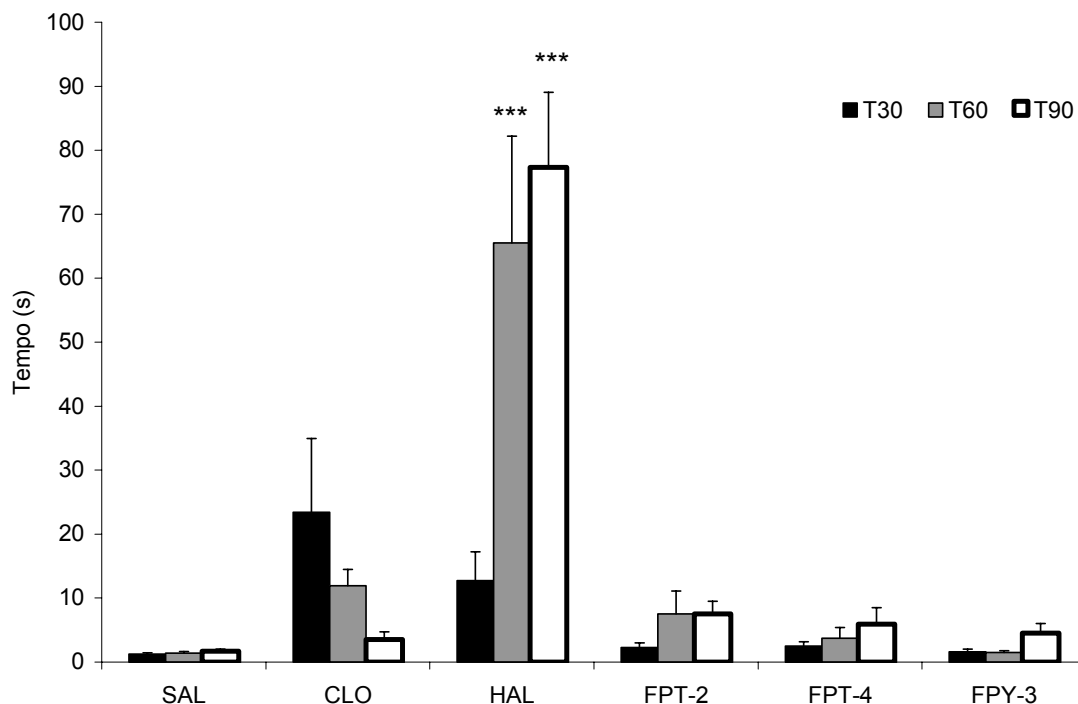


**Figura 11.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: percentual de inibição de climbing. Tratamentos: FPT-2 (FPT-2 30 mg/kg, v.o., n=8), FPT-4 (FPT-4 30 mg/kg, v.o., n=10), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=10). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{2,26}=1,374$   $p=0,272$ ).

## 5.2 Avaliação de distúrbios motores

### 5.2.1 Indução de catatonia

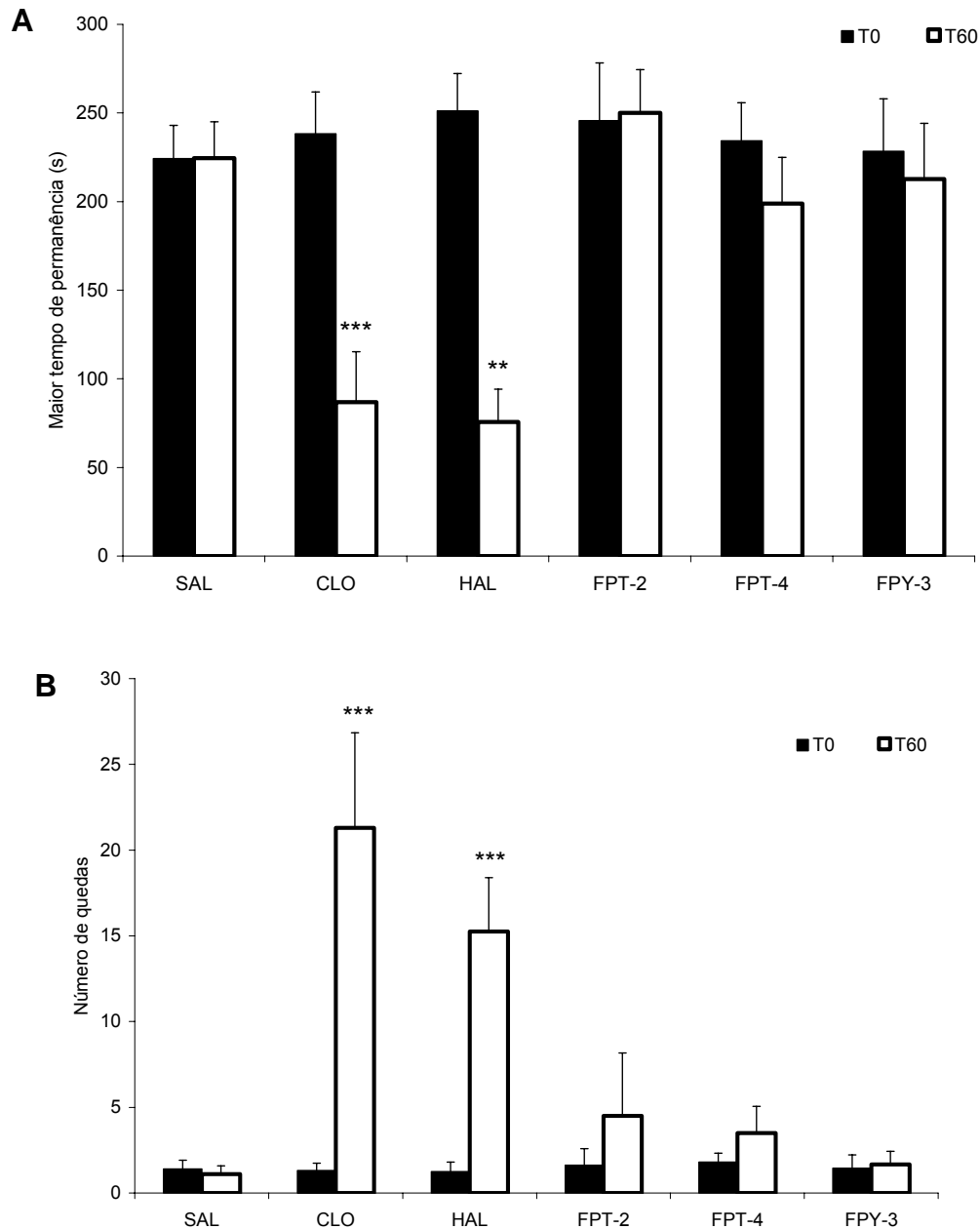
Os compostos FPT-2, FPT-4 e FPY-3, quando administrados pela via oral, não induziram catatonia nos animais na dose de 30 mg/kg em nenhum dos tempos avaliados (Figura 12).



**Figura 12.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste indução de catatonia. Avaliação: 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) minutos após o tratamento. Tratamentos: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, v.o. n=10), FPT-2 (FPT-2 30 mg/kg, v.o., n=10), FPT-4 (FPT-4 30 mg/kg, v.o., n=10), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=10), HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, v.o., n=10), CLO (clozapina 15 mg/kg, v.o., n=10). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*diferença significativa em relação ao grupo SAL. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student-Newman-Keuls: fator tratamento  $F_{5,179}=18.523$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{2,179}=7.687$   $p<0.001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{10,179}=11.309$   $p<0,001$ ).

### 5.2.2 Avaliação do efeito sobre a coordenação motora em aparelho de rota-rod

Quando administrados pela via oral, nenhum dos compostos avaliados, FPT-2, FPT-4 e FPY-3, interferiram na coordenação motora dos camundongos, o que pode ser evidenciado pelo fato dessas substâncias não alterarem de forma significativa o maior tempo de permanência (figura 13A) e o número de quedas (figura 13B) dentro do período de observação de 5 minutos, quando comparadas aos controles.

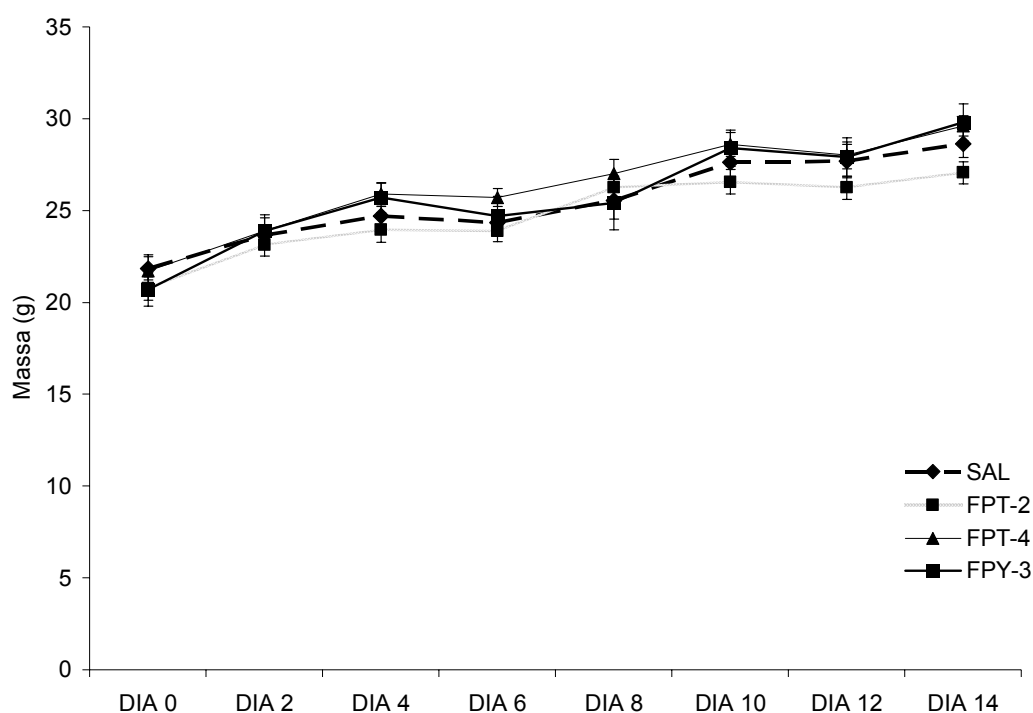


**Figura 13.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de avaliação da coordenação motora em aparelho de rota-rod. Tratamentos: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, v.o. n=10), FPT-2 (FPT-2 30 mg/kg, v.o., n=8), FPT-4 (FPT-4 30 mg/kg, v.o., n=10), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=9), HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, v.o., n=10), CLO (clozapina 15 mg/kg, v.o., n=10). A) Parâmetro: maior tempo de permanência. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*diferença significativa em relação ao grupo SAL em T60. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student-Newman-Keuls: fator tratamento  $F_{5,109}=3.000$   $p=0.019$ ; fator tempo  $F_{1,109}=20.334$   $p<0,001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{5,109}=5.374$   $p<0,001$ ). B) Parâmetro: número de quedas. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. (\*diferença significativa em relação ao grupo SAL em T60. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student-Newman-Keuls: fator tratamento  $F_{5,109}=6.257$   $p<0,001$ ; fator tempo  $F_{1,109}=27.512$   $p<0,001$ ; interação tempo x tratamento  $F_{5,109}=8.405$   $p<0,001$ ).



### 5.3 Observação de comportamento e estado físico

A administração única de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 na dose de 30 mg/kg, não induziu sinais de toxicidade (piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, locomoção, hipotermia, tônus muscular, tremores, paralisia dos membros posteriores, salivação, secreção brônquica e convulsões) ao longo de 14 dias de observação. Esses compostos também não afetaram o ganho de massa corporal dos animais (Figura 14).

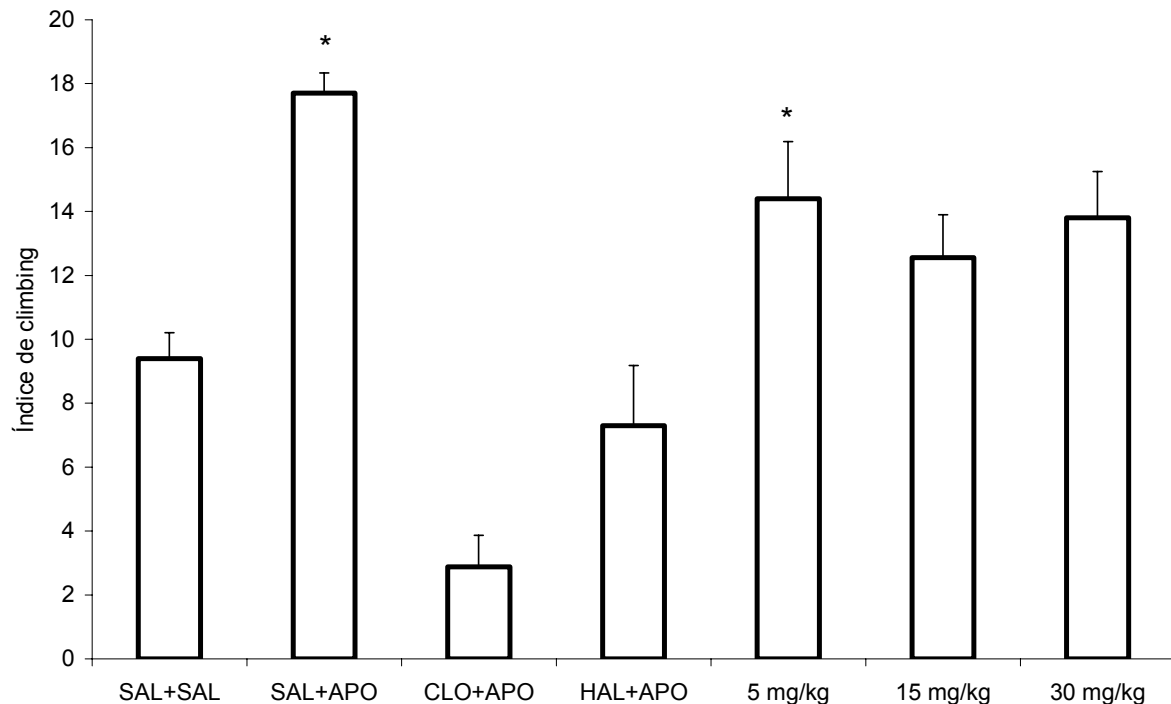


**Figura 14.** Efeito de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 no teste de toxicidade aguda. Parâmetro: controle de ganho de massa corporal. Tratamentos: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, v.o. n=10), FPT-2 (FPT-2 30 mg/kg, v.o., n=8), FPT-4 (FPT-4 30 mg/kg, v.o., n=10), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=10). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA de duas vias com medidas repetidas *post hoc* Student-Newman-Keuls: fator tratamento  $F_{3,327}=0,938$   $p=0,432$ ; fator dia  $F_{7,327}=83,989$   $p<0,001$ ; interação dia x tratamento  $F_{21,327}=0,991$   $p=0,475$ ).

## 5.4 Avaliação farmacológica de FPY-3

### 5.4.1 Estudo de dose-resposta

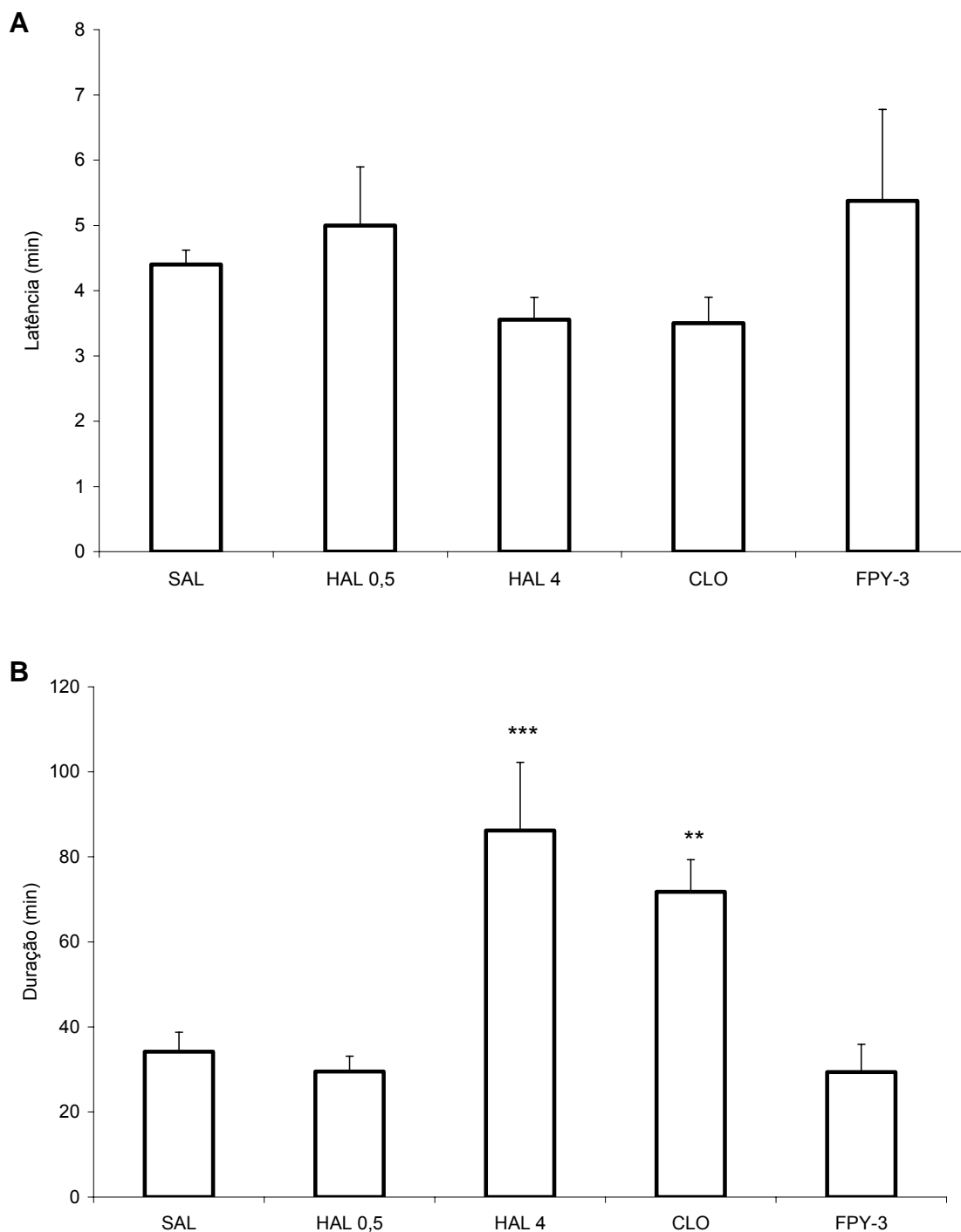
FPY-3 inibiu significativamente o comportamento de escalada induzido por apomorfina nas doses de 15 e 30 mg/kg, v.o.; porém, não foi capaz de inibir *climbing* na dose de 5 mg/kg (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito de FPY-3+APO no modelo de escalada induzido por apomorfina. Parâmetro: índice de *climbing*. Tratamentos v.o.: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, n=10), FPY-3 (FPY-3+APO 5, 15 e 30 mg/kg, n=8-10), CLO (clozapina 15 mg/kg, n=8), HAL (haloperidol 0,5 mg/kg, n=10). Tratamentos s.c.: SAL (salina + vitamina C 1mg/mL), APO (apomorfina 8 mg/kg). Resultados expressos em média ± erro padrão. ANOVA *post hoc* Dunnett: Diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL \*p<0,05.

### 5.4.2 Teste de Potenciação do Sono Barbitúrico

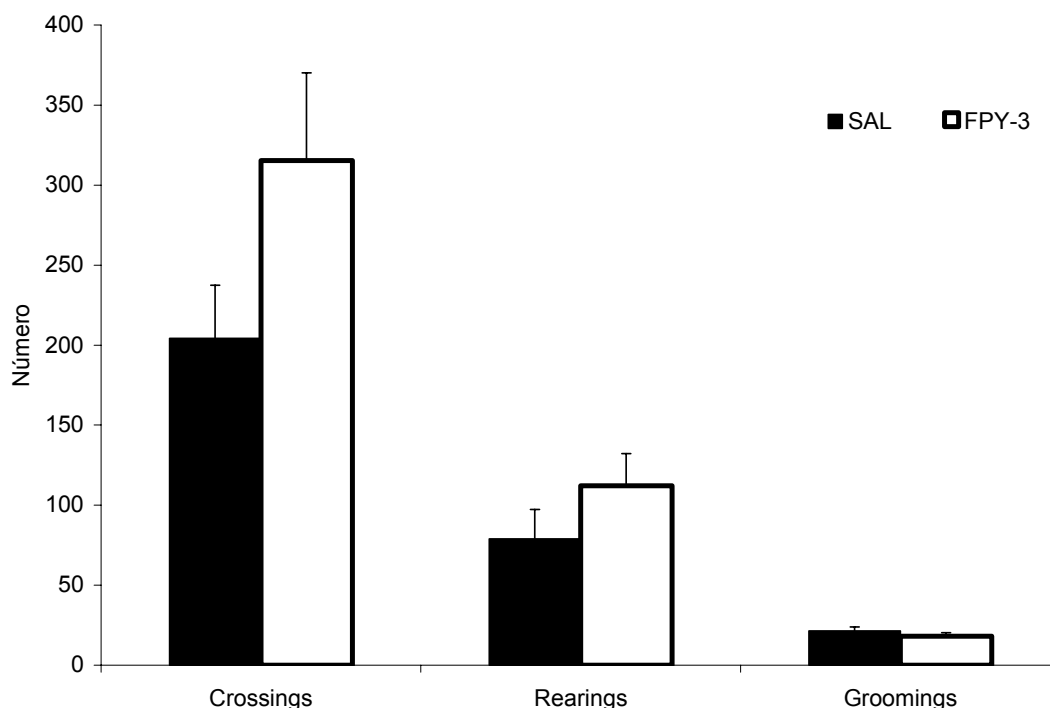
O composto FPY-3 não alterou de forma significativa nem a latência (figura 16A), nem a duração do sono barbitúrico (figura 16B), na maior dose efetiva no *climbing* (30 mg/kg, v.o.).



**Figura 16.** Efeito de FPY-3 no teste de potenciação do sono barbitúrico. Tratamentos: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, v.o. n=10), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=10), CLO (clozapina 15 mg/kg, v.o. n=10), HAL 0,5 (haloperidol 0,5 mg/kg, v.o., n=10), HAL 4 (haloperidol 4 mg/kg, v.o., n=9). A) Latência pra o sono. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{4,46}=1,284$   $p=0,292$ ). B) Duração do sono. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls ( $F_{4,46}=9,671$   $p<0,001$ ).

### 5.4.3 Avaliação da Atividade Locomotora Espontânea – Teste de Exposição ao Campo Aberto (Open Field)

FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) não alterou de forma significativa nenhum dos parâmetros observados: número de *crossings*, *rearings* e *groomings* (Figura 17), assim como o número de bolos fecais (dados não apresentados).



**Figura 17.** Efeito de FPY-3 no teste de exposição ao campo aberto em um período de observação de 15 minutos. Parâmetros: número de *crossings*, *rearings* e *groomings*. Tratamentos: SAL (salina + polissorbato 80 1% 1 mL/100g, v.o. n=8), FPY-3 (FPY-3 30 mg/kg, v.o., n=8). Resultados expressos em média ± erro padrão. Teste t-Student.

### 5.5 Ensaio *in vitro*

Os percentuais de inibição da ligação aos receptores avaliados podem ser verificados na tabela 1. Não foi possível determinar o valor de  $CI_{50}$  dessas moléculas, exceto FPT-2 e FPY-3 para o receptor 5-HT<sub>2A</sub>, uma vez que elas precipitam na maior concentração de *screening* (10  $\mu$ M) e seus valores de  $CI_{50}$  encontram-se acima dessa concentração. Assim, podemos observar uma baixa

afinidade dessas substâncias pelos receptores avaliados ou mesmo a falta de afinidade pelos mesmos.

**Tabela 1:** Percentual de inibição da ligação aos receptores na maior concentração de *screening* (10  $\mu$ M).

<b>Substâncias</b>	<b>D<sub>2</sub>-like</b>	<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	<b>5-HT<sub>2A</sub></b>
FPY-1	6%	8%	8%
FPY-2	15%	0,2%	13%
FPY-3	10%	3%	Ki = 7,284 $\mu$ M
FPY-5	9%	5%	9%
FPY-6	5%	13%	8%
FPT-1	8%	21%	10%
FPT-2	11%	NA	Ki = 23,898 $\mu$ M
FPT-4	12%	16%	11%
FPW-1	5%	28%	0%

NA: não avaliado



---

## **6. DISCUSSÃO**





## 6. DISCUSSÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil farmacológico de nove novos derivados *N*-benziltiazolidínicos (FPY-1, FPY-2, FPY-3, FPY-5, FPY-6, FPT-1, FPT-2, FPT-4, FPW-1) visando um novo composto antipsicótico. Primeiramente, todas as substâncias foram avaliadas em um modelo animal preditivo de eficácia no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia: teste de *climbing* induzido por apomorfina. Os compostos ativos foram, então, submetidos a dois modelos animais de comprometimento motor: catatonia e rota-rod. Ainda, foram realizados ensaios de *binding* aos receptores envolvidos na neurofisiologia da esquizofrenia. Por fim, a molécula disponível em maior quantidade (FPY-3) foi testada em testes usuais para avaliação de efeito hipnótico-sedativo e, também, submetida a um estudo com diferentes doses, visando à definição da menor dose efetiva no modelo de *climbing*.

O comportamento de *climbing* está relacionado com a estimulação da neurotransmissão dopaminérgica através da ativação direta de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (MOORE E AXTON, 1988) ou através da modulação da liberação de dopamina por glutamato (STAHL, 2007). Todas as substâncias foram avaliadas usando uma dose única (30 mg/kg, v.o.), eleita como dose de *screening* baseada em resultados anteriores do nosso grupo (NEVES, 2009; NEVES *et al.*, 2008). Apenas FPT-2, FPT-4 e FPY-3 foram capazes de bloquear o comportamento de *climbing*, demonstrando potencial antipsicótico. FPY-1 induziu *climbing per se*, sugerindo que essa substância é capaz de ativar a neurotransmissão dopaminérgica, atividade que poderá ser explorada para o desenvolvimento de candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento de outras doenças, tais como Parkinson e disfunção erétil.

O modelo de *climbing* induzido por apomorfina não diferencia antipsicóticos típicos de atípicos, ou seja, ambos são capazes de antagonizar o comportamento de *climbing* (COSTALL *et al.*, 1978). Esse modelo está baseado na indução por apomorfina de um estado hiperdopaminérgico no animal. Ainda, é um modelo clássico ligado à agitação motora, um dos sintomas positivos da esquizofrenia, e conseqüentemente pode responder também a substâncias que induzem prejuízos motores (COSTALL *et al.*, 1978; WEISS E KILTS, 1998; GEYER E ELLENBROEK, 2003).

Apesar de não ser um modelo comportamental para detecção de atividade antipsicótica, o teste de catatonía é válido para estudar a neurofarmacologia de funções extrapiramidais e como modelo rápido para prever efeitos motores de fármacos antipsicóticos (SANGBERG *et al*, 1988; MOORE E GERSHON, 1989; WEISS E KILTS, 1998). Nesse estudo, FPT-2, FPT-4 e FPY-3, substâncias selecionadas no modelo de *climbing*, foram avaliadas no teste de catatonía (30 mg/kg, v.o.) e não causaram efeitos extrapiramidais.

Esse perfil pode ser comparado aos antipsicóticos de segunda geração, os quais apresentam sintomas extrapiramidais apenas em doses superiores àquelas que induzem *climbing*, como risperidona e olanzapina (OWENS, 1996; FARAH, 2005). Consequentemente, FPT-2, FPT-4 e FPY-3 foram selecionados para uma caracterização farmacológica adicional.

Para avaliar melhor os efeitos motores dessas substâncias, FPT-2, FPT-4 e FPY-3 foram testados no teste de rota-rod na dose de 30 mg/kg, v.o., e não alteraram nenhum dos parâmetros observados, demonstrando a ausência de comprometimento motor dessas substâncias, nessa dose.

A avaliação preliminar da toxicidade aguda de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 foi realizada através da observação do comportamento e estado físico geral, após a administração de uma única dose (30 mg/kg, v.o.), sendo que nenhuma alteração foi registrada, assim como o ganho de massa corporal dos animais não foi afetado em um período de observação de 14 dias.

FPY-3 foi selecionado para a ampliação dos estudos por ser a substância com maior facilidade de síntese, no momento. A atividade locomotora espontânea foi avaliada na dose de 30 mg/kg, v.o. Os animais não apresentaram nenhuma alteração dos parâmetros motores e exploratórios observados, como número de *crossings*, *rearings* e *groomings*. Diferentes doses dessa substância (5, 15 e 30 mg/kg, v.o.) foram testadas no modelo de *climbing* induzido por apomorfina. A dose mínima efetiva foi 15 mg/kg. A determinação do efeito máximo e/ou da dose que determina 50% do efeito máximo (DE<sub>50</sub>) depende de estudos a serem realizados com uma faixa mais ampla de doses. Os mesmos não foram realizados no âmbito dessa Dissertação pela restrição da quantidade de substância disponível.

Além de comprometimento motor, sedação é também um efeito adverso induzido por fármacos antipsicóticos. Todos os antipsicóticos de primeira geração induzem efeitos sedativos em pacientes (BALDESSARINI E TARAZI, 2001). Além disso, um estudo de meta-análise comparando diferentes tratamentos para esquizofrenia, concluiu que clozapina, quetiapina e zotepina são mais sedativos que haloperidol, enquanto aripiprazol foi significativamente menos sedativo (LEUCHT *et al.*, 2009). FPY-3 (30 mg/kg, v.o.) não afetou nem a latência, nem o tempo de sono barbitúrico, indicando que, nessa dose, essa substância não possui um efeito hipnótico ou depressor central importante.

Os resultados obtidos nos ensaios de radioligação demonstraram que, com exceção de FPT-2 e FPY-3, essas substâncias não apresentam afinidade pelos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos estudados ou, ainda, possuem uma afinidade tão baixa que não pode ser quantificada, devido ao fato das substâncias precipitarem na maior concentração de *screening* (10  $\mu$ M). FPT-2 e FPY-3 apresentaram afinidade moderada pelo receptor 5-HT<sub>2A</sub>, sugerindo potencial atividade antidepressiva, uma vez que antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> podem produzir efeitos antidepressivos (STEFANSKI E GOLDBERG, 1997) e alguns antipsicóticos, como a olanzapina, são capazes de diminuir sintomas depressivos em pacientes esquizofrênicos (TOLLEFSON, *et al.*, 1998).

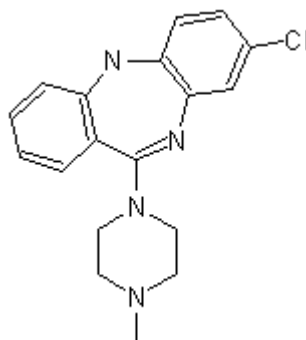
Algumas explicações para a falta de afinidade *in vitro* dessas substâncias pelos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos, ao mesmo tempo em que se mostram efetivas contra sintomas positivos da esquizofrenia *in vivo*, podem ser levantadas.

Uma primeira explicação relaciona-se ao alvo biológico. Essas substâncias poderiam estar atuando via neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que estudos indicam uma interação dos sistemas neurotransmissores dopaminérgico e glutamatérgico. Antagonistas NMDA são capazes de modular a atividade dopaminérgica via receptores NMDA e inibir o comportamento de *climbing* induzido por apomorfina, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica pode modular a função dopaminérgica em nível pós-sináptico (KIM *et al.*, 1996; JANG E LEE, 2001). O mesmo não é verificado com antagonistas de receptores AMPA (VANOVER, 1998). Ainda, a administração sistêmica de antagonistas não competitivos NMDA

como a fenciclidina ou a cetamina induz sintomas positivos e negativos bem como prejuízos cognitivos em indivíduos saudáveis e exacerbam os mesmos sintomas em pacientes esquizofrênicos (BAKSHI E GEYER, 1997; JENTSCH E ROTH, 1999; TSAI E COYLE, 2002). Além disso, fármacos antipsicóticos com alvo em receptores metabotrópicos glutamatérgicos estão sendo desenvolvidos e podem representar uma oportunidade para uma nova classe de medicamentos, assim como um avanço no entendimento de bases moleculares das desordens psiquiátricas (SNYDER E MURPHY, 2008).

Outra explicação possível relaciona-se às características estruturais das moléculas. A afinidade e a especificidade da ligação micromolécula-sítio receptor são determinadas por interações intermoleculares, as quais compreendem forças eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes. No pH fisiológico, os aminoácidos presentes nos biorreceptores se encontram ionizados, podendo interagir com fármacos que apresentem grupos carregados negativa ou positivamente, respectivamente. As propriedades físico-químicas de determinados grupamentos funcionais são de fundamental importância na fase farmacodinâmica e farmacocinética da ação dos fármacos, etapa de reconhecimento molecular, uma vez que a afinidade de um fármaco pelo seu biorreceptor é dependente do somatório das forças de interação dos grupamentos farmacofóricos com sítios complementares de biomacromoléculas (BARREIRO E FRAGA, 2008).

Antipsicóticos, como a clozapina (**1**), possuem um anel piperazínico com um átomo de nitrogênio (*N*-metila) conferindo basicidade à molécula. A ionização deste nitrogênio parece ser crucial para o reconhecimento da ligação aos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos, sugerindo ser ele o grupamento farmacofórico da molécula (PHILLIPS *et al.*, 1995; LIÉGEOIS *et al.*, 2002). As benziltiazolidinonas estudadas nessa Dissertação possuem os elétrons do nitrogênio envolvidos na ligação amídica, diminuindo assim, sua basicidade. Collins e colaboradores (1999) demonstraram que uma diminuição na basicidade do heterociclo na troca de uma piperazina por uma piperidina reduziu a afinidade pelos receptores dopaminérgicos e, também, por canais iônicos.



(1)

Agonistas dopaminérgicos, para se ligarem ao receptor, precisam de um grupamento hidroxila os quais formam pontes com o hidrogênio do resíduo de serina presente no receptor D<sub>2</sub>, de acordo com o modelo tetraédrico. Entretanto, a fenciclidina (PCP) não possui esse grupamento e se liga ao receptor com alta afinidade (K<sub>i</sub> = 4 nM), possivelmente através da interação do grupamento fenil hidrofóbico da PCP com os aminoácidos hidrofóbicos do receptor D<sub>2</sub>. Porém, a fenciclidina *meta* hidroxilada tem sua potência de ligação ao receptor D<sub>2</sub> aumentada em duas vezes quando comparada à PCP, o que fortalece a importância do modelo tetraédrico de encaixe ao receptor D<sub>2</sub> (SEEMAN, 2009). As substâncias benziltiazolidindinonas estudadas não apresentam grupamento hidroxila, o que poderia ser uma das explicações pela falta de afinidade aos receptores D<sub>2</sub>.

Outra hipótese seria a de que os efeitos de FPT-2, FPT-4 e FPY-3 observados *in vivo* poderiam estar ligados à presença de metabólitos, como pode ser verificado para os metabólitos de alguns antipsicóticos, como clozapina. Um estudo que comparou os efeitos de clozapina com seu principal metabólito, *N*-desmetilclozapina (NDMC), verificou uma complexa interação entre clozapina e NDMC no sítio de interação dos receptores, principalmente receptores D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>, onde NDMC atua como um agonista parcial e clozapina como um agonista inverso (LAMEH *et al.*, 2007; MENDONZA E LINDENMAYER, 2009). Outro estudo que comparou a interação dos fármacos fluvoxamina e clozapina *in vivo* e *in vitro* demonstrou que a avaliação *in vitro* nem sempre reflete as alterações reais que ocorrem *in vivo* com o fármaco. Nem sempre estudos *in vitro* conseguem prever consequências clínicas observadas em pacientes nem alterações nas concentrações plasmáticas do fármaco ou de seus metabólitos (CHANG *et al.*, 1999).

Os resultados discutidos até então caracterizam FPT-2, FPT-4 e FPY-3 como compostos promissores como antipsicóticos com uma farmacologia pré-clínica preditiva de efeitos no alívio de sintomas positivos da esquizofrenia, sem a indução de efeitos extrapiramidais. Entretanto, os resultados *in vitro* pouco explicam os resultados obtidos *in vivo*. É possível que essas substâncias atuem via um mecanismo distinto dos antipsicóticos de primeira e segunda geração, que parecem agir primariamente sobre a neurotransmissão monoaminérgica. Assim, a modulação de outros alvos moleculares (receptores, enzimas, canais iônicos) ou sistemas neurotransmissores (glutamatérgico, por exemplo) não pode ser descartada.

---

## **7. CONCLUSÕES**





## 7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que entre os compostos testados, os derivados *N*-benziltiazolidínicos triazólicos, FPT-2 e FPT-4, e pirazólicos, FPY-3, são ativos no modelo de *climbing* induzido por apomorfina em doses que apresentam uma baixa tendência para causar catatonía e comprometimento motor. Dessa forma, essas substâncias mostraram-se promissoras para inclusão em estratégias de desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia. Além disso, podem ser uma perspectiva de fármacos antipsicóticos com alvo biológico distinto do sistema monoaminérgico, uma vez que não apresentaram uma alta afinidade pelos receptores *D*<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>. Ainda, os derivados FPY-1 e FPY-3 apresentaram propriedades farmacológicas que os caracterizam como substâncias promissoras para o estudo direcionado a outros empregos terapêuticos, como tratamento de Parkinson e disfunção erétil ou depressão, respectivamente.



---

## **8. REFERÊNCIAS**



## 8. REFERÊNCIAS

ABI-DARGHAM, A.; GIL, R.; KRISTAL, 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.

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.

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.

BARREIRO, E.J. E FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2 ed., 2008.

BAKSHI, V.P.; GEYER, M. Phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition of startle are blocked by prazosin, an  $\alpha$ -1 noradrenergic antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 283: 666-674, 1997.

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

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.

CHANG, W.H.; AUGUSTIN, B.; LANE, H.Y.; ZUMBRUNNEN, T.; LIU, H.C.; KAZMI, Y.; JANN, M.J. In-vitro and in-vivo evaluation of the drug-drug interaction between fluvoxamine and clozapine. **Psychopharmacology** 145 : 91–98, 1999.

COLLINS, I.; ROWLEY, M.; DAVEY, W.B.; EMMS, F.; MARWOOD, R.; PATEL, S.; PATEL, S.; FLETCHER, A.; RAGAN, I.C.; LEESON, P.D.; SCOTT, A.L.; BROTON, T. 3-(1-Piperazinyl)-4,5-dihydro-1H-benzo[g]indazoles: High affinity ligands for the human dopamine D4 receptor with improved selectivity over ion channels. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 6: 743-753, 1998.

CONRADO, D.J.; VERLI, H.; NEVES, G.; FRAGA, C.A.M.; 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: 699-707, 2008.

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

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

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.

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.

GANELLIN, C.R. General approaches to discovering new drugs: an historical perspective. In: GANELLIN, C.R. E ROBERTS, S.M. (Ed.) **Medicinal Chemistry – the Role of Organic Chemistry in Drug Research**. Londres: Academic Press, 1991.

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.

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

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.

JANG, C.G.; LEE, S.Y. NMDA-type glutamatergic modulation in dopaminergic activation measured by apomorphine-induced cage climbing behaviors. **Archives of Pharmacal Research** 24(6): 613-617, 2001.

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.

KIM, H.S.; RHEE, G.S.; JUNG, J.Y.; LEE, J.H.; JANG, C.G.; PARK, W.K. Inhibition by noncompetitive NMDA receptor antagonists of apomorphine-induced climbing behavior in mice. **Life Sciences** 58(17): 1397-1402, 1996.

KNABLE, M.B.; WEINBERGER, D.R. Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology** 11: 123-131, 1997.

KOTTER R. Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum. **Progress in Neurobiology** 44: 163-196, 1994.

KRYSTAL, J.H.; KARPER, 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.

LAMEH, J.; BURSTEIN, E.S.; TAYLOR, E.; WEINER, D.M.; VANOVER, K.E.; BONHAUS, D.W. Pharmacology of N-desmethylozapine. **Pharmacology & Therapeutics** 115: 223-231, 2007.

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.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Porto Alegre: Metrópole, 2003.

LEUCHT, S.; CORVES, C.; ARBTER, D.; ENGEL, R.R.; LI, C.; DAVES, J.M. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. **Lancet** 373: 31-41, 2009.



LEYSEN, J.E.; NIEMEGEREERS, 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.

LIÉGEOIS, J.F.; EYROLLES, L.; ELLENBROEK, B.A.; LEJEUNE, C.; CARATO, P.; BRUHWYLER, J.; GÉCZY, J.; DAMAS, J.; DELARGE, J. New Pyridobenzodiazepine Derivatives: Modifications of the Basic Side Chain Differentially Modulate Binding to Dopamine (D<sub>4.2</sub>, D<sub>2L</sub>) and Serotonin (5-HT<sub>2A</sub>) Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry** 45: 5136-5149, 2002.

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-HT<sub>1B</sub> 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.

MAMO, D.; GRAFF, A.; MIZRAHI, R.; SHAMMI, C.M.; ROMEYER, F.; KAPUR, S. Differential effects of aripiprazole on D<sub>2</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, and 5-HT<sub>1A</sub> 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.

MENDONZA, M.C.; LINDENMAYER, J.P. N-Desmethylclozapine: Is There Evidence for its Antipsychotic Potential? **Clinical Neuropharmacology** 32(3): 154-157, 2009.

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

MOORE, N.C.; GERSHON, S. Which atypical antipsychotics are identified by screening tests? **Clinical Neuropharmacology** 12: 167-184, 1989.

MOORE, N.A.; AXTON, M.S. Production of climbing behavior in mice requires both D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor activation. **Psychopharmacology** 94: 263-266, 1988.

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.

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.; 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.

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.

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

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

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.

PHILLIPS, S.T.; DE PAULIS, T.; NEERGAARD, J.R.; BARON, B.M.; SIEGEL, B.W.; SEEMAN, P.; VAN TOL, H.H.; GUAN, H.C.; SMITH, H.E. Binding of 5H-dibenzo[a,d]cycloheptene and dibenz[b,f]oxepin analogues of clozapine to dopamine and serotonin receptors. **Journal of Medicinal Chemistry** 38(4): 708-714, 1995.

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.

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.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

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.

SANGBERG, P.R.; BUNSEY, M.D.; GIORDANO, M.; NORMAN, A. The catalepsy test : its ups and downs. **Behavioral Neuroscience** 102: 748-759, 1988.

SEEMAN, P.; CORBETT, R.; VAN TOL, H.H. Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. **Neuropsychopharmacology** 16: 93-110, 1997.

SEEMAN, P. Glutamate and dopamine components in schizophrenia. **Journal of Psychiatry and Neuroscience** 34(2): 143-149, 2009.

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

SOUSA, P.L.R.; HORTA, B.L.; PINHEIRO, R.T.; NUNES, M.L.T. Aripiprazol e Síndrome de Tourette. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 26(3): 211-215, 2004.

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

STAHL, S.M. **Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications** 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

STEFANSKI, R.; GOLDBERG, S.R. Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists-potential in the treatment of psychiatric disorders. **Drug Therapy** 5: 388-409, 1997.

STRANGE, P.G. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. **Pharmacological Reviews** 53: 119-133, 2001.

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.

TOLLEFSO, G.H.; SANGER, T.M.; LU, Y.; THIEME, M.E. Depressive signs and symptoms in schizophrenia – a prospective blinded trial of olanzapine and haloperidol. **Archives of General Psychiatry** 55: 250-258, 1998.

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

User's Manual. SigmaStat<sup>®</sup> 2.0 for Windows<sup>®</sup>. United States of America: ImageStream<sup>®</sup> Graphics & Presentation Filters, 1997.

VANOVER, K.E. Effects of AMPA receptor antagonists on dopamine-mediated behaviors in mice. **Psychopharmacology** 136: 123-131, 1998.

WEISS, J.M.; KILTS, C.D. Animal models of depression and schizophrenia. In: Schatzberg A F and Nemeroff C B (1998). Textbook of Psychopharmacology 2 ed. **American Psychiatric Press**, Washington.

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

WERMUTH, C.G. **The practice of Medicinal Chemistry** 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.

WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. Foy's principles of Medicinal Chemistry 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

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

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

## ***CAPÍTULO II***

New functionalized *N*-phenylpiperazine derivatives, LASSBio-1412 and LASSBio-1413, present an atypical antipsychotic profile in rodents

*Manuscrito a ser submetido ao periódico*

*European Journal of Pharmacology*

*(JCR 2,787)*

---

---



**New functionalized N-phenylpiperazine derivatives, LASSBio-1412 and LASSBio-1413, present an atypical antipsychotic profile in rodents**

Andresa Heemann Betti<sup>a</sup>, Eveline Stolz<sup>b</sup>, Renan de Oliveira Viera<sup>c</sup>, Thaise S. Martins<sup>d</sup>, Carlos A.M. Fraga<sup>d</sup>, Eliezer J. Barreiro<sup>d</sup>, François Noël<sup>c</sup>, Stela M.K.

Rates<sup>a,b,\*</sup>

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

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

*<sup>c</sup>Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

*<sup>d</sup>Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

\*Corresponding author: Stela Maris Kuze Rates Ph.D.

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre – RS

CEP 90670-010

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 series of functionalized *N*-phenylpiperazine derivatives (LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422) was planned through molecular hybridization between clozapine and L-741. The aim of this study was to search for derivatives with potential antipsychotic activity through apomorphine-induced climbing test and binding receptor assays as well as to evaluate their potential extrapyramidal side-effects and neurotoxicity by catatonia and rota-rod tests. Binding assays for *D*<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors were performed in synaptosomes from different brain regions of the rat using [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2, [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT and [<sup>3</sup>H]-ketanserin, respectively. Binding assays for α<sub>1A</sub> and α<sub>1B</sub> receptors were performed in rabbit and rat liver, respectively, using [<sup>3</sup>H]-prazosin. LASSBio-1412 and LASSBio-1413 bind with a moderate affinity (*K*<sub>i</sub> < 10 μM and *K*<sub>i</sub> < 1 μM, respectively) to *D*<sub>2</sub>-like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors just as clozapine, but not 5-HT<sub>2A</sub> receptors. LASSBio-1412 (1, 5, 15 mg/kg, p.o.), LASSBio-1413 (15, 30 mg/kg p.o.) and LASSBio-1422 (5, 15 mg/kg, p.o.) inhibited apomorphine-induced climbing without inducing catatonic behavior or general motor impairment. None of the compounds altered barbiturate sleeping time, and only LASSBio-1412 enhanced latency indicating that they do not have an important central depressant or hypnotic effect. In conclusion, these results indicate that the functionalized *N*-phenylpiperazine derivatives LASSBio-1412 and LASSBio-1413 are promising molecules for antipsychotics development, once they were active in an animal model of schizophrenia positive symptoms, and did not induce motor side effects. Also, they presented a multi-receptor profile characteristic of many atypical antipsychotics.



**Keywords:** *N*-phenylpiperazine derivatives, LASSBio-1412, LASSBio-1413, schizophrenia, antipsychotics.

## 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. However, a large trial known as CATIE, 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, 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 olanzapine, clozapine 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).

Different pharmacological concepts 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., 1989a), 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 study from our group described the synthesis of a new *N*-phenylpiperazine derivative, LASSBio-579 (1-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-4-pyrazolylmethyl]-4-phenylhexahydropyperazine) (Figure 1), designed by molecular hybridization between the prototypes clozapine and L-741 (Menegatti et al., 2003). In vitro assays indicated that LASSBio-579 acts as agonist at pre-synaptic dopamine D<sub>2</sub>-like receptors (Menegatti et al., 2003) and binds to D<sub>2</sub>-like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors with moderate affinity (Neves et al., 2009). In vivo studies have shown that LASSBio-579 acts on dopaminergic and serotonergic neurotransmission, inhibits apomorphine-induced climbing behavior and is devoid of cataleptogenic effects in mice (Neves et al., 2009). However it produces some impairment of motor coordination and has a limited oral bioavailability (0.6%) as well as low brain penetration (ratio between brain and plasma concentration = 6.3%) (Conrado et al., 2008). Other groups have demonstrated that this molecular scaffold also presents affinity for D<sub>4</sub> receptors (Löber et al., 2006; Tallman et al., 1997).

[Figure 1 near here]

In the present study five LASSBio-579 analogs (LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422) were evaluated in vitro and in vivo aiming to find new functionalized *N*-phenylpiperazine derivatives with potential antipsychotic activity.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemistry

LASSBio-1412 (4-(4-((5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)phenol), LASSBio-1413 (1-((3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-4-phenylpiperazine), LASSBio-1414 (4-(4-((3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)phenol), LASSBio-1415 (1-((5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-4-phenylpiperazine) and LASSBio-1422 (1-((5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-4-(4-fluorophenyl)piperazine) were 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> (Figure 2). The compounds were identified by <sup>1</sup>H RMN and <sup>13</sup>C RMN.

[Figure 2 near here]

### 2.2 *In vitro* assays

#### 2.2.1 Radioligands

[<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 (82.5 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (170.2 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-ketanserin (67 Ci/mmol) and [<sup>3</sup>H]-prazosin (74 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear Life Science Products, USA. Ketanserin tartrate, pargilyne, prazosin hydrochloride, serotonin creatinine sulphate and (-)-sulpiride were purchased from Sigma, São Paulo, Brazil.

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

### 2.2.2. Tissue preparation

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

Striatum were homogenized in a Potter apparatus with a motor-driven Teflon pestle at 4°C in 20 volumes per gram of tissue of ice-cold Tris-HCl 50 mM buffer (pH 7.4) containing 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<sub>av</sub> for 10 min. The pellet was resuspended in buffer and incubated at 37°C during 10 min for endogenous neurotransmitters removal. This suspension was cooled on ice and ultracentrifuged twice at 48 000 g<sub>av</sub> 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.

Rabbit liver ( $\alpha_{1A}$  binding assay) and rats livers ( $\alpha_{1B}$  binding assay) were homogenized in 10 or 40 volumes of buffer (Tris HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2

mM, pH 7.4) with a polytron (setting 8, 15 s x 6). The homogenates were filtered through 4 layers of gauze, subjected to centrifugation at 10.000 g for 10 minutes, and the supernatant further centrifuged at 80.000 g for 40 minutes at 4°C. The pellets were resuspended in the same volume of assay buffer (Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) and centrifuged at 80.000 g for 40 minutes at 4°C. All procedures were conducted at 4°C and ice cold buffers were used. The final pellet was resuspended in assay buffer and used for the binding assay.

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

### **2.2.3. Binding assays**

For the binding to D<sub>2</sub>-like receptors, striatal membranes (50 µg protein) and 0.1 nM [<sup>3</sup>H]-YM-09151-2 were incubated at 37°C for 60 min 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. For 5-HT<sub>1A</sub> receptors, hippocampal membranes (50 µg protein) 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 µM pargyline and Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), in a final volume of 500 µL. For 5-HT<sub>2A</sub> receptors, cortical membranes (150 µg protein) 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 µL.

After incubation, samples were rapidly diluted with 3 x 4 mL of cold 5 mM Tris-HCl buffer and immediately filtered under vacuum on glass fibre filters (GMF 3, Filtrak, Germany) previously soaked in 0.5% polyethyleneimine. Filters were then dried and immersed in a scintillation mixture (POPOP (1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-

benzene) 0.1 g/L and POP (2,5-diphenyloxazole) 4.0 g/L in toluene). The radioactivity retained in the filters was counted with a Packard Tri-Carb 1600 TR liquid scintillation analyzer. The assays were conducted to a maximum concentration of 30  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  according to the solubility of the compounds.

For the binding to  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors, the membranes were incubated with 0.1 nM [ $^3\text{H}$ ]-prazosin for 45 minutes at 30°C. Incubation volume was 1 mL in all experiments. Reactions were terminated by rapid filtration as described above. The filters were then washed 4 times with 4 mL of ice-cold 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) and dried, and the filter-bound radioactivity determined.

The non-specific binding was defined as binding in the presence of 30  $\mu\text{M}$  (-)-sulpiride ( $\text{D}_2$ -like), 10  $\mu\text{M}$  serotonin ( $5\text{-HT}_{1A}$ ), 1  $\mu\text{M}$  ketanserin ( $5\text{-HT}_{2A}$ ) or 1  $\mu\text{M}$  prazosin ( $\alpha_1$ ). All these assays were conducted in triplicate.

The  $K_d$  used for [ $^3\text{H}$ ]-YM-09151-2 binding to the  $\text{D}_2$ -like receptors was 0.036 nM (Richtand et al., 2007). The  $K_d$  and  $B_{\text{max}}$  values obtained in a saturation experiment with the  $5\text{-HT}_{1A}$  receptors were  $0.80 \pm 0.22$  nM and  $166 \pm 16$  fmol/mg protein, respectively. With the  $5\text{-HT}_{2A}$  receptors, the values obtained were  $1.77 \pm 0.67$  nM and  $348 \pm 51$  fmol/mg protein, respectively. The  $K_d$  used for [ $^3\text{H}$ ]-prazosin binding to  $\alpha_{1A}$  receptors was 0.987 nM (Ohmura and Muramatsu, 1995). For the  $\alpha_{1B}$  receptors, the  $K_d$  and  $B_{\text{max}}$  values obtained in a saturation experiment were  $1.49 \pm 0.41$  nM and  $544 \pm 144$  fmol/mg protein, respectively.

## **2.3 Behavioral Experiments**

### **2.3.1 Animals**

Adult male CF1 mice (25 – 35 g) and Wistar rats (200 – 300 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) or five rats (42 x 28 x 16 cm) with free access to food (Nuvital®) and water. Mice were kept at constant room temperature ( $22 \pm 2$  °C) and humidity (60%), under a 12 h light-dark cycle (lights off at 7:00 pm) and were adapted to local conditions for at least 72 h before the experiments. All experimental protocols were approved by CONEP - Brazil (National Commission of Research Ethics – Protocol 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), 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-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422 and haloperidol were suspended in saline with addition of 1% (v/v) polysorbate 80. Sodium pentobarbital were directly dissolved in saline. Apomorphine was dissolved in saline with addition of 0.1% ascorbic acid and clozapine in saline with addition of 0.1% acetic acid 0.1 M. Vehicle groups received 1% (v/v) polysorbate 80



in saline. The drugs were administered by intraperitoneal and oral routes (10 mL/kg body weight) or subcutaneously (5 mL/kg body weight). All doses are expressed as free base.

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

This test was used as a screening for antipsychotic activity, so that only the substances able to block the climbing behavior induced by apomorphine were selected to determine their ability to induce extrapyramidal effects and to investigate their gross neurotoxicity.

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

#### **2.3.4 Catalepsy test**

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

#### **2.3.5 Locomotor activity**

Locomotor activity was monitored in an area made of acrylic (transparent walls and black floor, 30 x 30 x 45 cm) divided into 24 squares of equal area. Mice were treated with the test substances and 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.

#### **2.3.6 Rota-rod test**

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

#### **2.3.7 Barbiturate sleeping time**

Sixty minutes after gavage with the test compounds, all groups received pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.). Sleep latency and sleeping time (time elapsed between the lost and voluntary recovery of the righting reflex) were recorded. We

assumed a 240 minutes cut-off for sleeping time, i.e., sleeping time over 240 min was counted as 240 min.

### 2.3.8 Gross behavior observation

Mice were treated with a single dose of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 (15 mg/kg) by oral route and observed for 2 h with no interruption. After that, animals were observed 6 and 12 h after treating and everyday for 14 days. Death occurrence and toxicity signs such as piloerection, palpebral ptoses, abdominal contortions, locomotion, hypothermia, muscular tonus, shacking, posterior paws paralisation, salivation, bronchial secretion and convulsions were considered. The body weight was also registered during the 14 days.

### 2.4 Statistical Analysis

In the binding assays, the median inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were estimated 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 using the Cheng and 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 for [ $^3H$ ]-8-OH-DPAT, [ $^3H$ ]-ketanserin and [ $^3H$ ]-prazosin (see details above) or from the literature for [ $^3H$ ]-YM-09151-2 ( $K_d = 0.036$  nM) (Richtand et al., 2007).

Catalepsy, rota-rod and gross behavior results were analyzed by two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), with treatment as the first factor and time interval or session (second factor) as the repeated-measure. The remaining experimental data (climbing, open field and barbiturate sleeping time), were subjected to a one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc 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

The  $K_i$  values (Table 1) indicate that LASSBio-1412 and LASSBio-1413 have a moderate affinity for  $D_2$ -like and  $5\text{-HT}_{1A}$  receptors, like clozapine. On the other hand, they have a much lower affinity than clozapine for the  $5\text{-HT}_{2A}$  receptors but a selectivity profile very similar to aripiprazole (see the ratios  $D_2/5\text{-HT}_{1A}$ ,  $D_2/5\text{-HT}_{2A}$  and  $5\text{-HT}_{1A}/5\text{-HT}_{2A}$ ). Table 1 also indicates that LASSBio-1412 and LASSBio-1413 have a similar moderate affinity for the  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors. LASSBio-1415 and LASSBio-1422 show only a low affinity ( $K_i > 10 \mu\text{M}$ ) for these receptors.

[Table 1 near here]

#### 3.2 Behavioral experiments

##### 3.2.1 Apomorphine-induced climbing: screening assay

LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.) significantly diminished the climbing behavior induced by apomorphine (4 mg/kg s.c.) (Figure 3: A, B, E), an effect that is not observed with LASSBio-1414 and LASSBio-1415 at the same dose (Figure 3: C, D). In fact these two compounds induced a climbing behavior *per se*. As a comparison, note that haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) fully abolished the effect of apomorphine. Only the three active compounds in this screening test were selected to further studies.

[Figure 3 near here]

### 3.2.2 Catalepsy test

LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 did not induce any cataleptic behavior when tested at the same dose (15 mg/kg p.o.) used in the climbing test (Figure 4). As expected, haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) caused a significant increase in the time spent by mice at the imposed uncomfortable position. The compounds dose chosen to test was the same used for screening through apomorphine-induced climbing.

[Figure 4 near here]

### 3.2.3 Effect of different doses in the apomorphine-induced climbing test

Different doses were tested in order to find the minimal effective dose of the compounds previously shown to be active in this test (Figure 3). As shown in figure 5, the minimal effective doses were 1 mg/kg, 15 mg/kg and 5 mg/kg, for LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422, respectively.

[Figure 5 near here]

### 3.2.4 Locomotor activity

The doses used for this test were chosen according to the higher dose tested in the apomorphine-induced climbing test. As shown in figure 6, LASSBio-1412 (15 mg/kg p.o.), LASSBio-1413 (30 mg/kg, p.o.) and LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) did not alter the locomotor activity neither the exploratory behavior. The compounds dose was chosen according to the maximum tested effective dose in the apomorphine-induced climbing test.

[Figure 6 near here]

### 3.2.5 Rota-rod test

Mice treated with LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.) did not present any alteration in permanence time when compared to vehicle-treated animals and to their own performance before the treatment (Figure 7A). The same occurred when considering the number of falls (Figure 7B). As expected, haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg p.o.) decreased the longest time of permanence and increased the number of falls. The compounds dose chosen to test was the same used for screening through apomorphine-induced climbing test.

[Figure 7 near here]

### 3.2.6 Barbiturate sleeping time

LASSBio-1412 (15 mg/kg p.o.), LASSBio-1413 (30 mg/kg, p.o.) and LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) treatment did modify the pentobarbital sodium (40 mg/kg i.p.) sleeping time (Figure 8) differently from haloperidol (4 mg/kg p.o.) and clozapine (15 mg/kg, p.o.) that caused a two-fold increase in mice sleeping time. All tested substances apparently enhanced the latency to sleep, but this effect was only statistically significant for LASSBio-1422. The compounds dose was chosen according to the maximum tested effective dose in the apomorphine-induced climbing test.

[Figure 8 near here]

### 3.2.7 Gross behavior

Mice treated with LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) did not show any toxicity sign, neither altered weight gain (Figure 9).

[Figure 9 near here]

## 4. DISCUSSION

In this work we have evaluated five new *N*-phenylpiperazine derivatives (LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422) designed as hybrids of clozapine and L-741, aiming a new antipsychotic lead compound. Firstly, all of them were evaluated in an animal model predictive of efficacy for treating positive symptoms of schizophrenia, the mice apomorphine-induced climbing. The active compounds were then submitted to rodent models predictive of motor impairments (catatonia and rota-rod test) and binding assays to some receptors accepted as antipsychotics targets. Afterward, the selected compounds were further evaluated for their sedative properties and dose-response relationship.

The climbing behavior is classically related to stimulation of the dopaminergic neurotransmission by means of direct activation of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors (Moore and Axton, 1988) or to glutamatergic modulation of dopamine release (Stahl, 2007). Initially all compounds were tested using a single dose (15 mg/kg p.o.) (Figure 3) which was elected as a screening dose for potential antipsychotic activity based on previous results of our group (Neves et al., 2009, 2008). LASSBio-1414 and LASSBio-1415 induced climbing *per se*. As LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 were able to inhibit the climbing behavior, different doses (0.5 – 30 mg/kg) were further tested in order to predict a dose-effect relationship. The minimal

effective doses of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 were 1 mg/kg, 15 mg/kg and 5 mg/kg, respectively, suggesting that LASSBio-1412 is the compound with highest potency in vivo (Figure 5).

The apomorphine-induced climbing is an animal model classically linked to motor agitation so that it can be altered by substances that induce motor deficits (Costall et al., 1978; Geyer and Ellenbroek, 2003; Weiss and Kilts, 1998). Furthermore, it does not discriminate typical from atypical antipsychotic drugs (Costall et al., 1978). For these reasons, we tested our compounds for their potential motor side effects by using catalepsy and rota-rod tests. Despite having virtually no strength as an animal behavioral model for antipsychotics, the catalepsy test is valuable for studying the neuropharmacology of extrapyramidal function and as a rapid behavioral screening for predicting motor side effects of potential antipsychotic drugs (Moore and Gershon, 1989; Sangberg et al, 1988; Weiss and Kilts, 1998). LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 did not provoke catalepsy behavior (Figure 4) or motor coordination impairment (Figure 7) at the climbing screening effective dose. This profile could fit in with second generation antipsychotics that induce extrapyramidal effects (EPS) only at high doses, such as risperidone and olanzapine (Farah, 2005; Owens, 1996). Additionally the acute treatment with LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 at 15 mg/kg p.o. did not cause any signs of acute toxicity pointing to the putative safety of these compounds (Figure 9).

In order to expand the evaluation of potential motor side effects, we assessed the influence of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 on spontaneous locomotor activity. All the three compounds did not affect any observed parameters (number of crossings, rearings and groomings) (Figure 6) demonstrating that they do



not alter animals' exploratory behavior neither cause motor impairment at their maximal effective tested doses. This result demonstrates that these compounds could represent an advance in relation to LASSBio-579 which induced motor impairment at climbing effective doses.

Beyond that, sedation is also an important side effect induced by current antipsychotic drugs since all first generation drugs produce a sedative effect in patients (Baldessarini and Tarazi, 2001). In addition a meta-analysis comparing different schizophrenia treatments concluded that clozapine, quetiapine and zotepine are more sedating than haloperidol whereas aripiprazole was significantly less sedating (Leucht et al., 2009). When evaluated in the barbiturate sleeping time test, LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 did not present sedative or hypnotic effect at their maximal climbing effective tested doses (Figure 8).

The binding assays showed that three of our compounds (LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1414) have a moderate affinity for the  $D_2$ -like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. In particular, LASSBio-1413 presents an affinity similar to clozapine ( $K_i < 1 \mu\text{M}$ ) for the  $D_2$ -like and 5-HT<sub>1A</sub> receptors, but not for the 5-HT<sub>2A</sub> receptors ( $K_i$  100-fold higher than clozapine) (Table 1). This binding pattern is also comparable to LASSBio-579 (Neves et al., 2009).

Conventional and atypical antipsychotics are dopamine  $D_2$  antagonists or inverse agonists. They block postsynaptic receptors and normalize the hyperactivity theoretically arising from excessive dopamine at the synapse, resulting in a reduction in positive psychotic symptoms (Kim et al., 2009). Antipsychotics with both  $D_2$  and 5-HT<sub>2A</sub> antagonist properties have the ability to not only decrease dopamine activity by blocking  $D_2$  receptors, but also increase dopamine release by blocking 5-HT<sub>2A</sub> since serotonergic neurons that innervate dopaminergic neurons modulate dopamine

release via somatodendritic and axodendritic 5-HT<sub>2A</sub> receptors on dopamine neurons. Thus, antagonism of 5-HT<sub>2A</sub> receptors can stimulate dopamine release in certain brain areas, including the prefrontal cortex and the striatum. Although such effect could be responsible for the atypicality of certain antipsychotics with therapeutic actions not only on positive symptoms but also on negative, cognitive, and affective symptoms, with a significant reduction in the incidence of EPS and hyperprolactinemia (Kim et al., 2009), this is probably not applicable to our compounds due to the low (instead of high) ratio of the *K<sub>i</sub>* values for D<sub>2</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. On the other hand, the dual effect of LASSBio-1413 on D<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors could explain its apparent atypical profile in vivo since some new antipsychotic drugs are weak D<sub>2</sub> antagonists or partial D<sub>2</sub> receptor agonists and 5-HT<sub>1A</sub> receptor partial agonists (Meltzer et al., 1989b; Stockmeier et al., 1993). Indeed, the regulatory effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on dopamine release can be thought as the converse of the influence exerted by 5-HT<sub>2A</sub> receptors, whereas 5-HT<sub>2A</sub> agonism acts as a dopamine brake and 5-HT<sub>1A</sub> agonism acts as a dopamine accelerator. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors disinhibits dopamine release; in the striatum this action diminishes hypodopaminergia resulting from D<sub>2</sub> blockade and theoretically reduces the risk of EPS, whereas in the pituitary the same action potentially lowers the risk of hyperprolactinemia; in the prefrontal cortex, it could potentially improve negative, cognitive, and affective symptoms. Thus, 5-HT<sub>1A</sub> agonism has similar effects as 5-HT<sub>2A</sub> antagonism.

When considering the ratio affinities (D<sub>2</sub>/5-HT<sub>1A</sub>, D<sub>2</sub>/5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>2A</sub>), the selectivity profile of LASSBio-1412 and LASSBio-1413 are very similar to that presented by aripiprazole in our experimental conditions (Table 1) as well as those described elsewhere (Newman-Tancredi et al., 2005; Shapiro et al., 2003). Mixed

affinities at 5-HT<sub>1A</sub> and D<sub>2</sub> receptors have been reported to be indicative of antipsychotic activity with an atypical profile (Taverne et al., 1998).

Besides serotonergic and dopaminergic receptors, LASSBio-1412 and LASSBio-1413 bound to  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors. Cahir and King (2005) demonstrated that atypical (sertindole, risperidone, clozapine, quetiapine and olanzapine) and typical (thioridazine, chlorpromazine, pimozine, trifluoperazine and haloperidol) antipsychotics bound to both  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  subtypes with relatively high affinity although within a wide affinity range for each subtype. By comparing  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptors affinity values with reported D<sub>2</sub> affinities, the antipsychotics can be divided into three categories, those with higher  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  receptor affinity than D<sub>2</sub> affinity (quetiapine, sertindole, clozapine, thioridazine and chlorpromazine), those with equivalent affinity (risperidone, olanzapine and pimozide) and those which are predominantly D<sub>2</sub> antagonists (haloperidol and trifluoperazine) (Richelson and Nelson, 1984). Based on these, we can conclude that LASSBio-1412 and LASSBio-1413 have a profile similar to the clozapine group.

The in vitro monoaminergic receptor binding profiles of LASSBio-1412 and LASSBio-1413 could, at least partially, underlie their effectiveness in reducing apomorphine-induced climbing behavior (Moore and Axton, 1988). On the other hand, LASSBio-1422 could act through another neurotransmission system, such as the glutamatergic since studies demonstrated that NMDA receptor antagonist blocked climbing behavior induced by the direct dopamine receptor agonist, apomorphine, suggesting that NMDA type glutamatergic neurotransmission may modulate dopaminergic function at the postsynaptic level (Jang and Lee, 2001; Kim et al., 1996).

In conclusion, the results discussed so far characterize the new functionalized *N*-phenylpiperazine derivatives LASSBio-1412 and LASSBio-1413 as antipsychotic lead compounds active in animal models of positive symptoms of schizophrenia, with no propensity for inducing motor side effects, and with a multireceptor profile characteristic of some atypical antipsychotics. The investigation of other neurochemical targets such as D<sub>4</sub> receptor and glutamate neurotransmission as well as the effects of these compounds in animal models of cognitive and 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 (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.

### **References**

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

Baldessarini, 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.

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

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

Conrado D.J., Verli, H., Neves, G., Fraga, C.A.M., Barreiro, E.J., Rates, S.M.K., Dalla Costa, T. 2008. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an *N*-phenylpiperazine antipsychotic prototype. *J Pharm Pharmacol* 60, 699-707.

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

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.

Howard, H.R., Lowe, J.A., Seeger, T.F., Seymour, P.A., Zorn, S.H., Maloney, P.R., Ewing, F.E., Newman, M.E., Schmidt, A.W., Furman, J.S., Robinson, G.L., Jackson, E., Johnson, C., Morrone, J. 1996. 3-Benzisothiazolylpiperazine derivatives as potential atypical antipsychotic agents. *J Med Chem* 39, 143-148.

Ichikawa, J., Ishii, H., Bonaccorso, S., Fowler, W.L., O'Laughlin, I.A., Meltzer, H.Y. 2001. 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* 76, 1521-1531.

- Jang, C.G., Lee, S.Y. 2001. NMDA-type glutamatergic modulation in dopaminergic activation measured by apomorphine-induced cage climbing behaviors. *Arch Pharm Res* 24(6), 613-617.
- 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.
- Kim, D.H., Maneen, M.J., Stahl, S.M. 2009. Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia. *Neurotherapeutics* 6, 78-85.
- 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.
- Kim, H.S., Rhee, G.S., Jung, J.Y., Lee, J.H., Jang, C.G., Park, W.K. 1996. Inhibition by noncompetitive NMDA receptor antagonists of apomorphine-induced climbing behavior in mice. *Life Sciences* 58(17), 1397-1402.
- 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.
- 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.
- 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.

McEvoy, J.P. 2009. Much ado about small differences. *World Psychiatry* 8(1), 29-30.

Meltzer, H.Y., Matsubara, S., Lee, J.C. 1989. The ratios of serotonin<sub>2</sub> and dopamine<sub>2</sub> affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. *Psychopharmacol Bull* 25, 390–392a.

Meltzer, H.Y., Matsubara, S., Lee, J.C. 1989. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and serotonin<sub>2</sub> pK<sub>i</sub> 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. 2003. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D<sub>2</sub> receptor ligands. *Bioorg Med Chem* 11, 4807-4813.

Moore, N.C., Gershon, S. 1989. Which atypical antipsychotics are identified by screening tests? *Clin Neurophar* 12, 167-184.

Moore, N.A., Axton, M.S. 1988. Production of climbing behavior in mice requires both D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor activation. *Psychopharmacol* 94, 263-266.

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. 2003. Dopaminergic profile of new heterocyclic N-phenylpiperazine derivatives. *Braz J Med Biol Res* 36, 625-629.

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. 2008. Serotonergic neurotransmission mediates hypothermia induced by the N-phenylpiperazine antipsychotic prototypes LASSBio-579 and LASSBio-581. *Pharmacol Biochem Behav* 89, 23-30.

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. 2009. Searching for Multi-target

Antipsychotics: Discovery of Orally Active Heterocyclic *N*-Phenylpiperazine Ligands of D2-*like* and 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. *Bioorg Med Chem. In press.*

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

Newman-Tancredi, A., Assié, M.B., Leduc, N., Ormière, A.M., Danty, N., Cosi, C. 2005. Novel antipsychotics activate recombinant human and native rat serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors: affinity, efficacy and potential implications for treatment of schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol* 8, 341-356.

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

Park, W.K., Jeong, D., Cho, H., Lee, S.J., Cha, M.Y., Pae, A.N. 2005. KKHA-761, a potent D<sub>3</sub> receptor antagonist with high 5-HT<sub>1A</sub> receptor affinity, exhibits antipsychotic properties in animal models of schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 361-372.

Pilowsky, L.S., Mulligan, R.S., Acton, P.D., Ell, P.J., Costa, D.C., Kerwin, R.W. 1997. Limbic selectivity of clozapine. *Lancet* 350, 490–491.

Richelson, E., Nelson, A. 1984. Antagonism by neuroleptics of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro. *Eur. J. Pharmacol* 103, 197– 204.

Richtand, N.M., Welge, J.A., Logue, A.D., Keck Jr, P.E., Strakowski, S.M., McNamara, R.K. 2007. Dopamine and serotonin receptor binding and antipsychotic efficacy. *Neuropsychopharmacol* 32, 1715-1726.

Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroese, W.K. 2004. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nature Rev Drug Discov* 3, 353-359.



Sangberg, P.R., Bunsey, M.D., Giordano, M., Norman, A. 1988. The catalepsy test : its ups and downs. *Behav Neurosci* 102, 748-759.

Shapiro, D.A., Renock, S., Arrington, E., Chiodo, L.A., Liu, L.X., Sibley, D.R., David, R., Roth, B., Bryan, L., Mailman, R. 2003. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacol* 28, 1400-1411.

Snyder, E.M., Murphy, M.L. 2008. Schizophrenia therapy: beyond atypical antipsychotics. *Drug Discovery* 7, 471-472.

Stockmeier, C.A., DiCarlo, J.J., Zhang, Y., Thompson, P., Meltzer, H.Y. 1993. Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of serotonin 2 and dopamine 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 1374-1384.

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. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1011-1019.

Taverne, T., Diouf, O., Depreux, P., Poupaert, J.H., Lesieur, D., Guardiola-Lemaitre, B., Renard, P., Rettori, M.C., Caignard, D.H., Pfeiffer, B. 1998. Novel benzothiazolin-2-one and benzoxazin-3-one arylpiperazine derivatives with mixed 5-HT<sub>1A</sub>/D<sub>2</sub> affinity as potential atypical antipsychotics. *J Med Chem* 41, 2010-2018.

Ohmura, T., Muramatsu, I. 1995. Two distinct  $\alpha_1$ -adrenoreceptor subtypes in rabbit liver: a binding study. *BJP* 116, 2591-2596.

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.

Weiss, J.M., Kilts, C.D. 1998. Animal models of depression and schizophrenia. In: Schatzberg A F and Nemeroff C B (1998). Textbook of Psychopharmacology 2<sup>nd</sup> ed. American Psychiatric Press, Washington.

**Table 1.** Affinities of LASSBio-1412, LASSBio-1413, LASSBio-1414, LASSBio-1415 and LASSBio-1422 for D<sub>2</sub>-like, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, α<sub>1A</sub> and α<sub>1B</sub> receptors. Clozapine and aripiprazole were used as reference drugs.

Compound	<i>K<sub>i</sub></i> (μM)									
	D <sub>2</sub> -like	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	α <sub>1A</sub>	α <sub>1B</sub>	Ratio D <sub>2</sub> /5- HT <sub>1A</sub>	Ratio D <sub>2</sub> /5- HT <sub>2A</sub>	Ratio 5- HT <sub>1A</sub> /5- HT <sub>2A</sub>	Ratio α <sub>1A</sub> / α <sub>1B</sub>	Ratio α <sub>1B</sub> / α <sub>1A</sub>
LASSBio-1412	6.01	5.91	17.3	2.28	1.80	1.02	0.348	0.343	1.27	0.789
LASSBio-1413	0.617	0.422	16.4	0.784	0.804	1.46	0.038	0.026	0.975	1.03
LASSBio-1414	2.75	7.60	19.2	0.908	No affinity	0.362	0.144	0.396	-	-
LASSBio-1415	>7.94	>13.3	>19.2	> 27.2	6.84	>0.596	>0.414	>0.696	>3.98	>0.251
LASSBio-1422	>7.94	>13.3	>19.2	>27.2	5.90	>0.596	>0.414	>0.696	>4.61	>0.217
Clozapine	0.114	0.378	0.014	0.029 <sup>#</sup>	0.012 <sup>#</sup>	0.301	8.10	26.9	2.42 <sup>#</sup>	0.414 <sup>#</sup>
Aripiprazole	0.001	0.001	0.007	0.026 <sup>*</sup>	0.035 <sup>*</sup>	1.49	0.132	0.089	0.743 <sup>*</sup>	1.35 <sup>*</sup>

*K<sub>i</sub>* values obtained from literature: <sup>#</sup>Cahir and King, 2005; <sup>\*</sup>Shapiro et al., 2003.

## Figure legends

**Figure 1.** Structure of LASSBio-579.

**Figure 2.** LASSBio-579 derivatives synthesis route. **(1)** 5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole-4-carbaldehyde or 3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole-4-carbaldehyde. **(2)** 4-(piperazin-1-yl)phenol or 1-*p*-tolylpiperazine or 1-(4-fluorophenyl)piperazine.

**Figure 3.** Apomorphine-induced climbing behavior. 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. (n= 8-10). ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls. Different from vehicle+vehicle (Veh+Veh) group in post-hoc test \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001; different from vehicle+apomorphine (Veh+APO) group in post-hoc test #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001. (A) Effect of LASSBio-1412 (15 mg/kg p.o.),  $F_{5,49}=10.574$ ,  $P<0.001$ . (B) Effect of LASSBio-1413 (15 mg/kg p.o.),  $F_{5,57}=20.423$ ,  $P<0.001$ . (C) Effect of LASSBio-1414 (15 mg/kg p.o.),  $F_{5,57}=16.608$ ,  $P<0.001$ . (D) Effect of LASSBio-1415 (15 mg/kg p.o.),  $F_{5,57}=13.825$ ,  $P<0.001$ . (E) Effect of LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.),  $F_{5,57}=14.439$ ,  $P<0.001$ .

**Figure 4.** Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 (15 mg/kg p.o.) in catalepsy test (n=10). Clozapine (15 mg/kg p.o) and haloperidol (0.5 mg/kg p.o) were used as reference drugs. Data are expressed as mean + S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls (treatment factor  $F_{5,179}=20.614$   $P<0.001$ ; time factor  $F_{2,179}=6.146$   $P=0.003$ ; treatment x time interaction  $F_{10,179}=12.096$   $P<0.001$ ): different from vehicle group at the same time of measure in post-hoc test, \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001.

**Figure 5.** Apomorphine-induced climbing test. Data are expressed as mean + S.E.M. (n=8-10). ANOVA *post-hoc* Dunnett. Different from vehicle+vehicle group in post-hoc test \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001. (A) Effect of different doses of LASSBio-1412 (0.5, 1, 5, 15 mg/kg, p.o.),  $F_{7,74}=14.171$ ,  $P<0.001$ . (B) Effect of different doses of LASSBio-1413 (5, 15, 30 mg/kg, p.o.),  $F_{6,67}=14.121$ ,  $P<0.001$ . (C) Effect of different doses of LASSBio-1422 (1, 5, 15 mg/kg, p.o.),  $F_{6,67}=12.745$ ,  $P<0.001$ .

**Figure 6.** Effect of LASSBio-1412 (15 mg/kg, p.o.), LASSBio-1413 (30 mg/kg, p.o.) and LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) on locomotor activity of mice (n=10). Parameters evaluated: number of crossings ( $F_{3,39}=0.430$ ,  $P=0.733$ ), rearings ( $F_{3,39}=1.491$ ,  $P=0.233$ ) and groomings ( $F_{3,39}=2.147$ ,  $P=0.111$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ANOVA.

**Figure 7.** Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 in the rota-rod test (n=8-10). Clozapine (15 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.5 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. (A) Maximum permanence time. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls (treatment factor  $F_{5,107}=8.217$   $P<0.001$ ; time factor  $F_{1,107}=12.443$   $P<0.001$ ; treatment x time interaction  $F_{5,107}=7.594$   $P<0.001$ ). (B) Number of falls. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls (treatment factor  $F_{5,107}=8.192$   $P<0.001$ ; time factor  $F_{1,107}=22.131$   $P<0.001$ ; treatment x time interaction  $F_{5,107}=8.529$   $P<0.001$ ). Different from first measure (basal) at the same treatment group at post-hoc test \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001.

**Figure 8.** Effect of LASSBio-1412 (15 mg/kg, p.o.), LASSBio-1413 (30 mg/kg, p.o.) and LASSBio-1422 (15 mg/kg, p.o.) on barbiturate sleeping time. Clozapine (15 mg/kg p.o.) and haloperidol (0.5 and 4 mg/kg p.o.) were used as reference drugs. Data are expressed as mean + S.E.M. ANOVA *post-hoc* Student-Newman-Keuls (n=8-10). Parameters observed: (A) latency ( $F_{6,65}=4.013$   $P=0.002$ ). (B) sleeping time ( $F_{6,65}=7.541$   $P<0.001$ ).

**Figure 9.** Effect of LASSBio-1412, LASSBio-1413 and LASSBio-1422 on gross behavior observation (n=10). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA *post hoc* Student-Newman-Keuls (treatment factor  $F_{3,319}=0.649$   $P=0.589$ ; day factor  $F_{7,319}=85.197$   $P<0.001$ ; treatment x day interaction  $F_{21,319}=2.050$   $P=0.005$ ).

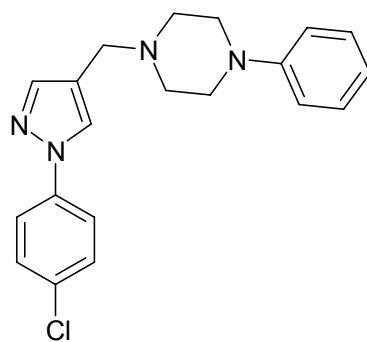


Figure 1





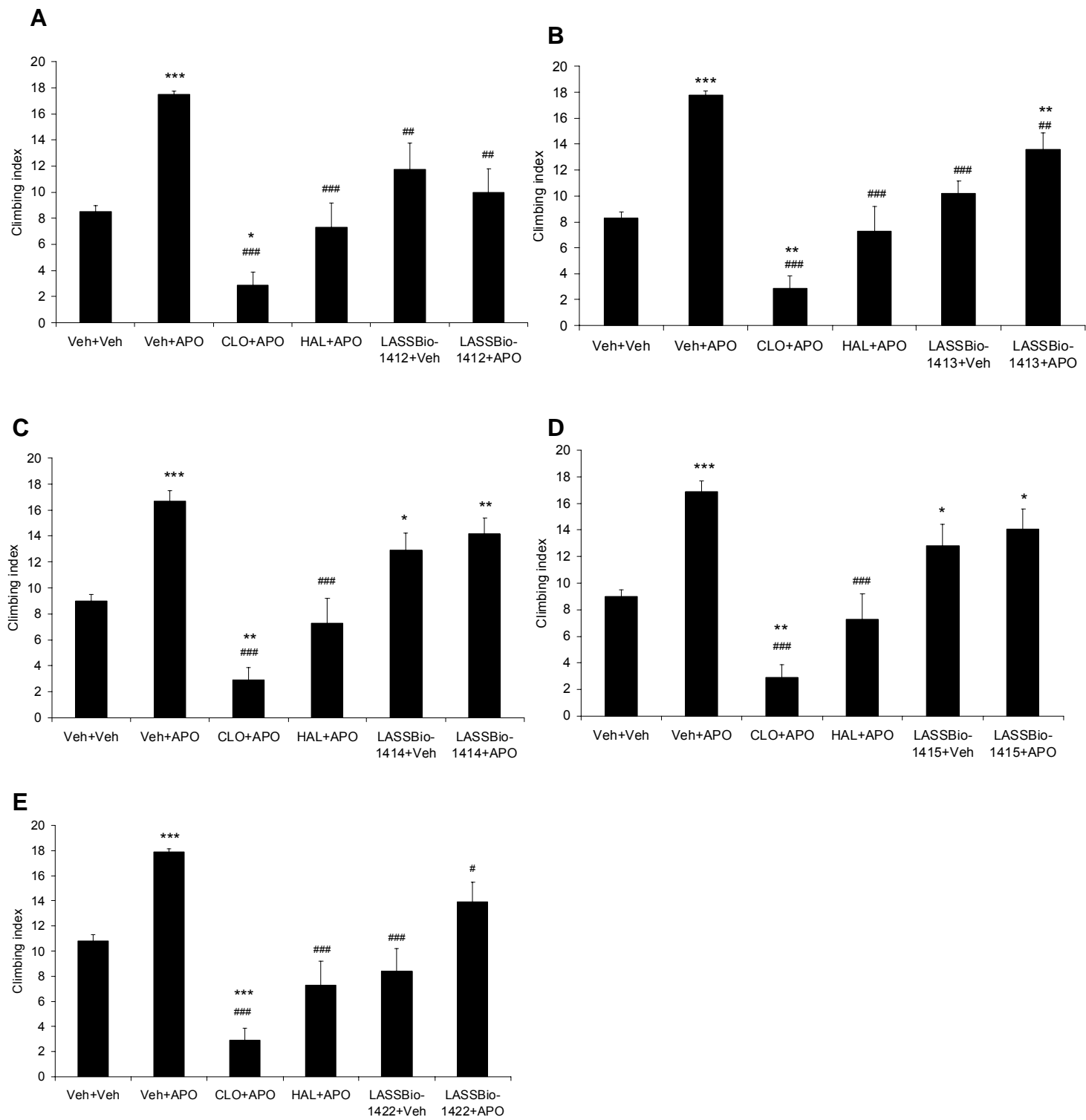


Figure 3

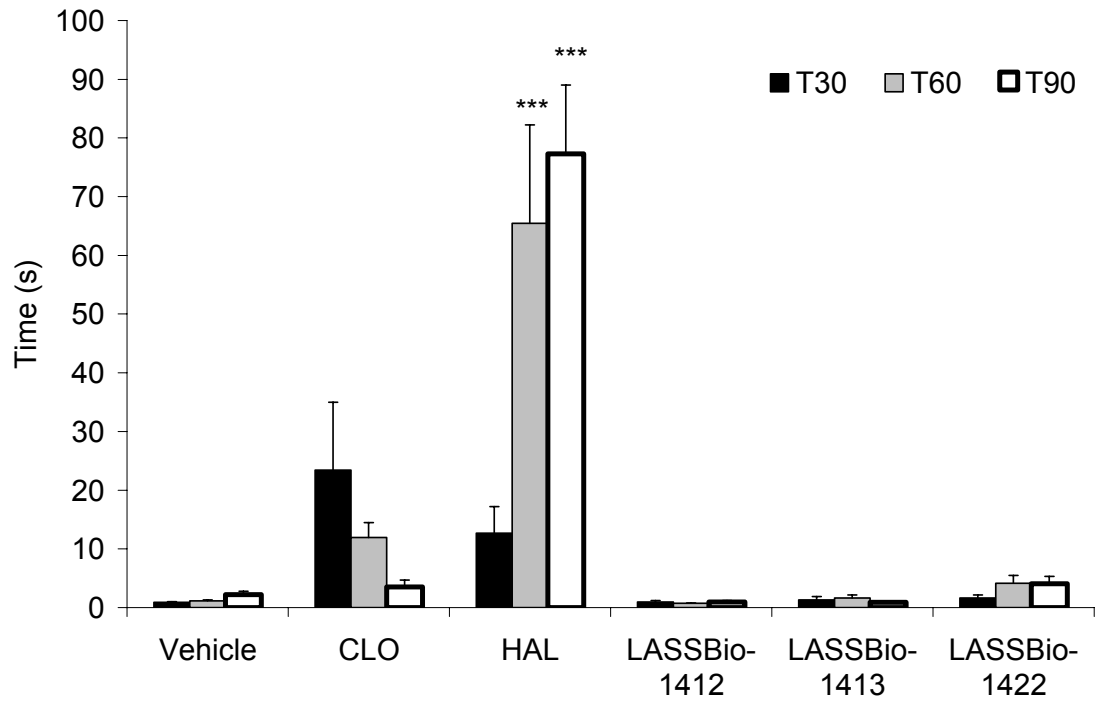


Figure 4

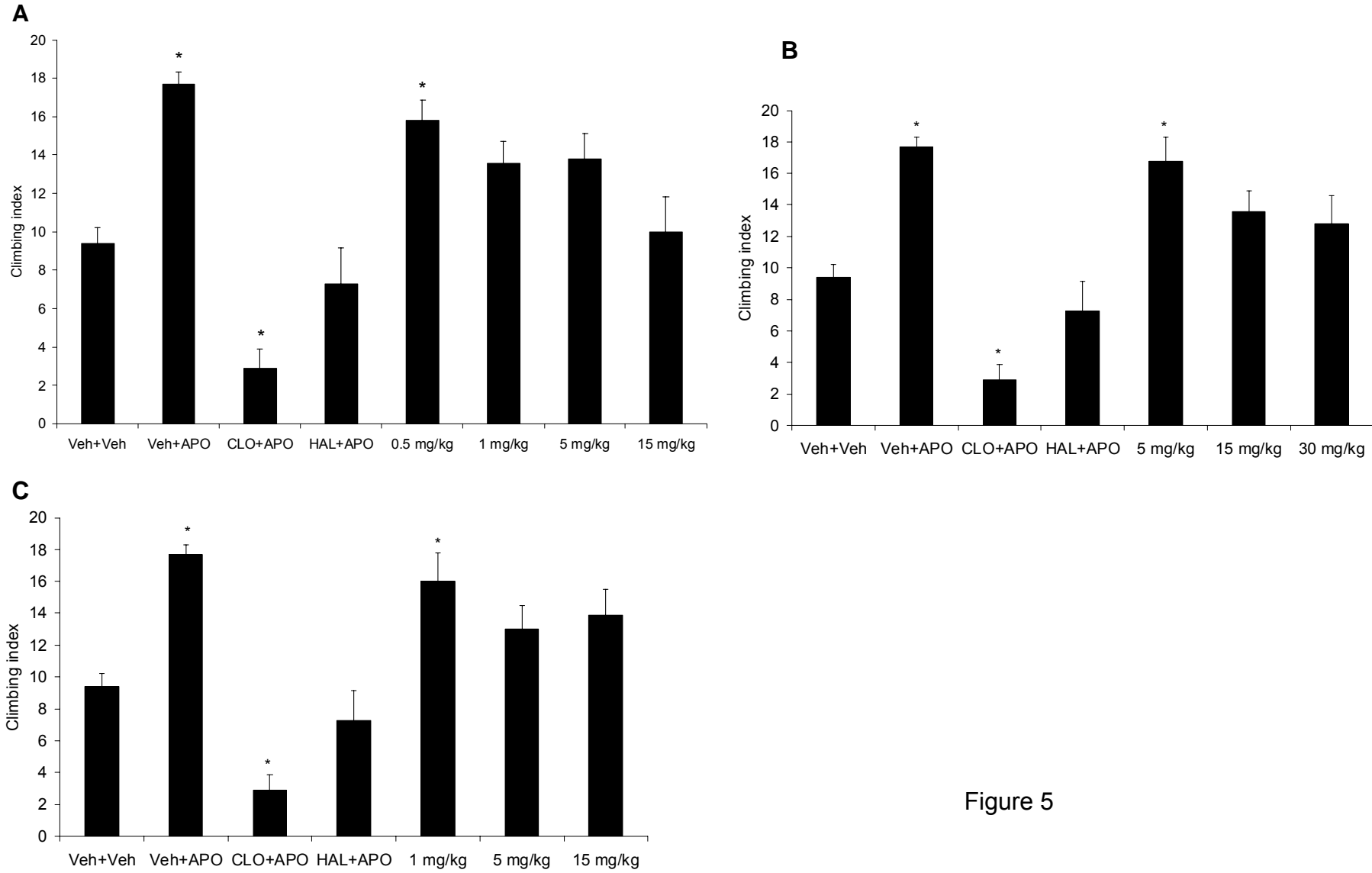


Figure 5

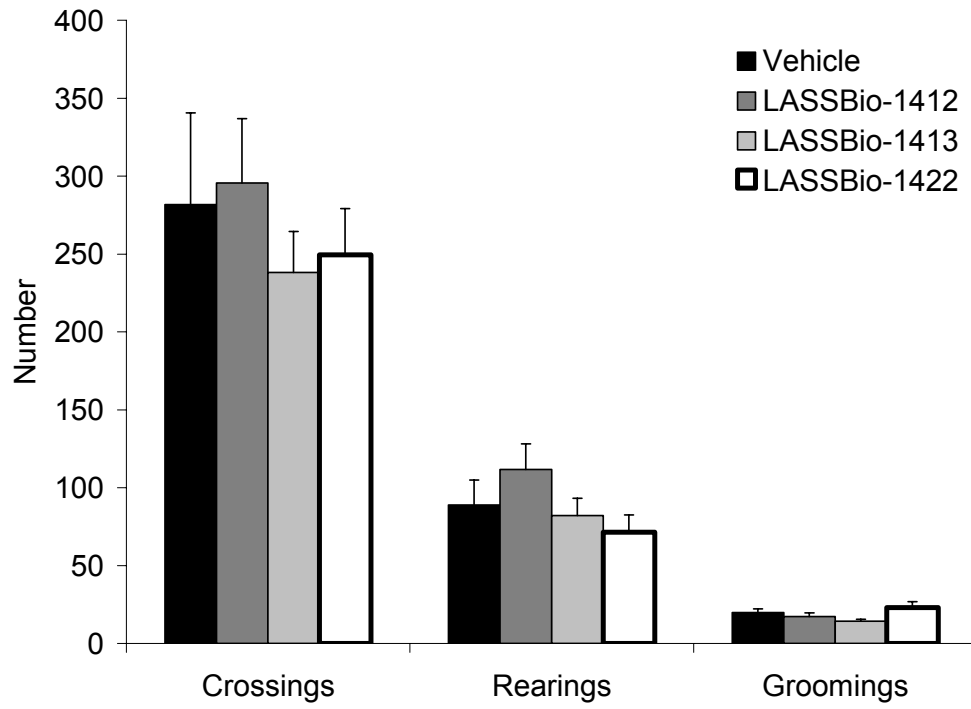


Figure 6

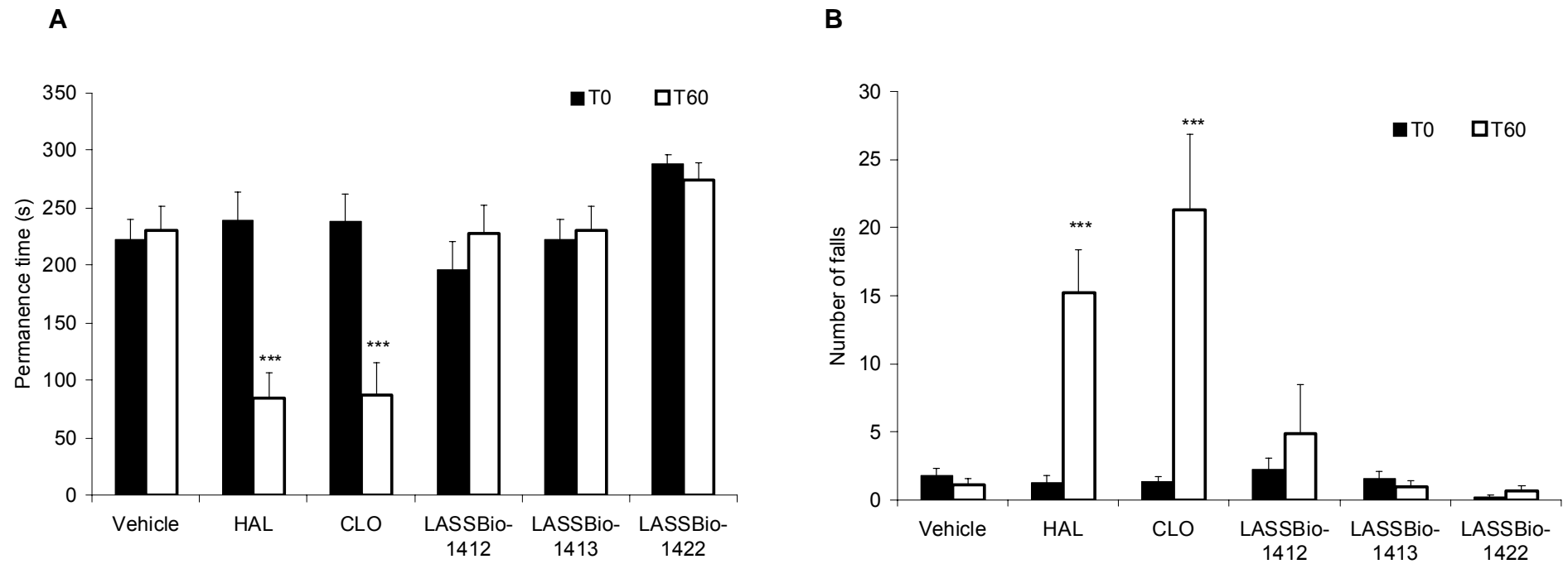


Figure 7

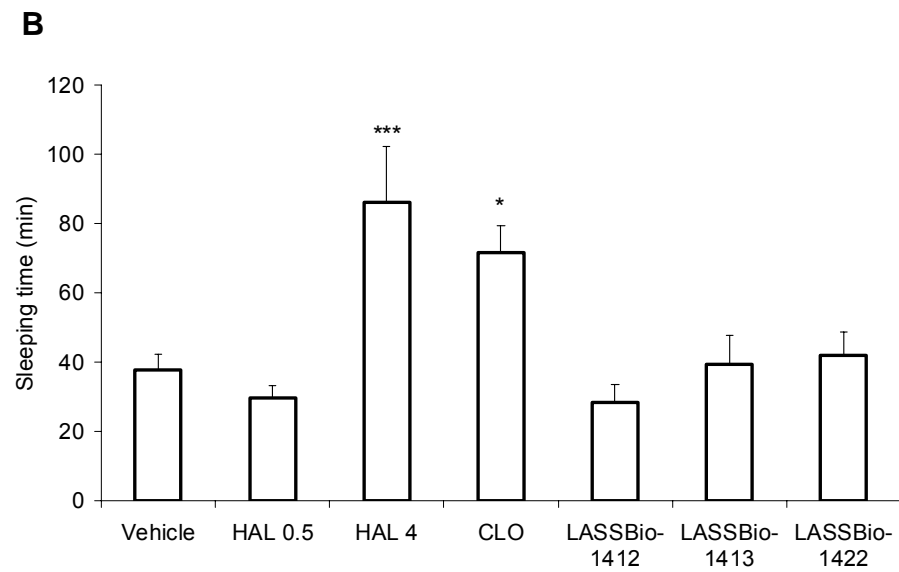
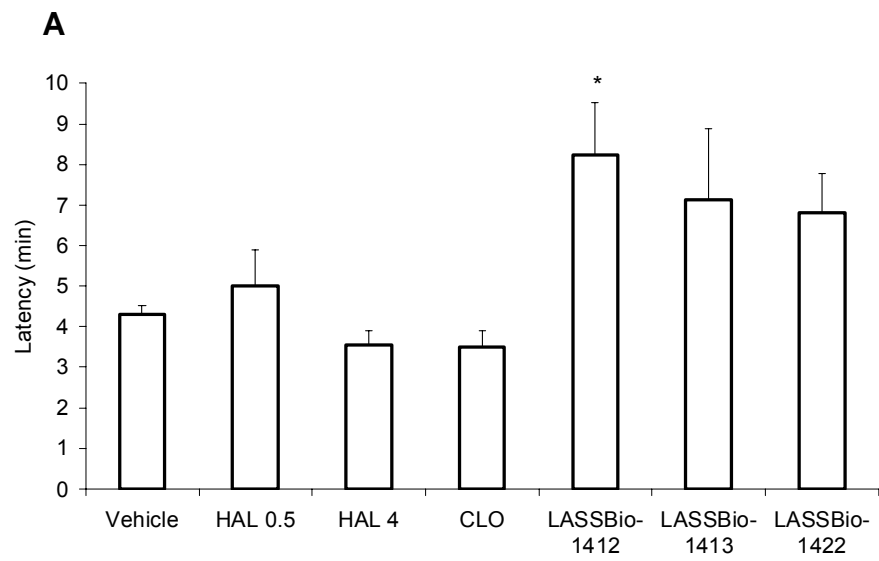


Figure 8

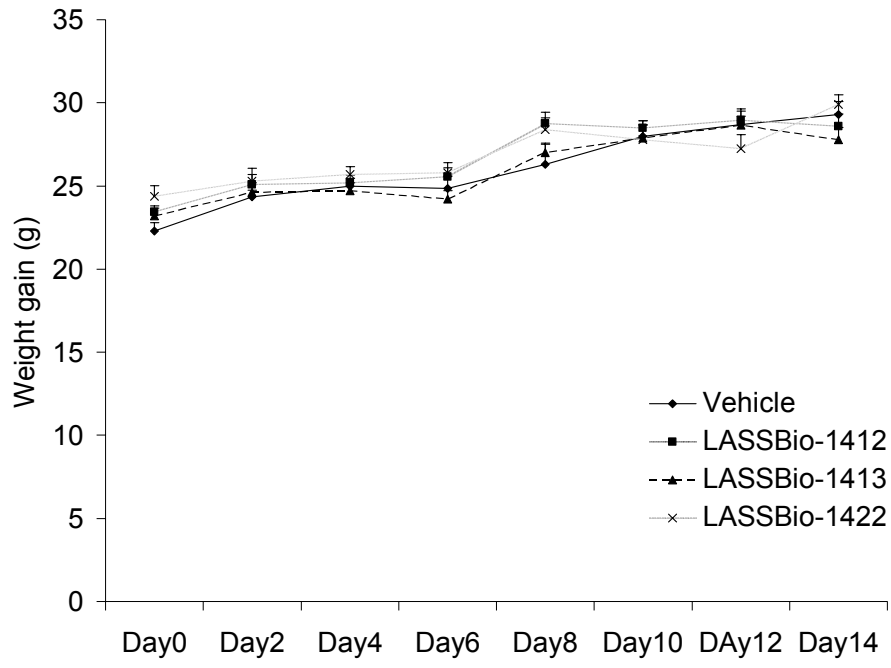


Figure 9





---

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No âmbito dessa Dissertação, foi investigado o potencial antipsicótico de uma série de derivados *N*-fenilpiperazínicos, os quais foram planejados a partir de LASSBio-579 e *N*-benziltiazolidínicos, buscando aumentar a diversidade estrutural.

Primeiramente, a funcionalização dos análogos de LASSBio-579, protótipo para o desenvolvimento de novos antipsicóticos, resultou em compostos muitos semelhantes do ponto de vista farmacodinâmico; porém, LASSBio-1412 mostrou-se mais potente *in vivo* (menor dose-efetiva no comportamento de *climbing*: 1 mg/kg, v.o.) e com incidência de efeitos motores não significativa. Assim, podemos inferir que a otimização farmacológica de LASSBio-579 atingiu seu objetivo.

O estudo dos derivados *N*-benziltiazolidínicos sugere que os compostos testados, os derivados triazólicos, FPT-2 e FPT-4, e pirazólicos, FPY-3, são ativos no modelo de *climbing* induzido por apomorfina em doses que apresentam uma baixa tendência para causar catatonia e comprometimento motor. Dessa forma, essas substâncias mostraram-se promissoras para inclusão em estratégias de desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento de sintomas positivos da esquizofrenia. Além disso, esses compostos parecem ser uma perspectiva de fármacos antipsicóticos com alvo biológico distinto do sistema monoaminérgico, uma vez que não apresentaram uma alta afinidade pelos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos estudados. Ainda, os derivados FPY-1 e FPY-3 apresentaram propriedades farmacológicas que os caracterizam como substâncias promissoras para o estudo direcionado a outros empregos terapêuticos, como tratamento de Parkinson e disfunção erétil ou depressão, respectivamente.

Portanto, a partir dos resultados discutidos nessa Dissertação, sugere-se que essas substâncias possam trazer sugestões de modificações moleculares, objetivando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da esquizofrenia.



---

**PERSPECTIVAS**



## PERSPECTIVAS

Aprofundar a avaliação do potencial antipsicótico de FPT-2, FPT-4, FPY-3, LASSBio-1412, LASSBio-1413 e LASSBio-1422 utilizando modelos animais preditivos de ação sobre os diferentes sintomas da esquizofrenia (positivos, negativos e cognitivos): *climbing* induzido por apomorfina; hiperlocomoção induzida por antagonistas NMDA; interação social e inibição de pré-pulso.

Avaliar o potencial das substâncias ativas nos modelos de esquizofrenia para indução de efeitos adversos motores e depressores do Sistema Nervoso Central: atividade motora espontânea e tempo de sono barbitúrico.

Investigar o mecanismo de ação das substâncias mais promissoras nos modelos animais em ensaios *in vitro*: ensaios de *binding* a receptores NMDA; microdiálise cerebral para medida das concentrações intersticiais de dopamina, serotonina e glutamato; avaliação do efeito sobre a função astrogliar, através do estudo de captação de glutamato, produção da proteína S100B e análise de viabilidade e morfologia astrocitária em culturas de células astrogliais C6.





---

## REFERÊNCIAS



## REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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.J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 11: 4807-4813, 2003.

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.; 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.; 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.







## **ANEXO I**

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



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

pro-repesq

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

Número : 2007975

Título : Avaliação pré-clínica da atividade antipsicótica de derivados N-fenilpiperazínicos e isómeros: N-benzilimidazolinas e N-benziltiazolidinas

Pesquisador (es) :

NOME	PARTICIPACÃO	EMAIL	EQNE
STELA MARIS KUZE RATES	PESQ RESPONSÁVEL	00008026@ufrgs.br	33085313
ANDRESA HEEMANN BETTI	PESQUISADOR	ahbetti@gmail.com	
MARIANA DE ANDRADE PRANKE DA SILVA	PESQUISADOR	maripranke@hotmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 42 , ata nº 122 , de 18/12/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 18 de dezembro de 2008

  
ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS