

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

**Perfil antipsicóticos de alstonina: ação em modelos de sintomas negativos,
alterações em aminas biogênicas e efeitos adversos em camundongos.**

VIVIANE DE MOURA LINCK

PORTO ALEGRE, 2008.

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

Perfil antipsicótico de alstonina: ação em modelos de sintomas negativos, alterações em aminas biogênicas e efeitos adversos em camundongos.

Dissertação apresentada por **Viviane de Moura Linck** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Elisabetsky
Co-orientadora: Profa. Dra. Mirna Bainy Leal

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 aprovada em 26.2.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Nadja Schroder

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

L736p Linck, Viviane de Moura
Perfil antipsicótico de alstonina: ação em modelos de sintomas negativos, alterações em aminas biogênicas e efeitos adversos em camundongos / Viviane de Moura Linck – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – 89 p. : il.

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

1. Alstonina. 2. Esquizofrenia. 3. Aminas biogênicas. 4. Alcalóides. I. Elisabetsky, Elaine. II. Leal, Mirna Bainy. III. Título.

CDU: 547.94:616.895.8

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido com a orientação da Profa. Dra. Elaine Elisabetsky e co-orientação da Profa. Dra. Mirna Bainy Leal, no Laboratório de Etnofarmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a metodologia de dosagem de aminas biogênicas foi realizada na Universidade de São Paulo, e as dosagens de prolactina na Universidade Federal de Minas Gerais. A pesquisa foi financiada pelo CNPq. A autora recebeu bolsa da CAPES.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais pelo amor, apoio nas horas difíceis, incentivo, exemplo de vida e determinação.
- Ao Marcelo pelo apoio sempre presente, por tentar entender um pouco de farmacologia e claro pelo amor.
- À Prof. Elaine Elisabetsky, pela orientação, paciência, ensinamento, carinho e pela amizade.
- À Prof. Mirna B. Leal, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela amizade e principalmente por ter me trazido para o mundo da ciência.
- À Dra. Eliane Dallegrave, pelos ensinamentos em técnicas fundamentais para esse trabalho.
- À Dra. Poli Mara Spritzer, Dra. Adelina M. dos Reis e Dr. Jorge Flório pelas colaborações tão essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.
- À Ana e Greice, bolsistas de iniciação científica, minhas parceiras e amigas. Sem vocês esse trabalho não seria possível.
- Às amigas Adri e Micheli pela amizade, companheirismo, ajuda nos experimentos, carinho, e por terem me ensinado a tomar café.
- Aos amigos Ângelo e Bernardo pela amizade, risadas e ajuda sempre que necessária.
- A todos do laboratório de etnofarmacologia: à Jennifer, minha grande amiga e confidente; à Paula pela ajuda e ensinamentos de vida; ao Marcelo Arbo, amigo e colega nas aulas; à Franciele, pela ajuda sempre que necessária.
- Ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
- Aos professores e funcionárias do departamento de Farmacologia.
- À CAPES pela bolsa de estudo.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
<i>Abstract</i>	xv
Apresentação	1
1. Introdução	3
1.1. Esquizofrenia	3
1.1.1. Bases Neuroquímicas	4
1.1.2. Antipsicóticos	7
1.2. Etnofarmacologia	11
1.3. Alstonina	14
2. Objetivos	19
2.1. Objetivos Gerais	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. Artigos Científicos	21
3.1. The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice.	22
3.2. Alstonine as antipsychotic: effects on brain amines and metabolic changes.	35
4. Discussão	55
5. Conclusão	63
6. Referências Bibliográficas	65
7. ANEXO - Carta de aprovação do comitê de ética	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1 – Estrutura do alcalóide alstonina.	15
Artigos Científicos	
Artigo 3.1	
Figura 1: Effects of haloperidol, clozapine and alstonine acute and sub-chronic treatments in mice social interaction.	33
Figura 2: Effects of clozapine, sulpiride and alstonine on the MK801-induced social withdrawal in mice.	34
Artigo 3.2	
Figura 1: Effects of alstonine in DA and its metabolites in frontal cortex and striatum.	49
Figura 2: Effects of alstonine in 5HT and its metabolite in frontal cortex and striatum.	50
Figura 3: Effects of alstonine and clozapine on glucose levels.	51
Figura 4: Body weight gain of mice treated with alstonine, haloperidol and clozapine	52
Figura 5: Effects of alstonine, clozapine and haloperidol in prolactin levels.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	ácido α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA	análise de variância
CATIE	Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness
DA	dopamina
DAT	transportador de dopamina
DOPAC	3,4-ácido dihidroxifenilacético
DSM IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4 ^o edição
GABA	ácido gama-amino butírico
GLUT	transportador de glicose
5HT	serotonina
5HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HVA	ácido homovanílico
i.c.v.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitoneal
MAO	monoaminoxidase
MK801	dizocilpina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC	sistema nervoso central
VMAT	transportador vesicular de monoaminas
v.o.	via oral

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave, caracterizado por distúrbios do pensamento, prejuízo da lógica, alterações cognitivas e emocionais, e/ou isolamento social. Apesar da introdução de novos antipsicóticos, um grupo considerável de pacientes ainda é refratário aos tratamentos disponíveis. Além disso, a alta incidência de efeitos adversos leva à baixa adesão ao tratamento em esquizofrênicos. O desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menor incidência de efeitos adversos, que aumentem a adesão ao tratamento e melhorem a qualidade de vida destes pacientes, é assim altamente desejável. Em uma expedição etnofarmacológica entre os Igbo na Nigéria identificou-se uma preparação a base de plantas usada no tratamento de pacientes com distúrbios mentais. O alcalóide indólico alstonina é o componente majoritário desta preparação, e possui um claro perfil comportamental de antipsicótico atípico em modelos animais de sintomas positivos, com aparentes vantagens em relação à clozapina. Este trabalho teve o objetivo principal de dar continuidade à caracterização de alstonina como fármaco antipsicótico. Demonstramos que este alcalóide aumenta a interação social e previne o déficit de interação social induzido por MK801 em camundongos, sugerindo utilidade da alstonina no manejo de sintomas negativos da esquizofrenia. Quanto ao mecanismo de ação, a avaliação do efeito de alstonina sobre as aminas biogênicas em córtex frontal e estriado de camundongos sugere que este alcalóide potencia a transmissão serotoninérgica e aumenta o catabolismo intraneuronal de dopamina. Quanto aos possíveis efeitos adversos, dados preliminares mostram que alstonina não altera os níveis de prolactina, não induz ganho de peso corporal, mas impede a diminuição da glicemia induzida por jejum. Este trabalho confirma o perfil antipsicótico de alstonina bem como a possibilidade de um mecanismo de ação inovador. Os resultados justificam investimento em novos estudos, quer seja para o desenvolvimento de alstonina como fármaco, quer no sentido de trazer inovação farmacodinâmica tão necessária para avançar no tratamento da esquizofrenia.

Palavras-chaves: alstonina, esquizofrenia, sintomas negativos, aminas biogênicas.

ABSTRACT

Antipsychotic profile of alstonine: action in animal models of negative symptoms, alterations in biogenic amines and side effects in mice.

Schizophrenia is a serious psychiatric illness, characterized by alterations in thought, deficits in logical thinking, changes in cognition and emotion, and/or social isolation. Despite the introduction of newer antipsychotic drugs, a sizable number of patients are still refractory to the available medication. Moreover, the high incidence of side effects determines the low adhesion of patients to treatments. The development of more efficacious treatments with lower incidence of side effects, ameliorating adhesion to treatment and improving patient's quality of life is, therefore, sorely wanted. During an ethnopharmacological expedition among the Igbo in Nigeria, a plant based treatment to mentally ill patients was identified. The indole alkaloid alstonine is the major component of this remedy and shown to have a clear behavioral profile of an atypical antipsychotic in rodent models, apparently with advantages in comparison to clozapine. This study had the main purpose of continuing the characterization of alstonine as an antipsychotic drug. We show that this alkaloid increases social interaction and prevents MK801-induced social withdrawal in mice, pointing to its utility in managing negative symptoms of schizophrenia. Regarding its mechanism of action, the effects of alstonine on biogenic amines in mice frontal cortex and striatum suggest that it enhances serotonergic neurotransmission and increases the intra neuronal catabolism of dopamine. In relation to possible side effects, preliminary data suggest that alstonine does not affect prolactin levels, does not induce gains in body weight, but prevents the expected fasting-induced decrease in glucose levels. This study corroborates the antipsychotic profile of alstonine, as well as the possibility of an innovative mechanism of action. These results justify further studies either to develop alstonine as a medication, or to bring pharmacodynamic innovation so sorely needed to move forward in the treatment of schizophrenia.

Keywords: alstonine, schizophrenia, negative symptoms, biogenic amines.

APRESENTAÇÃO

Conforme resolução Nº 093/2007 da Câmara de Pós-Graduação desta universidade, essa dissertação é constituída por Introdução, Objetivos, Artigos Científicos submetidos ou a serem submetidos, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas. O item **1. Introdução** oferece o embasamento teórico necessário para a formulação dos objetivos e para o desenvolvimento da metodologia empregada nesta dissertação. O item **2. Objetivos** define a hipótese de trabalho e as estratégias metodológicas utilizadas. No item **3. Artigos Científicos** são encontrados os artigos científicos (material e método, resultados e discussão dos resultados encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo). O item **4. Discussão** contém interpretações e comentários gerais pertinentes aos resultados apresentados no item 3, e aponta perspectivas para continuidade do trabalho. O item **5. Conclusões** apresenta as conclusões gerais. O item **6. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na introdução e discussão (referências bibliográficas que se referem a materiais e métodos, resultados e discussão parcial encontram-se nos artigos do item 3).

Introdução

1.1. Esquizofrenia

Caracterizar a doença esquizofrenia é bastante difícil uma vez que os pacientes esquizofrênicos apresentam grande diversidade de sintomas dentro de um espectro de diferentes intensidades. Além disso, a esquizofrenia apresenta um conjunto de sintomas que refletem alterações em múltiplos processos mentais, o que faz com que cada paciente desenvolva essa psicose de maneira muito particular (ANDREASEN, 2000).

A doença foi descrita pela primeira vez por Kraepelin, em seu livro texto de 1893, como *dementia praecox* por causar um sério comprometimento cognitivo em pacientes relativamente jovens. Em 1911, Bleuler trocou o termo por esquizofrenia que descreveu como um grupo de psicoses caracterizadas por alterações específicas de pensamento, sentimentos e relação com o mundo (BAN, 2004). Atualmente o DSM-IV classifica a esquizofrenia, para fim de diagnóstico, como uma perturbação com duração mínima de 6 meses com a presença de delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento amplamente desorganizado ou catatônico, bem como a falta de afeto e comprometimento cognitivo (DSM-IV-TR, 2003).

Os principais sintomas da esquizofrenia são classicamente divididos em positivos e negativos. Os sintomas positivos incluem alucinação (visual e auditiva), delírios (geralmente do tipo paranóide) e distúrbios de pensamento; já os sintomas negativos abrangem emoções embotadas ou impróprias à situação, timidez excessiva e isolamento social entre outros (ANDREASEN, 2000; BALDESSARINI, 1996; RANG *et al.*, 2004). A atividade cognitiva do esquizofrênico é anormal, apresentando incoerências e desconexões de raciocínio, com grande repercussão na linguagem (AKDEDE *et al.*, 2005; TERENIUS, 2000). Atualmente os sintomas cognitivos são incluídos na própria caracterização da doença (PINKHAM *et al.*, 2003).

A prevalência da esquizofrenia estimada para o Brasil e para a população mundial é de 1% (MARI e LEITÃO, 2000; ANDREASEN, 2000). A taxa de suicídio estimada entre esses pacientes chega a 10% (ANDREASEN, 2000) e em um levantamento realizado com 131 pacientes esquizofrênicos foi demonstrado que destes apenas 50,4% estavam empregados e que 97% não haviam casado ou constituído família (HASSON-OHAYON *et al.*, 2006). Heckert e colaboradores (1999) mostraram que 9,6% dos moradores de rua da cidade de Juiz de Fora no estado de São Paulo possuíam essa patologia. Estes dados ilustram o quão devastadora é a doença e indicam que a esquizofrenia tornou-se também um problema de saúde pública.

A causa, ou as causas, da esquizofrenia ainda não estão totalmente esclarecidas. Fatores hereditários são relevantes, uma vez que parentes de primeiro grau de um esquizofrênico têm maior chance de desenvolver a doença do que pessoas em geral. Fatores ambientais (p.ex., complicações da gravidez e do parto, infecções, entre outros) que possam alterar o desenvolvimento do sistema nervoso no período de gestação parecem também ter importância nesse transtorno (TERENIUS, 2000). Por exemplo, tem sido sugerido que a asfixia neonatal além de induzir possível diminuição do hipocampo, interagiria com genes que aumentam a susceptibilidade à esquizofrenia (HAAN *et al.*, 2006). A doença inicia geralmente no princípio da vida adulta e é mais predominante em homens, que, em geral, também apresentam formas mais severas da doença (ANDREASEN, 2000).

1.1.1. Bases neuroquímicas

Alterações nos sistemas neurotransmissores desencadeiam a série de sintomas observados em pacientes esquizofrênicos e ao longo das últimas décadas várias teorias surgiram para tentar explicar a gênese da diversidade desses sintomas. No final dos anos 50 surgiu a primeira hipótese sobre as bases neuroquímicas da esquizofrenia. A hipótese dopaminérgica baseou-se nas observações clínicas de então, visto que agonistas dopaminérgicos (anfetamina, apomorfina, etc) produziam em indivíduos normais sintomas muito parecidos com o que era visto em pacientes esquizofrênicos (principalmente sintomas positivos)

enquanto que antagonistas dopaminérgicos, como haloperidol, recém introduzidos na clínica, diminuam os sintomas da doença (MATTHYSE, 1973). A hipótese propunha que existiria em esquizofrênicos um aumento da transmissão dopaminérgica subcortical que geraria, sobretudo, os sintomas positivos da esquizofrenia (CARLSSON e LINDQVIST, 1963).

No entanto essa hipótese não conseguia explicar os chamados sintomas negativos e nem o déficit cognitivo. Nessa lacuna surgiu a hipótese glutamatérgica da esquizofrenia, proposta na década de 80. Antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA (como fenciclidina e cetamina) produzem efeitos psicomiméticos similares aos sintomas positivos em pessoas saudáveis e pioram os sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos. Além disso, em modelos animais esses antagonistas conseguem reproduzir sintomas positivos, negativos e déficits cognitivos (POWEL e MIYAKAWA, 2006). Essas evidências levaram à hipótese da existência de um déficit na função de receptores glutamatérgicos NMDA e/ou na transmissão glutamatérgica como causa primária do transtorno esquizofrênico (OLNEY e FARBER, 1995). Corroborando essa proposição estudos demonstram que camundongos com expressão reduzida de receptores NMDA apresentam comportamentos relacionados com a esquizofrenia (MOHN *et al.*, 1999) e estudos *post mortem* apontam para a presença de alterações em receptores NMDA de pacientes esquizofrênicos (KRISTIANSEN *et al.*, 2007).

No entanto, é pouco provável que um único neurotransmissor ou receptor seja responsável pelas diversas alterações observadas na esquizofrenia, ou que o padrão de alteração se mantenha durante o curso natural da doença. Além disso, a co-modulação existente entre os diversos sistemas de neurotransmissores torna ainda menos plausível a proposta de que um único sistema possa ser o responsável pela doença. Observações clínicas são úteis na compreensão do que ocorre na neurotransmissão de pacientes esquizofrênicos, assim como também o uso de técnicas de neuroimagem tem possibilitado uma nova avaliação do sistema dopaminérgico destes pacientes (ABI-DARGHAM, 2004).

Há aproximadamente 10 anos, baseando-se em novas evidências, a antiga teoria dopaminérgica foi reformulada dando lugar à idéia hoje mais aceita sobre as bases neuroquímicas da esquizofrenia. Acredita-se que ocorra um desequilíbrio

cortical/subcortical no sistema dopaminérgico: uma hiperatividade ocorreria nas projeções dopaminérgicas mesolímbicas, com hiperestimulação de receptores D_2 , resultando nos chamados sintomas positivos; já as projeções dopaminérgicas mesocorticais, especialmente para o córtex pré-frontal, estariam hipoativas, com conseqüente hipoestimulação de receptores D_1 , resultando em sintomas negativos comprometendo a cognição e a sociabilidade (ABI-DARGHAM, 2004; HALEEM *et al.*, 2004). Esse desequilíbrio em um mesmo sistema neurotransmissor é possível já que as vias dopaminérgicas corticais e subcorticais são moduladas de forma diferente por glutamato, serotonina e GABA, e alterações nesses neurotransmissores poderiam comprometer a função adequada do sistema dopaminérgico. Assim, seria de interesse a disponibilidade de fármacos que conseguissem atuar diferente ou seletivamente nas várias vias dopaminérgicas (ABI-DARGHAM, 2004; DI MATTEO *et al.*, 2002; LUCAS e SPAMPINATO, 2001).

Modular indiretamente a função dopaminérgica pode ser útil neste sentido. Por exemplo, receptores serotoninérgicos atuam de maneira distinta no sistema dopaminérgico: enquanto receptores $5HT_{2A}$ estimulam a liberação de dopamina nas vias mesolímbica e mesocortical, receptores $5HT_{2C}$ inibem a transmissão nessas vias. Na via mesocortical esse efeito pode ser direto em neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral ou através da modulação GABA e glutamato. Agonistas $5HT_{2A}$ estimulam a liberação de glutamato no córtex frontal medial, e o glutamato através de receptores AMPA estimula as projeções corticotegmentais aumentando a atividade dopaminérgica mesocortical; já os receptores $5HT_{2C}$ localizados em interneurônios GABAérgicos estimulam a liberação de GABA que acaba inibindo a liberação de dopamina mesocortical (ALEX e PEHEK, 2007). Modulações como estas não só mostram a complexidade de se identificar um único sistema neurotransmissor como causador do desequilíbrio de dopamina presente na esquizofrenia, mas também abrem portas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que modulem seletivamente as vias dopaminérgicas.

Outras modulações também são relevantes para a patofisiologia da esquizofrenia, como as resultantes da interação glutamato-dopamina. A natureza exata da relação entre esses sistemas ainda não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que projeções glutamatérgicas modulam dopamina no córtex, enquanto que

a própria dopamina pode modular as projeções glutamatérgicas no hipocampo (STONE *et al.*, 2007). Além disso, os receptores glutamatérgicos NMDA e dopaminérgicos D₁ apresentam uma forte relação, incluindo co-localização em espinhas dendríticas e estabilização de isoformas mais ativas, sugere-se que ocorra uma cooperação entre esses dois receptores no mesmo terminal sináptico, assim déficits no funcionamento de receptores D₁ podem alterar a atividade de receptores NMDA e vice-versa (CEPEDA e LEVINE, 2006).

Outros sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores também podem estar alterados na esquizofrenia e geraram hipóteses alternativas quanto às bases neuroquímicas da doença. É o caso da adenosina, um neuromodulador proveniente do sistema purinérgico, que modula negativamente a atividade de diversos neurotransmissores, incluindo dopamina e glutamato. Os receptores adenosinérgicos A₁ são inibitórios produzindo hiperpolarização, diminuindo assim a liberação de dopamina, glutamato, serotonina, noradrenalina e acetilcolina; além disso, apresentam relação negativa com receptores dopaminérgicos D₁. Os receptores adenosinérgicos A_{2a} são excitatórios e possuem relação negativa com receptores D₂ (BRUNDEGE e DUNWIDDIE, 1997; JACOBSON e GAO, 2006). Com base em evidências experimentais e observações clínicas foi proposta a hipótese purinérgica da esquizofrenia, segundo a qual uma redução na atividade do sistema adenosinérgico resultaria em alterações no sistema dopaminérgico de pacientes esquizofrênicos (LARA e SOUZA, 2000).

1.1.2. Antipsicóticos

A classe específica de medicamentos para o tratamento de esquizofrenia é relativamente nova. Até o início dos anos 50 não haviam fármacos usados para o tratamento da doença e tão pouco havia base racional para procura por tais agentes. Foi nesse contexto que surgiram os dois primeiros fármacos para o tratamento da esquizofrenia, clorpromazina na Europa e reserpina nos Estados Unidos. Ambas as descobertas foram de caráter serendípico, ou seja, com ajuda do acaso. A clorpromazina foi sintetizada inicialmente como anti-histamínico para uso pré-cirúrgico, mas os relatos de que os pacientes apresentavam um peculiar estado de

tranqüilidade com desinteresse pelo entorno, fez com os pesquisadores avaliassem sua ação em pacientes esquizofrênicos “agitados”, e assim iniciava-se o uso clínico deste fármaco. Dois anos mais tarde, entrava no mercado o alcalóide reserpina, obtido de *Raulvolfia serpentina* utilizada durante séculos no sistema Ayurveda da medicina tradicional indiana. Esses primeiros fármacos foram inicialmente chamados de tranqüilizantes maiores, e mais tarde de neuroléticos, já que induziam a chamada síndrome neurolética, caracterizada por catalepsia e dificuldades motoras. Somente duas décadas após a descoberta da clorpromazina e da reserpina que surgiu o termo antipsicótico (KAPUR e MAMO, 2003). Reserpina há muito não é mais utilizada como antipsicótico, teve papel no manejo da hipertensão arterial sistêmica, uso que também ficou obsoleto com o advento de melhores fármacos; já a clorpromazina continua a ser usada no tratamento da esquizofrenia.

Os antipsicóticos são hoje divididos em duas classes: típicos (ou clássicos) e atípicos (ou novos). Os fármacos típicos, primeiros a serem introduzidos na terapêutica (como por exemplo, clorpromazina, haloperidol e tioridazina) são predominantemente antagonistas dopaminérgicos, principalmente de receptores do tipo D₂ (BALDESSARINI, 1996). Apesar da relativa melhora dos sintomas, especialmente os positivos, o bloqueio de receptores dopaminérgicos também induz vários efeitos adversos: efeitos extrapiramidais causados pelo bloqueio desses receptores na via nigro-estriatal, e alterações nos níveis de prolactina causado principalmente pelo bloqueio de receptores dopaminérgicos na via tuberoinfundibular. Além disso, em geral exercem pouco efeito sobre os sintomas negativos e cognitivos (GARDNER *et al.*, 2005).

Os antipsicóticos atípicos ou de “segunda geração” (como por exemplo, clozapina, riperidona, olanzapina, etc), atuam em diversos sistemas de neurotransmissores e em relação aos clássicos possuem menor afinidade por receptores dopaminérgicos D₂; como consequência, estes apresentam menor incidência de efeitos extrapiramidais e em geral não alteram os níveis de prolactina. A denominação atípica vem justamente do fato de que esses fármacos apresentam um comportamento atípico em relação ao padrão dos agentes clássicos, não induzindo síndrome neurolética em humanos ou induzindo catalepsia em modelos experimentais (KAPUR e MAMO, 2003). Além da óbvia vantagem da diminuição de

efeitos extrapiramidais, foi inicialmente sugerido que esses novos compostos fossem eficazes quanto aos sintomas negativos. Com isso, a introdução destes novos fármacos no manejo de esquizofrenia foi acompanhada de grande expectativa. Infelizmente, no entanto, muitos pacientes também não respondem a esses medicamentos, o efeito sobre sintomas negativos não se mostrou tão robusto e há pouco efeito sobre os sintomas cognitivos (MURPHY *et al.*, 2006). Além disso, o uso de medicamentos desta classe está associado ao desenvolvimento do diabetes e outras alterações metabólicas (aumento de peso e hipercolesterolemia) (GARDNER *et al.*, 2005). Embora ainda não estejam totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais esses efeitos adversos ocorrem, sabe-se que alguns fármacos como clozapina e a risperidona são capazes de inibir transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT3) (DWYER e DONOHOE, 2003). Além dos efeitos comuns à classe dos atípicos, a clozapina provoca agranulocitose em 3-5% dos pacientes (BHANJI *et al.*, 2003)

Antipsicóticos típicos e atípicos ainda podem ser classificados quanto a sua estrutura química, conforme a tabela 1. Cabe notar que típicos e atípicos de todas as classes possuem em comum a propriedade de bloquear receptores D₂, ainda que com diferentes afinidades. Por isso esse bloqueio ainda é considerado por vários autores como essencial para o efeito antipsicótico (KAPUR e MAMO, 2003).

Tabela 1: Classes de antipsicóticos.

Antipsicóticos típicos		Antipsicóticos atípicos	
Classe	Fármaco	Classe	Fármaco
Fenotiazinas 1. Alifáticas 2. Piperidínicas 3. Piperazínicas	Clorpromazina	Benzamidas	Sulpirida Amisulprida
	Levopromazina	Dibenzodiazepínicos	Clozapina Olanzapina
	Tioridazina		
	Flufenazina	Benzisoxazóis	Risperidona
	Trifluoperazina	Fenilindólico	Sertidol
	Perfenazina	Dibenzotiazepínico	Quetiapina
Butirofenonas	Haloperidol	Dibenzotiepina tricíclico	Zotepina
	Droperidol	Benzisotiozil piperazina	Ziprasidona
	Triperidol		
Tioxantenos	Tiotixeno		

Recentemente um extenso ensaio clínico conhecido como CATIE, procurou comparar antipsicóticos típicos (perfenazina) com os novos atípicos (olanzapina, quetiapina e risperidona). A pesquisa mostrou que em um total de 1493 pacientes, 74% abandonaram o tratamento devido aos efeitos adversos: principalmente ganho de peso e aumento da glicemia com fármacos atípicos, e efeitos extrapiramidais com perfenazina. Uma observação surpreendente é que embora os efeitos extrapiramidais tenham sido a principal causa para interrupção do uso de perfenazina, não houve diferença significativa entre a incidência deste efeito adverso entre fármacos típicos e atípicos. Além disso, quanto à eficácia do tratamento antipsicótico, o estudo concluiu que cada paciente responde de maneira muito particular à medicação, uma mesma terapia podendo ou não ser eficaz em diferentes pacientes (LIEBERMAN *et al.*, 2005). Mesmo ainda havendo alguns pacientes não respondentes, a clozapina é o antipsicótico mais utilizado em pacientes refratários e que parece apresentar melhor resposta quanto a sintomas negativos, no entanto estudos quanto a sua eficácia frente a esses sintomas ainda são contraditórios (MURPHY *et al.*, 2006). Infelizmente, seu uso aumenta em quatro vezes os riscos de desenvolver diabetes, além de estar associado com aumento nos níveis de colesterol e triglicérides, indução de agranulocitose e ainda convulsões devido a seu caráter epileptogênico (LEAN e PANJOK, 2003; BHANJI *et al.*, 2003).

A necessidade de fármacos seletivos quanto as diferentes vias dopaminérgicas, e o reconhecimento de que a liberação de dopamina é afetada diferentemente por subtipos de receptores serotoninérgicos dependendo da via dopaminérgica, resultou em interesse renovado por agentes serotoninérgicos. Conforme detalhado acima, no córtex pré-frontal a liberação de dopamina é dependente de serotonina, envolvendo particularmente receptores serotoninérgicos 1_A, 2_A e 2_C (ALEX e PEHEK, 2007). No entanto esses receptores não alteram significativamente a transmissão dopaminérgica nas vias nigroestriatal e tuberoinfundibular, o que poderia minimizar os efeitos extrapiramidais e hormonais causados pelos antipsicóticos clássicos (DI MATTEO *et al.*, 2002). Sugere-se que a combinação adequada de efeitos em diferentes receptores serotoninérgicos poderia normalizar a transmissão dopaminérgica, melhorando sintomas positivos, negativos e cognitivos (ALEX e PEHEK, 2007). Seguindo o mesmo raciocínio de modulação seletiva e indireta, outros sistemas, como colinérgico, glutamatérgico, GABAérgico,

opióide e endocanabinóide, também tem sido alvo de interesse no desenvolvimento de novos fármacos antipsicóticos (STONE e PILOWSKY, 2007).

O aparecimento e/ou agravamento dos efeitos adversos, bem como ausência de melhora de alguns sintomas, determinam baixa adesão de esquizofrênicos ao tratamento. A falha no controle da doença é extremamente deletéria tanto para o paciente como para sua família, já que como mencionado o índice de suicídio nesses pacientes está aumentado, poucos se casam e a maioria não trabalha (SCHULTZ *et al.*, 2007). Tratamentos mais eficazes e com menor incidência de efeitos adversos poderiam aumentar a adesão ao tratamento e melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Desta forma o investimento na busca por novos antipsicóticos é plenamente justificável.

1.2. Etnofarmacologia

Uma das estratégias utilizadas na procura de novas moléculas farmacologicamente ativas é a Etnofarmacologia, onde são examinadas as propriedades terapêuticas alegadas por usuários e especialistas de sistemas de medicina tradicional para práticas medicinais caseiras, especialmente as preparações a base de plantas (FARNSWORTH *et al.*, 1985).

A definição mais utilizada para etnofarmacologia é a de Holmstedt e Bruhn (1983): “Etnofarmacologia é a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos tradicionalmente empregados ou observados pelo homem”. A etnofarmacologia não é apenas o estudo de plantas medicinais, mas uma abordagem que leva em consideração o contexto cultural dos diferentes grupos étnicos relevante ao uso tradicional de preparações, sejam elas de origem vegetal ou animal, com finalidade medicinal (ELISABETSKY e POSEY, 1985). Os estudos etnofarmacológicos possuem a característica de serem multidisciplinares, ocorrendo a interação de conhecimentos antropológicos, necessários para a compreensão dos povos estudados, com conhecimentos farmacológicos, botânicos, fitoquímicos entre outros (ETKIN e ELISABETSKY, 2005).

Para melhor entender o que é etnofarmacologia e etnobotânica, e no contexto desta dissertação, voltamos ao caso da reserpina. Na região do Himalaia cresce um pequeno arbusto, chamado de *chotachand* no idioma local, utilizado na região contra picada de cobra. A lenda local conta que os pequenos mangustos (mamíferos comuns da região) alimentam-se dessa planta antes de suas batalhas com as cobras, e teria sido a partir dessa observação que passou-se a utilizar a *chotachand* quando alguém fosse picado por cobra. No século 18, botânicos denominaram esse arbusto de *Rauvolfia serpentina*, relacionando seu nome com o uso local. O voucher da espécie foi levado para o herbário de Leydem na Holanda, e ali esquecida pelos pesquisadores; no entanto o arbusto nunca foi esquecido pela população local que continuou a usá-lo. A lenda continua contando que na província de Bihar (Índia) um homem demente comeu a raiz dessa planta e viu-se curado de sua loucura, levando as pessoas desta região a utilizar a planta para tratar insanidade, epilepsia e insônia. Ali o arbusto passou a ser chamado de *pagal-kadawa*, “cura para insanidade”, e esse uso espalhou-se pela Índia, passando a fazer parte do sistema Ayurveda de medicina. No entanto o pó da *Rauvolfia* além de possuir efeito hipnótico e sedativo, diminui drasticamente a pressão arterial. Somente em 1949, Emil Schmitter fez o primeiro estudo clínico com *Rauvolfia* e isolou o alcalóide reserpina que passou a ser utilizado para manejo de hipertensão e esquizofrenia (BALICK e COX, 1996).

A descoberta da reserpina deve ser atribuída à ciência e a química que isolou o alcalóide ou ao conhecimento e observação do povo da região do Himalaia? Se a ciência é a aquisição de conhecimento através da observação e da experimentação para comprovar uma dada hipótese construída, a diferença entre a ciência moderna e o conhecimento indígena deve estar justamente na verificação empírica e nas explicações com base em superstições, religiosidade e cosmovisão. Cada vez que um curandeiro utilizava *Rauvolfia* no tratamento de mordida de cobra ele testava, empiricamente, a observação feita com os mangustos. Assim, talvez o conhecimento popular ou indígena esteja mais próximo da ciência moderna do que se imagina, se considerarmos que o que confere valor científico a um dado conhecimento é justamente a possibilidade de verificá-lo experimentalmente.

Existem evidências que praticamente todos os povos primitivos utilizavam preparações a base de plantas para assegurar sua sobrevivência. Um levantamento recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostrou que 80% da população mundial ainda recorrem a preparações tradicionais no cuidado primário à saúde (GILANI e RAHMAN, 2005). Esse dado somado ao milionário mercado de medicamentos fitoterápicos demonstra o quão corriqueira é a utilização de plantas medicinais ainda nos tempos atuais. O estudo do uso das plantas no contexto cultural dos povos é o que chamamos de etnobotânica, e dentro deste contexto se encontra a etnofarmacologia. O que distingue essas ciências de suas classes originárias é o estudo das comunidades e de seus hábitos culturais, enquanto a botânica estuda qualquer espécie vegetal a etnobotânica estuda as plantas tal como utilizadas pelas pessoas, e a etnofarmacologia as plantas que essas pessoas utilizam com finalidade medicinal (BALICK e COX, 1996).

Exaustiva é a lista de fármacos utilizados hoje que possuem origem vegetal. Ácido acetilsalicílico, atropina, artemisina, digoxina, morfina, fisiostigmina, pilocarpina, quinina, quinidina, taxol, tubocurarina, vincristina e vimblastina são apenas alguns exemplos de produtos de origem vegetal, utilizados hoje em dia para vários tipos de patologias. Além disso, a maioria das classes de medicamentos possui como molécula protótipo uma substância de origem vegetal, demonstrando a importância e a utilidade em se estudar compostos naturais (GILANI e RAHMAN, 2005).

A investigação de espécies vegetais com alegado uso tradicional pode constituir um atalho valioso na obtenção de novos fármacos, uma vez que já se têm indicação de biodisponibilidade e uma idéia preliminar da toxicidade das substâncias ativas presentes. Além disso, a etnofarmacologia parece ser particularmente útil em doenças nas quais as bases fisiopatológicas não estão completamente esclarecidas, uma vez que o desenho racional de fármacos fica impossibilitado sem a definição do alvo a ser atingido.

1.3. Alstonina

O estudo da alstonina foi originado a partir de uma expedição etnofarmacológica, realizada em fevereiro de 1993, pela Shaman Pharmaceuticals à Nigéria. Um médico tradicional nigeriano, Dr. Chidi Osondu, considerado psiquiatra tradicional, foi visitado em sua clínica destinada a curar pacientes com “demência” e “loucura”. Ele destacou o uso de uma planta medicinal chamada “uhuma obi-nwoke”, que significa “coração de homem” no idioma Igbo, para o tratamento de diferentes tipos de “loucura”, epilepsia e como sedativo (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1999). O Dr. Chidi não permitiu a identificação da planta, mas concedeu uma amostra (45 gramas) do pó de material seco de seu estoque para ser analisado em laboratório. Desse material foi produzido um extrato bruto aquoso (SP49000), analisado pelo nosso laboratório quanto a sua atividade psicofarmacológica, objetivando particularmente detectar uma possível atividade antipsicótica (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006).

Esse extrato teve ação tanto por via intraperitoneal como por via oral, em camundongos, nos testes de potencialização de sono induzido por pentobarbital, diminuição da temperatura corporal, proteção contra letalidade induzida por d-anfetamina em animais agrupados, prevenção de catalepsia induzida por haloperidol, bloqueio do comportamento estereotipado induzido por apomorfina e d-anfetamina (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1999),

Estudos fitoquímicos do extrato SP49000 identificaram o alcalóide alstonina como componente majoritário. Alstonina (Figura 1) é um alcalóide indólico tipo heteroioimbina (3, 4, 5, 6, 16, 17-hexadeidro-16-(metoxicarbonil)-19-alfa-metil-20alfa-oxaioimbanium) (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1999; ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006). Em modelos animais, a alstonina apresentou perfil claramente antipsicótico com curva dose-efeito na forma de U invertido (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998).

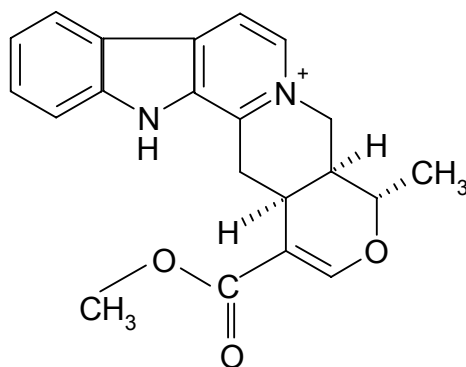


Figura 1: Fórmula estrutural do alcalóide alstonina

O modelo de letalidade induzida por anfetamina em camundongos agrupados é considerado específico para drogas com atividade antipsicótica, já que apenas antipsicóticos previnem a letalidade assim induzida, o que não acontece com tranqüilizantes como barbitúricos e benzodiazepínicos (BOURIN *et al.*, 1986). Esse efeito é atribuído à capacidade dos antipsicóticos de bloquear receptores D₂. Alstonina preveniu a letalidade induzida por anfetamina em doses entre 0,5 e 2,0 mg/Kg por via intraperitoneal (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998).

No modelo de comportamento estereotipado induzido por apomorfina a alstonina foi eficaz, sugerindo uma interação com receptores dopaminérgicos. Esse modelo é seletivo para fármacos com afinidade por receptores dopaminérgicos, entretanto fármacos com menor afinidade por esses receptores, como a clozapina, também demonstram eficácia nesse teste. Já no modelo de estereotipia induzida por anfetamina, alstonina, assim como clozapina, não preveniu a indução de estereotipia (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998), diferindo assim dos efeitos do extrato original (SP49000).

O teste de catalepsia induzida por haloperidol possui valor preditivo quanto à indução de efeitos adversos extrapiramidais. Alstonina, assim como clozapina e sulpirida preveniu a catalepsia induzida por haloperidol, demonstrando um perfil similar a antipsicóticos atípicos (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998; ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006).

Em ensaios neuroquímicos de *binding* (união específica a receptor), alstonina não apresentou afinidade por receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ e serotoninérgicos 5-HT_{2A} (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998). Mesmo tendo comportamento similar aos antipsicóticos atípicos nos modelos comportamentais alstonina diferiu desses nesses ensaios neuroquímicos. Cabe ressaltar, no entanto, que esses ensaios utilizaram cérebro total e foram realizados *in vitro*, não podendo se excluir a possibilidade de se obter resultados diversos com ensaios mais específicos.

Alstonina também foi avaliada quanto a propriedades ansiolíticas, já que a ansiedade é um sintoma comum em pacientes esquizofrênicos, podendo ser considerada como um aspecto da psicose (NORMAN e MALLA, 1991). Alstonina apresentou efeito ansiolítico nos testes de claro/escuro e placa perfurada nas mesmas doses em que possui efeito antipsicótico. Sua atividade ansiolítica foi revertida pela administração prévia de ritanserina (antagonista serotoninérgico) indicando o envolvimento de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C} (COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004a). A eficácia clínica de clozapina e olanzapina, principalmente sobre sintomas negativos, tem sido atribuída à capacidade desses dois fármacos de atuarem como agonistas inversos dos receptores 5-HT_{2C} (RAUSER *et al.*, 2001). Sugere-se, portanto que alstonina compartilha com clozapina e olanzapina propriedades farmacológicas dinâmicas que diferenciam estes compostos como os de maior eficácia no tratamento de sintomas negativos da esquizofrenia. A atuação de alstonina como agonista inverso de receptores 5-HT_{2C} é coerente com a ausência de atividade no modelo de nado forçado em camundongos, e aponta para uma modulação indireta do sistema dopaminérgico compatível com os dados de *binding* e estereotipia (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006).

Um problema adicional encontrado com antipsicóticos é a indução de convulsões (ALLDREDGE, 1999). Através do teste de *kindling* foi demonstrado que alstonina, ao contrário de clozapina, não apresenta atividade pró-convulsivante. É pouco provável o envolvimento da transmissão GABAérgica nesse resultado, já que a atividade ansiolítica de alstonina na placa perfurada não é antagonizada pela administração prévia de picrotoxina (antagonista GABA_A) (COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004a,b).

Finalmente, alstonina atenuou a hiperlocomoção induzida por MK801 (antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) (COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004a). No entanto, alstonina não alterou a liberação de [H^3]glutamato em sinaptossomas de córtex cerebral de rato, sugerindo que ela não possui papel facilitador da transmissão glutamatérgica por este mecanismo (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006). Os modelos comportamentais também não indicam uma atividade agonista direta ou diminuição de captação no sistema glutamatérgico, já que alstonina não produz efeitos similares aos vistos com NMDA, como por exemplo, convulsão. Sendo assim, pode-se argumentar que a alstonina possa modular indiretamente o sistema glutamatérgico, o que novamente é possível através da atividade acima proposta no sistema serotoninérgico (ELISABETSKY e COSTA-CAMPOS, 2006), já que antagonistas de receptores 5-HT₂ aumentam a transmissão glutamatérgica mediada por receptores NMDA (BREESE *et al.*, 2002; XIA, 2003).

Portanto, a análise integrada dos dados experimentais até aqui disponíveis sugere que a hipótese mais provável quanto ao mecanismo de ação da alstonina seja através de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A,C}. No entanto são obviamente necessários mais estudos para que se comprove a veracidade dessa hipótese.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Esse estudo teve por objetivo complementar o perfil antipsicótico de alstonina, verificando seu efeito em modelos animais de sintomas negativos, dando continuidade ao esclarecimento de seu mecanismo de ação, e verificando a indução de alguns efeitos adversos comuns a outros antipsicóticos.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade de alstonina sobre o modelo de interação social em camundongos;
- b) Avaliar a atividade de alstonina sobre o modelo de isolamento social induzido por MK801 em camundongos;
- c) Verificar a atividade de alstonina sobre o metabolismo central de dopamina em córtex frontal e estriado de camundongos, através da determinação dos níveis de dopamina, e metabólitos (DOPAC e HVA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- d) Verificar a atividade de alstonina sobre o metabolismo central de serotonina em córtex frontal e estriado de camundongos, através da determinação dos níveis de serotonina e metabólito (5HIAA) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- e) Verificar se a alstonina induz ganho de peso, altera níveis glicêmicos e os de prolactina em camundongos.

3. Artigos Científicos

3.1. Linck, VM; Herrmann, AP; Goerck, GC; Iwu, MM; Okunji, CO; Leal, MB; Elisabetsky, E. **The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice** (submetido à revista Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry).

The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice.

Viviane de Moura Linck ^{1,2*}, Ana Paula Herrmann ¹, Greice Catrine Goerck ¹, Maurice M. Iwu ³, Christopher O. Okunji ³, Mirna Bainy Leal ¹, Elaine Elisabetsky ^{1,2}

¹. Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. Av. Av. Ipiranga, 2752, 1º andar, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil

³ International Center for Ethnomedicine and Drug Development, and Bioresources Development and Conservation Programme, University of Nigeria, Nsukka, Nigeria.

* Corresponding author:

Viviane de Moura Linck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS

Rua Sarmiento Leite 500/202, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone/FAX: 55 51 33083121.

vivilinck@gmail.com

Abstract

Negative symptoms of schizophrenia are particularly problematic due to its deleterious impact in patient's social life. The indole alkaloid alstonine, the major component of traditional remedies used for treating mental illnesses in Nigeria, presents a clear antipsychotic profile in mice, as well as anxiolytic properties. Considering that social interaction is the core of negative symptoms, and that anxiolytic drugs can improve social interaction behavior, the aim of this study was to evaluate the effects of alstonine in the social interaction and MK801-induced social withdrawal models in mice. Sub-chronic (but not acute) treatment with alstonine 0.5 mg/kg (but not 1.0mg/kg) significantly increased social interaction in mice. Moreover, MK801-induced social withdrawal was completely prevented by sulpiride (10mg/kg) and alstonine 1.0mg/kg, and partially prevented by alstonine 0.5mg/kg. The study indicates that alstonine not only increases social interaction in normal mice, but also averts social deficits applicable to negative symptoms of schizophrenia. This study reinforces and complements the antipsychotic profile of alstonine, and emphasizes its potential as a drug useful for the management of negative symptoms in schizophrenia.

Keywords: alstonine, antipsychotics, MK80-induced social withdrawal, negative symptoms, social interaction.

Abbreviations: MK801, dizocilpine; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PCP, phencyclidine

Introduction

Schizophrenia is a serious mental illness that critically impairs mental and social functioning (Schultz et al., 2007). Although schizophrenia presents itself in a highly heterogeneous manner, its symptoms are commonly divided into positive and negative types: positive symptoms include delusions, hallucinations, disorganized speech and behavior; negative symptoms include flattened or restricted affect, social isolation and lack of motivation. The paucity of effective treatments for negative symptoms is a particular problem given the deleterious impact in the social life of patients and their families (Stahl and Buckley, 2007). Although negative symptoms may somewhat improve with newer medication (clozapine and sulpiride), they are unfortunately largely refractory even to the newest antipsychotics (Erhart et al., 2006). Relevant to the negative symptoms, a number of schizophrenic patients present anxiety disorders that may contribute for worsening sociability (Tamminga et al., 1998). In fact, it has been suggested that it is the anxiolytic properties of some of the newer antipsychotics (e.g. clozapine) that is beneficial to the management of negative symptoms of schizophrenia (Huppert et al., 2001).

Social interaction measures in rodents are directly analogous to social interaction in humans, and have been therefore used to model both anxiety and negative symptoms of schizophrenia in rodents (Powell and Miyakawa, 2006). Social withdrawal can be induced in rats and mice by glutamate NMDA receptor antagonists (such as phencyclidine, MK801, ketamine), mimicking social isolation of schizophrenic patients and providing an accepted model for negative symptoms (Ellenbroek and Cools, 2000). Interestingly, complex NMDA receptor alterations have been recently recognized to be present in schizophrenic patients, changes likely to be associated with the glutamatergic pathways that are critical for the apparently faulty communication between multiple brain areas in schizophrenia (Kristiansen et al., 2007).

Alstonine is an indole alkaloid identified as the major component of plant-based remedies used for treating mental patients in Nigeria (Costa-Campos et al., 1999). Alstonine presents a clear antipsychotic profile in mice, closer to atypical (clozapine and sulpiride) than to classic agents (chlorpromazine and haloperidol) (Costa-Campos et al. 1998). Moreover, it lacks proconvulsive effects and possesses

anxiolytic properties, apparently involving serotonergic 5HT_{2A/C} receptors (Costa-Campos et al., 2004).

Considering the antipsychotic and anxiolytic properties of alstonine, and the usefulness of these combined properties for treating negative symptoms of schizophrenia, the aim of this study was to evaluate the effects of alstonine in mice social interaction as well as in the MK801-induced social withdrawal model.

Materials and Methods

Animals: Experiments were performed using male (CF1) adult albino mice, received from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) with 2.0 months of age (40-45g). Animals were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions (22 ±1°C, 12 hr-light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water), for at least two weeks before the experiments.

The project was approved by the University ethics committee (approval #2007706) and all procedures were carried out in accordance with institutional policies on experimental animals handling.

Drugs: Alstonine (HCl) was isolated from *Picralima nitida* Th. & H.Dur. (Apocynaceae) by Maurice Iwu and Christopher Okunji (University of Nigeria) as described earlier (Iwu and Court, 1977, Iwu and Klayman, 1992). Clozapine and sulpiride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), MK801 (dizocilpine) from Research Biochemicals International (Natick, MA), and haloperidol was used from commercial Haldol® (Janssen Farmacêutica Ltda, SP, Brazil). Clozapine and sulpiride were solubilized in HCl (0.1N), and pH adjusted for 6.0 with NaOH 0.5N. Other drugs, including alstonine, were diluted in distilled water. All drugs were administered intraperitoneally in a volume of 0.1mL/10g of body weight.

Social Interaction Test:

Acute treatment: The method was adapted from Quiao et al. (2001). Mice were acclimatized to a reverse 12 h light cycle (lights on at 20:00h), housed in 8/cage (familiar group) for 2 weeks before the experiments. Mice were randomly assigned to groups (N=10-16) that received saline, haloperidol (0.25 mg/Kg), clozapine (2.0 mg/Kg) or alstonine (0.5 and 1.0 mg/Kg) 30 min prior to the test session. The social

interaction apparatus (test box) consisted in a transparent acrylic box 25X20X20cm with no top. Experiments were performed with the room lighted only by a red bulb (40W) located at the corner of the room, and recorded with a video camera for later analysis. One day before the test mice were submitted to an adaptation session, when each mouse remained alone in the test box for 10 min. On the testing day, mice were allocated in pairs composed of mice matching in body weight and pertaining to unfamiliar groups (different home cages) that received the same drug treatment. The behavior of each of these pairs was recorded in the test box for 10 min. The time spent in social interaction (sniffing and grooming the partner, following, mounting, and crawling under or over the partner) was analyzed using the software The Observer[®] XT5.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). Passive contact (sitting or lying with bodies in contact) was not included as part of social interaction.

Sub-chronic treatment: Groups of mice (N=12-18) were treated daily for 7 days with saline, haloperidol (0.25mg/Kg), clozapine (2.0mg/Kg) or alstonine (0.5 and 1.0mg/Kg). Tests were performed in the 8th day, with the last drug administration occurring immediately after the adaptation session (24 h prior to the test).

MK801-induced social withdrawal: The method was adapted from Rung et al. (2005a). The social interaction test was performed as described above, except that mice were submitted to two 10 min adaptation sessions (occurring 24 and 48 h before test), and that MK801 (0.3mg/Kg) was administered 30 min before test. Groups of mice were randomly assigned to treatment groups (N=10-14) receiving saline, clozapine (2.0 mg/Kg), sulpiride (10.0mg/Kg) or alstonine (0.5 and 1.0mg/Kg) 30 min before MK801. An additional control group received saline and a second saline injection (instead of MK801) 30 min before test.

Statistical analysis: Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK). Values are expressed as mean \pm S.E.M. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

It is noteworthy that the doses of alstonine used in this study do not affect locomotion (Costa-Campos et al., 2004). Acute treatment with clozapine, but not alstonine or

haloperidol, significantly increased ($F_{4,24}= 3.05$, $p=0.037$) interaction time (Figure 1A). Sub-chronic treatment with alstonine 0.5mg/Kg, but not 1.0mg/Kg, significantly increased ($F_{2,23}=3.98$, $p=0.033$) time spent in social interaction; haloperidol and clozapine were devoid of effects (Figure 1B).

As can be seen in Figure 2, MK801 (0.3mg/Kg) significantly reduced ($F_{2,11}=17.43$, $p=0.000$) social interaction time. Pretreatment with alstonine 1.0mg/Kg and sulpiride 10.0mg/Kg ($F_{5,31}=12.8$ $p=0.000$) prevented MK801-induced social interaction withdrawal, whereas alstonine 0.5 mg/kg attenuated it.

Discussion

Social interaction in rodents, originally used as a model for assessing anxiety-related behaviors, has been explored as a potential model of social withdrawal in schizophrenia (Powell and Miyakawa, 2006). In general older antipsychotics reduce social behavior in normal animals and humans, whereas some atypical antipsychotics increase it (Corbett et al., 1993). In this study acute haloperidol was devoid of effects, whereas clozapine and alstonine lead to increased social interaction. Specifically, acute (but not sub-chronic) administration of clozapine, and sub-chronic (but not acute) administration of alstonine significantly increased social interaction. Given that tests sessions in the sub-chronic schedule were performed 24 h after last drug administration, results may indicate that alstonine induces plastic changes relevant to social behavior. On the contrary, the clozapine-induced increase in social interaction seems to require acute effects, consistent with the increased social interaction induced by anxiolytics (File, 1980). In agreement with the bell-shaped dose-response curve observed with alstonine in several mice models (Costa-Campos et al., 1998), only alstonine 0.5 mg/kg increased social interaction.

As stated by Rung et al. (2005a:831), “social deficits can be considered a core negative symptom in schizophrenia”. The so called “glutamate hypothesis of schizophrenia” emerged as an alternative to the classic dopamine hypothesis, in part because a hyperfunctioning mesolimbic dopamine was insufficient to accommodate the cognitive deficits and negative symptoms often observed in schizophrenia (Kristiansen et al., 2007). Indeed, while dopaminergic agonists can only mimic positive symptoms in animal models of psychotic behavior, the blockade of glutamate NMDA receptors can mimic in rodents cognitive (impaired alternation in T maze working memory task), positive (hyperlocomotion) and negative (social interaction deficits)

symptoms (Powell and Miyakawa, 2006). Animal models have been helpful to shape the current hypothesis that an excessive mesolimbic dopamine function (leading to positive symptoms) co-exist with a dopamine deficit in the mesocortical projections (leading to negative symptoms and cognitive deficits). Such unbalance may result from inaccurate modulation of the dopamine system by glutamatergic, GABAergic and/or serotonergic inputs (Abi-Dargham, 2004), along with an altered glutamatergic circuitry suggested by the changes in NMDA receptors observed in schizophrenic brains (Kristiansen et al., 2007).

Reproducing in rodents the social withdrawal observed in schizophrenics is better accomplished by using NMDA antagonists (Quiao et al., 2001; Becker and Grecksch, 2004; Rung et al., 2005a); as expected, MK801 significantly diminished social interaction. Clozapine was ineffective in preventing MK801-induced withdrawal, while sulpiride and alstonine prevented it. With this social withdrawal paradigm alstonine 1.0 mg/kg completely prevented withdrawal, while 0.5mg/kg only reduced it.

Clozapine was previously found ineffective against MK801-induced social withdrawal (Rung et al., 2005b), in contrast with its ability to counteract phencyclidine (PCP) and ketamine-induced social withdrawal (Quiao et al., 2001; Becker and Grecksch, 2004). The difference may be related to MK-801 being a pure NMDA antagonist, while PCP and ketamine also interact with dopamine and serotonin (Kapur and Seeman, 2002; Stone et al., 2007). Sulpiride, a dopamine D₂ antagonist with moderate affinity, completely prevented MK801-induced withdrawal. Other dopamine antagonists, especially those with high affinity for presynaptic D₂ autoreceptors and low affinity for D₂ postsynaptic receptors, have been shown to prevent MK801-induced withdrawal (Rung et al., 2005b). The complete prevention of MK801-induced withdrawal by alstonine 1.0mg/Kg is indicative of glutamatergic modulation and/or involvement with dopamine D₂ receptors. In agreement with the first possibility, alstonine also decreases MK801-induced hyperlocomotion (Costa-Campos et al., 2004). Relevant to this discussion, antipsychotics that inhibit 5HT_{2A} have been previously reported to reduce the effects of NMDA antagonists (Zhang and Bymaster, 1999), and the anxiolytic properties of alstonine were found to be dependent on 5HT_{2A,C} receptors (Costa-Campos et al., 2004). Nevertheless, clozapine, which has a considerably high affinity to 5HT_{2C} receptors, is devoid of effects in these models, again suggesting that alstonine effects are more likely to be related to glutamatergic modulation than to its involvement with serotonergic receptors. The existence of a

crosstalk between dopamine and glutamate systems, especially the NMDA receptors, have been discussed as a possible explanation for the therapeutic benefits of some antipsychotics, but the precise underlying mechanisms are yet not clear (Stone et al., 2007; Cepeda and Levine, 2006).

It is noteworthy that alstonine prevented/attenuated MK801-induced social withdrawal in doses that had no effect in normal social behavior, but are nevertheless anxiolytic in anxiety models. This profile is highly indicative that alstonine may be instrumental in improving social impairments in schizophrenics, endorsing previous proposition of its potential usefulness for managing negative symptoms in schizophrenics.

Acknowledgments

The authors are grateful CNPq (A.P.H, G.C.G, E.E) and CAPES (V.M.L.) for fellowships. This work was supported by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00.

References

Abi-Dargham A (2004). Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7(Sup.1): S1-S5.

Becker A, Grecksch G (2004). Ketamine-induced changes in rats behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*; 28: 1267-1277.

Cepeda C, Levine, MS (2006). Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Science's STKE*, 333: pe20.

Costa-Campos L, Lara DR, Nunes DS, Elisabetsky E (1998). Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(1): 133-141.

Costa-Campos L, Elisabetsky E, Lara DR, Carlson TJ, King S R, Ubillas R.M, et al. (1999). Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71(2): 189 – 201.

Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M., Elisabetsky E (2004). Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77: 481-489.

Corbett R, Hartman H, Kerman LL, Woods AT, Strupczewski JT, Helsley GC (1993). Effects of atypical antipsychotic agents on social behavior in rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45(1): 9-17.

Ellenbroek BA, Cools AR (2000). Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, 11(3-4): 223-233.

Erhart SM, Marder SR, Carpenter WT, (2006). Treatment of schizophrenia negative symptoms: future prospects. *Schizophrenia Bulletin*, 32: 234–237.

File SE (1980). The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, 2: 219-238.

Huppert JD, Weiss KA, Lim R, Pratt S, Smith TE (2001). Quality of life in schizophrenia: contributions of anxiety and depression. *Schizophrenia Research*, 51(2-3): 171 –180.

Iwu MM, Court WE (1977). Root alkaloids of *Rauwolfia comminsii* Stapf. *Planta Medica*, 32(2): 158-161.

Iwu MM, Klayman DL (1992). Evaluation of the in vitro antimalarial activity of *Picralima nitida* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(2): 133– 135.

Kapur S, Seeman P (2002). NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5HT2 receptors implications for models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 7(8): 837-844.

Kristiasen LV, Huerta I., Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2007). NMDA receptors and schizophrenia. *Current Opinion in Pharmacology*, 7: 48-55.

Powell CM, Miyakawa T (2006). Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biological Psychiatry*, 59: 1198-1207.

Quiao H, Noda Y, Kamei T, Nagai T, Furukawa H, Miura H, et al. (2001). Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. *Neuropharmacology and Neurotoxicology*, 12: 11-15.

Rung JP, Carlsson A, Markinhuhta KR, Carlsson ML (2005a). (+)-MK801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 29: 827-832.

Rung JP, Carlsson A, Markinhuhta KR, Carlsson ML (2005b). The dopaminergic stabilizers (-)-OSU6162 and ACR16 reverse (+)-MK801-induced social withdrawal in rats. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 29: 833-839.

Schultz SH, North SW, Shields CG (2007). Schizophrenia: a review. *American Family Physician*, 75(12): 1822-1829.

Stahl SM, Buckley PF (2007). Negative symptoms of schizophrenia: a problem that will not go away. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 115: 4–11.

Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS (2007). Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - a synthesis and selective review. *Journal of Psychopharmacology*, 21(4): 440-452.

Tamminga CA, Buchanan RW, Gold JM (1998). The role of negative symptoms and cognitive dysfunction in schizophrenia outcome. *International Journal of Psychopharmacology*, 13(supl.3): 21-S26.

Zhang W, Bymaster FP (1999). The in vivo effects of olanzapine and other antipsychotic agents on receptors occupancy and antagonism of dopamine D₁, D₂, D₃, 5HT_{2A} and muscarinic receptors. *Psychopharmacology*, 141: 267-78.

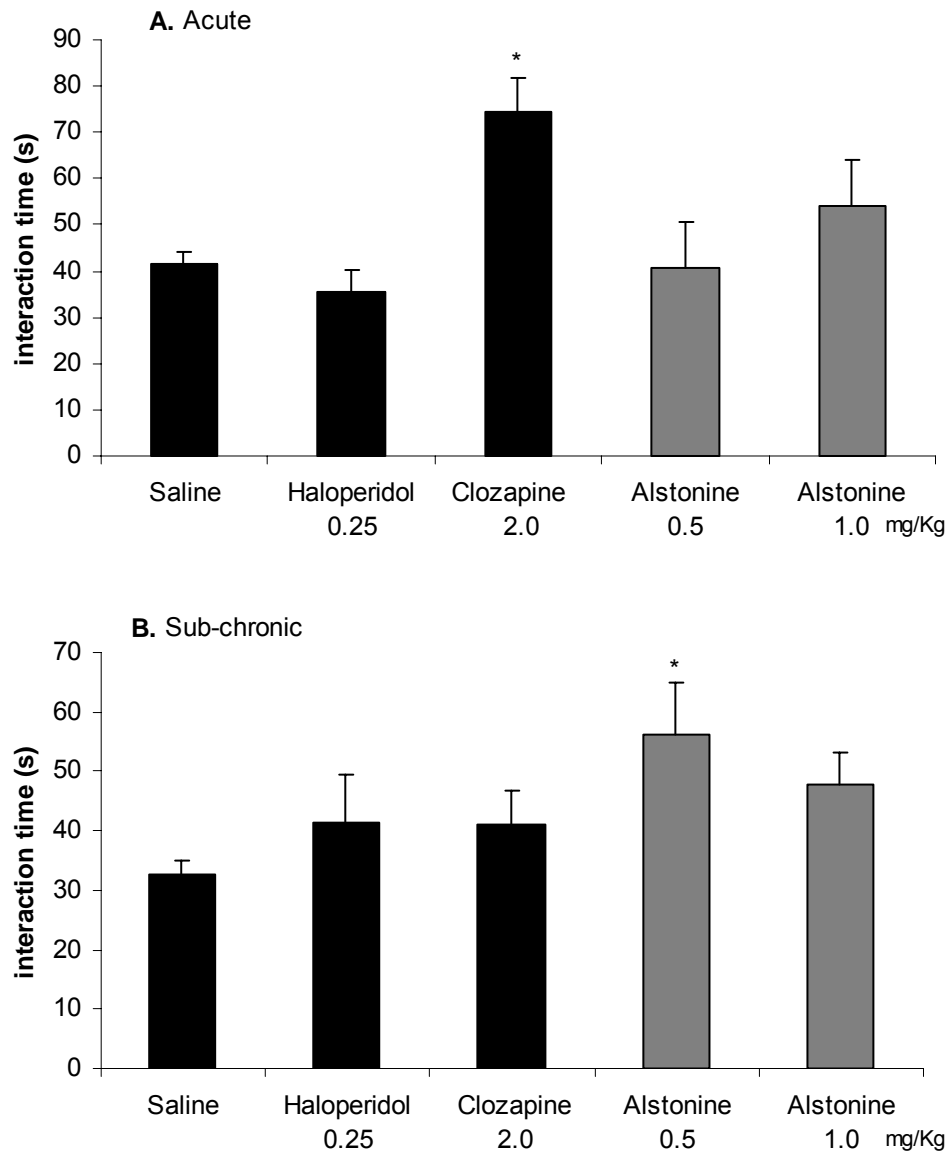


Figure 1: Effects of haloperidol, clozapine and alstonine acute (A) and sub-chronic (B) treatments in mice social interaction. N=5-9 pairs. Mean±S.E.M. of pairs. *=p<0.05 compared with saline, ANOVA/SNK.

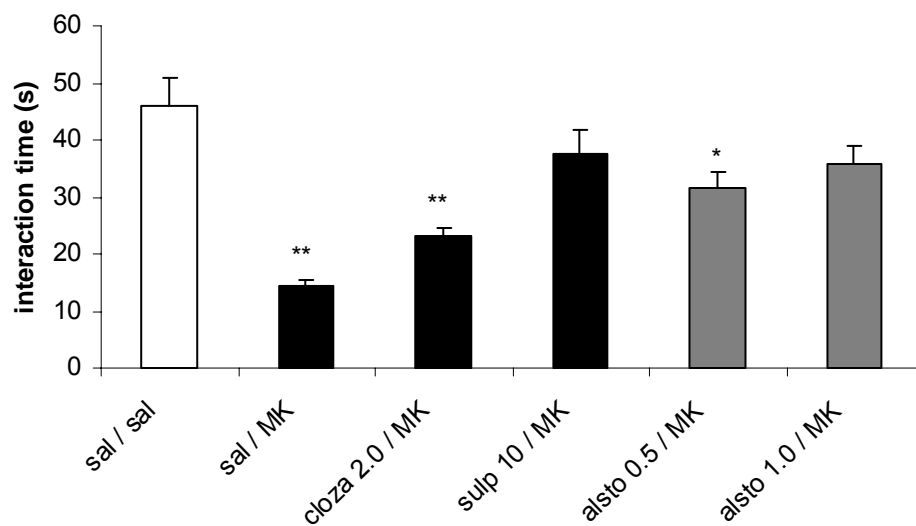


Figure 2: Effects of clozapine, sulpiride and alstonine on the MK801-induced social withdrawal in mice. Sal = saline, MK = MK801 0.3mg/kg, cloza = clozapine 2.0mg/kg, sulp = sulpiride 10mg/kg, alsto0.5 = alstonine 0.5mg/kg, alsto1.0 = alstonine 1.0 mg/kg. N=5-7 pairs. Mean±S.E.M of pairs. *=p<0.05; **=p<0.01 compared with saline/saline, ANOVA/SNK.

3.2. Linck, VM; Herrmann, AP; Piato, ALS; Figueiró, M; Detanico, BC; Flório, J; Iwu, MM; Okunji, CO; Leal, MB; Elisabetsky, E. **Alstonine as antipsychotic: effects on brain amines and metabolic changes** (a ser submetido à revista Planta Medica).

Alstonine as antipsychotic: effects on brain amines and metabolic changes.

Viviane de Moura Linck^{1,2*}, Ana Paula Herrmann¹, Ângelo L.S. Piato^{1,2}, Micheli Figueiró¹, Bernardo Carraro Detanico¹, Jorge Flório³, Maurice M. Iwu⁴, Christopher O. Okunji⁴, Mirna Bainy Leal¹, Elaine Elisabetsky^{1,2}

Affiliation

¹ Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. Av. Av. Ipiranga, 2752, 1º andar, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP 05508-900, Brazil

⁴ International Center for Ethnomedicine and Drug Development, and Bioresources Development and Conservation Programme, University of Nigeria, Nsukka, Nigeria.

* Corresponding author:

Viviane de Moura Linck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS

Rua Sarmiento Leite 500/202, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone/FAX: 55 51 33083121.

vivilinck@gmail.com

Abstract

Managing schizophrenia has never been a trivial matter. Moreover, while classic antipsychotics induce extrapyramidal side effects and hyperprolactinaemia, atypical antipsychotics lead to diabetes, hyperlipidemia, and weight gain. Moreover, even with newer drugs, a sizable proportion of patients do not show significant improvement. Alstonine is an indole alkaloid identified as the major component of a plant-based remedy used in Nigeria to treat the mentally ill. Alstonine presents a clear antipsychotic profile in rodents, apparently with differential effects in distinct dopaminergic pathways. The aim of this study was to complement the antipsychotic profile of alstonine, verifying its effects on brain amines in mice frontal cortex and striatum. Additionally, we examined if alstonine induces some hormonal and metabolic changes common to antipsychotics. HPLC data reveals that alstonine increases serotonergic transmission and increases intraneuronal dopamine catabolism. In relation to possible side effects, preliminary data suggest that alstonine does not affect prolactin levels, does not induce gains in body weight, but prevents the expected fasting-induced decrease in glucose levels. In overall, this study reinforces the proposal that alstonine is a potential innovative antipsychotic, and that a comprehensive understanding of its neurochemical basis may open new avenues in developing newer antipsychotic medication.

Keywords: Alstonine, antipsychotic, schizophrenia, biogenic amines, antipsychotic side effects.

Introduction

The management of schizophrenic symptoms has never been a trivial matter, complicated by the low adherence of patients to treatments because of serious side effects. Classic antipsychotics, blocking D₂ dopamine receptors, lead to extrapyramidal effects related to antagonism at the nigrostriatal pathway [1], and hyperprolactinaemia due to antagonism at the tuberoinfundibular pathway [2]. In the early 90s a new class of antipsychotics was introduced in clinic, with the alleged advantage of causing none or minimum extrapyramidal side effects [3], [4], potentially increasing treatment adherence. Unfortunately, however, it is now recognized that atypical antipsychotics often induce diabetes, hyperlipidemia and weight gain [5], [6], [7]. For instance, patients on clozapine have a 4 times higher chance to develop diabetes, hyperglycemia, and hyperlipidemia than patients on classic antipsychotics [8]. The mechanisms by which these metabolic alterations are produced are not entirely understood.

It is thought that atypical antipsychotics fail to induce extrapyramidal effects due to its weakened blockade of D₂ dopamine (DA) receptors, and its further interaction with various neurotransmitters, especially serotonin (5HT) receptors, in particular 5HT_{1A}, 5HT_{2A} and 5HT_{2C} [1]. Moreover, specific DA pathways may be modulated by serotonin receptors, depending on the presence of serotonergic receptors sub-type [9]. Giving that positive and negative symptoms of schizophrenia are thought to reflect an unbalance in DA mesolimbic and mesocortical pathways [10], and the problems with simply blocking DA receptors, it is an attractive idea that 5HT receptors can distinctively modulate different DA pathways.

The indole alkaloid alstonine was identified as the major component of a plant-based treatment given to mentally ill patients in Nigeria [11]. Alstonine shows a clear

antipsychotic profile in rodents, closer to atypical than classical agents [12]. Apparently, alstonine induces dissimilar effects in dopaminergic pathways: while apomorphine-induced stereotypy and amphetamine-induced lethality were significantly reduced by alstonine suggesting a decrease in mesolimbic DA, alstonine reversed haloperidol-induced catalepsy, indicating that nigrostriatal dopamine transmission is not lessened [12]. Relevant for treating negative symptoms, alstonine also presents anxiolytic properties, involving 5HT_{2A,C} receptors [13].

In order to better understand the basis of alstonine antipsychotic profile, the aim of this study was to verify alstonine effects on brain amines in mice frontal cortex and striatum. Additionally, we examined if alstonine induces hormonal and metabolic changes common to classic and atypical antipsychotics.

Materials and Methods

Plant Material

Mature fruits of *Picralima nitida* were collected by the staff from International Center of Ethnomedicine and Drug Development (InterCEDD) in February and March 2002, from Nnewi, Anambra state, Nigeria. The plant material was identified by comparison with a voucher specimen (UNN/83/07) at the Department of Pharmacognosy Herbarium of the University of Nigeria, Nsukka, and authenticated by Mr. A. Ozioko of the Department of Botany of the same university. The fruit-rind was separated, dried, and pulverized. The powdered material was successively extracted with n-hexane, methylene chloride, and methanol. Extracts were concentrated in vacuum using the rotary evaporator.

Isolation and Identification of alstonine

Pure alstonine hydrochloride used for this investigation was isolated from the fruit rind of *P. nitida* Stampf Th. et H.Dur. (Apocynaceae). The separations were performed using pH-zone-refining counter-current chromatography as previously described [14]. Briefly, the experiment was performed with a two-phase solvent system composed of methyl tert-butyl ether (MtBE)–acetonitrile–water (2:2:3, v/v), where triethylamine (TEA) was added to the upper organic stationary phase as a retainer, and hydrochloric acid (HCl) to the aqueous mobile phase as an eluter. The basic organic phase was used as the stationary phase and the acidic lower phase was used as the mobile phase. The separation was initiated by filling the entire column with the stationary phase using the LC pump, and then loading the sample. The sample solution was prepared by dissolving 15.0g of alkaloid fraction of the methylene chloride extract of *P. nitida* in 100mL of a phase mixture consisting of equal volumes of each phase. The mobile phase was then pumped into the column at 2mL/min while the column was rotated at 834 rev./min in the combined head to tail elution mode [15], [16]. The absorbance of the eluate was continuously monitored at 280 nm and 4-mL fractions were collected. The pH of each eluted fraction was measured with a pH meter and fractions were dried using a Speed Vac. Identification of pH-zone refining counter-current chromatography pure fractions was carried out by using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and by TLC co-elution experiments with reference alstonine samples provided by InterCEDD, Nsukka, Nigeria.

Drugs: Clozapine was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, US), and haloperidol was used from commercial Haldol[®] (Janssen Farmacêutica Ltda, SP, Brazil). Clozapine was solubilized in HCl (0.1N) with pH adjusted to 6.0 with NaOH

0.5N; alstonine and haloperidol were diluted in water. All drugs were administered intraperitoneally (ip) in a volume of 0.1mL/10g of body weight.

Animals: Male (CF1) adult albino mice, received from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) with 2.0 months of age (40-45g) were used in all experiments. Animals were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 hr-light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water), for at least two weeks before experiments.

The project was approved by the University ethics committee (approval #2007706) and all procedures were carried out in accordance with institutional policies on experimental animals handling.

Brain amines HPLC-ED determination: Animals (N=10) received ip saline or alstonine 1.0mg/Kg, and 30min latter were sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed and dissected over dry ice; striatum and frontal cortex were removed, weighed and immediately stored in liquid nitrogen. Not latter than a week following sample collections, tissues were homogenized in 0.1M perchloric acid by manual sonication. DA and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA), as well as 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were measured by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, as described by Felicio et al. [17]. Briefly, the HPLC-ED system (model 6A; Shimatzu, Kyoto, Japan) consisted of a C-18 column (Shimpak; ODS, Kyoto, Japan), an electrochemical detector (model 6A; Shimatzu), a sample injector (valve for 20 μL), and an integrator (model 6A Chromatopac; Shimatzu). Dihydroxybenzylamine (DHBA) was used as the internal

standard, and peak areas of external standard were used to quantify the sample peaks. The time for each sample was 28 min. Values are expressed as ng/g tissue weight. The detection limit was 0.002 ng for DA, DOPAC, 5-HT, and 5-HIAA, and 0.02 ng for HVA.

Glycemia: Experiments were conducted between 9 and 12 AM. Groups of mice (N=5-9) were treated ip with saline, clozapine (2.0 and 10.0mg/Kg), and alstonine (0.5 and 1.0mg/Kg). Food and water were withdrawal immediately before treatments and glucose measures were taken before and 3 hours after drugs administration [7], with a glucometer (Accu-Chek Active[®] Roche), using a blood drop drawn from the tail.

Body weigh: Mice (N=8-10) were treated ip for 6 days with saline, haloperidol (0.25mg/Kg), clozapine (2.0mg/Kg) or alstonine (0.5 and 1.0mg/Kg). The body weight was measured daily between 12 AM and 1 PM.

Prolactin (PRL) levels: Groups of mice (N= 6-8) were treated with ip injection of saline, haloperidol (0.25mg/Kg), clozapine (2.0mg/Kg) or alstonine (1.0mg/Kg). Animals were decapitated 30min after treatments; the blood was collected and centrifuged for 10min at 5000rpm and serum was stored at -20°C until assayed. Plasma PRL levels were measured in duplicate by radioimmunoassay (RIA), using materials provided by NIADDK (Bethesda, MD, USA). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6 and 8%, respectively [18].

Statistical analysis: HPLC data was evaluated by independent T-test. Group differences in glucose and prolactin levels were analyzed by one-way ANOVA,

followed by Duncan; pre and post drug glucose levels were analyzed by paired T-test. ANOVA with repeated measures followed by Duncan was used for evaluating weight gain. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

The effects of alstonine on brain amines are shown in Figures 1 and 2. DA levels are decreased ($t=4.96$, $p < 0.01$) in frontal cortex (Fig. 1A), with concomitant increase in DOPAC ($t=-2.22$, $p < 0.05$) and no changes in HVA. DOPAC levels are also increased ($t=-3.62$, $p < 0.01$) in the striatum (Fig. 1B), without changes in DA or HVA. 5HT levels are increased only in the frontal cortex ($t= -3.74$, $p < 0.05$), whereas increases in 5-HIAA are seen in frontal cortex ($t=-2.68$, $p < 0.01$) and striatum ($t=-2.5$, $p < 0.05$) (Figures 2A and B).

Decreased glucose levels were found after fasting in control animals ($t=4.52$, $p < 0.01$), but not in clozapine and alstonine treated groups (Figure 3). No differences in body weight gain were observed with the various treatments (Figure 4). Haloperidol (0.25mg/Kg) markedly increased ($F_{5,24} = 13.99$ $p < 0.01$) prolactin levels, whereas clozapine (2.0 mg/Kg) and alstonine (1.0mg/Kg) did not (Figure 5).

Discussion

Improving antipsychotic effectiveness seems to require proper and specific modulation of the various DA pathways. For instance, lessened extrapyramidal symptoms and amelioration of negative symptoms observed with newer agents is thought to be consequent to differential effects on the striatum and frontal cortex, respectively [19].

Although the behavior profile of alstonine seems closer to newer than older antipsychotics, it nevertheless differs from clozapine in its ability to reverse MK801-induced hyperlocomotion [13] and social deficit [20], and from lacking epileptogenic properties [21]. An unusual mechanism of action for alstonine is also here suggested by the effects of alstonine on levels of DA in frontal cortex and striatum. Lack of changes in HVA levels suggests unchanged DA metabolism at synaptic level, whereas increases in DOPAC levels suggests augmented intraneuronal catabolism. DOPAC levels are accepted as a reliable index of intra neuronal DA degradation [22], [23], resulting from intracellular monamine oxidase (MAO) activity. Alternatively, increases in DOPAC could result from stimulation of the membrane transporter DAT, or still inhibition of the vesicular transporter VMAT2. All of these alternatives would eventually modulating DA availability at synaptic level. Although only MAO or DAT inhibitor drugs are currently known, a direct effect of alstonine on these targets can not be ruled out at this point. A diminished DA availability at the synaptic levels is consistent with alstonine ability to counteract stereotypy by amphetamine and/or prevent lethality in amphetamine-treated grouped mice [12]. Although at this point speculative, such unusual neurochemical profile could open innovative scenarios for antipsychotics and require scrutiny by specific experiments.

The HPLC analysis also shows that alstonine induced increased 5HT levels in frontal cortex, and increased 5HIAA in frontal cortex and striatum. The possibility that alstonine acts as a 5HT_{2A,C} inverse agonist [13] is compatible with 5HT and 5HIAA increases, since pre-synaptic 5HT_{2A,C} receptors modulate 5HT release. 5HT modulation is considered to be central to the differential profile of newer antipsychotics, dopamine modulation by serotonin is now generally accepted [9], [24], [25], [26]. 5HT_{1A} and 5HT_{2A} receptors stimulate DA release in the cortex,

whereas 5HT_{2C} receptors may inhibit DA in the ventral tegmental area; it has been suggested that these combined properties could balance the DA system in benefit to schizophrenia symptoms [9].

An extensive clinical trial comparing classic and atypical antipsychotics (CATIE) pointed to weight gain and hyperglycemia as major causes of discontinuing therapy with the newer drugs [4]. Although longer treatment periods would have to be analyzed, neither alstonine nor clozapine or haloperidol altered mice weight gain with doses effective in relevant behavioral models in mice. Regarding glycemia, the fasting period used in this study induces a clear fall in glycemia levels of controls animals, a drop absent in alstonine and clozapine treated mice. The mechanism by which atypical antipsychotics increase glycemia is not entirely clear, but inhibition of glucose transporters (GLUT) may be inhibited by various atypical drugs [7]. The data suggest that alstonine may share this characteristic. Relevant to adherence to treatment, a clear correlation exists between elevated PRL levels and DA D₂ receptor occupancy by classic antipsychotics at the tuberoinfundibular pathway [2]. Differing from haloperidol, alstonine and clozapine did not alter PRL levels, further confirming its atypical profile and differential effects among the dopaminergic pathways.

In conclusion, this study reinforces that the comprehensive understanding of the neurochemical basis of alstonine innovative profile as antipsychotic may open new avenues in developing newer medication. Considering the gaps in the understanding of schizophrenia and the complexity of its neurochemical basis, this study underpins the value of traditional medical systems in unveiling original drugs.

Acknowledgments

The authors are grateful CNPq and CAPES for fellowships, and Poli Mara Spritzer and Janine Costa Ivo for technical assistance in PRL analysis. This work was supported by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00.

References

- ¹ Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 2005;10:79-104.
- ² Compton MT, Miller AH. Antipsychotic-induced hyperprolactinemia and sexual dysfunction. *Psychopharmacology Bulletin* 2002; 36(1):143-64.
- ³ Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45:789-96.
- ⁴ Lieberman JA, Stroup TS, Mcevoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New England Journal of Medicine*. 2005; 353(12):1209-23
- ⁵ Allison DB, Mentore JL, Heo M, Chandler LP, Capelleri JC, Infante MC, et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J psychiatry* 1999; 156:1686 –96.
- ⁶ Dwyer DS. Model of the 3-D structure of the GLUT3 glucose transporter and molecular dynamics simulation of glucose transport. *Proteins* 2001; 42:531– 41.
- ⁷ Dwyer DS, Donohoe D. Induction of hyperglycemia in mice with atypical antipsychotic drugs that inhibit glucose uptake. *Pharmacol, Biochem, Behav.* 2003; 75: 255-260.
- ⁸ Schultz SH, North SW, Shields C.G. Schizophrenia: a review. *American Family Physician*. 2007; 75 (12): 1822-1829.
- ⁹ Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacology Therapeutics* 2007; 113: 296-320.
- ¹⁰ Abi-Dargham, A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2004; 7 (Sup.1): S1-S5.

- ¹¹ Costa-Campos L, Elisabetsky E, Lara D R, Carlson TJ, King S R, Ubillas R, et al. Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 1999; 71(2): 189 – 201.
- ¹² Costa-Campos L, Lara DR, Nunes DS, Elisabetsky E. Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 60 (1): 133-141.
- ¹³ Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M, Elisabetsky E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004a; 77: 481-489.
- ¹⁴ Okunji CO, Iwu MM, Ito Y, Smith PL. Preparative Separation of Indole Alkaloids from the Rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH Zone Refining Countercurrent Chromatography. *J Liquid Chromatography Related Technologies*. 2005; 28 (5): 775 – 783
- ¹⁵ Ito Y. High-Speed Countercurrent Chromatography; Ito, Y., Conway, W.D., Eds.; Wiley: New York, 1996; 3.
- ¹⁶ Shinomiya K, Menet JM, Fales HM, Ito Y. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing counter-current chromatography. I. Design of the apparatus, retention of the stationary phase, and efficiency in the separation of proteins with polymer phase systems. *J Chromatogr*. 1993; 644(2):215-29
- ¹⁷ Felicio LF, Florio JC, Brifdge R. Reproductive Experience increases Striatal and Hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. *Brain Research Bulletin*. 1996; 40 (4): 253-256.
- ¹⁸ Doretto MC, Oliveira-e-Silva M, Ferreira-Alves DL, Pires SG, Garcia-Cairasco N, Reis AM. Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles. *Epilepsy Research* 2003; 54: 109–121.
- ¹⁹ Gardner, D.M.; Baldessarini, R.J.; Waraich, P. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ.*, 2005; 172(13):1703-1711.
- ²⁰ Linck VM, Herrmann AP, Goerck GC, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky, E. The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. Submitted to *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.
- ²¹ Costa-Campos, L.; Iwu, M.; Elisabetsky, E. Lack of proconvulsant activity of the antipsychotic alkaloid alstonine. *J. Ethnopharmacol*. 2004b; 98 (2-3): 307 – 310.
- ²² Westerink BHC. Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain. *Neurochem. Int*. 1985; 7:221-227.
- ²³ Haleem DJ, Batool F, Khan NH, Kamil N, Ali O, Saify ZS, et al. Differences in the effects of haloperidol and clozapine on brain serotonin and dopamine metabolism and on tests related to extrapyramidal functions in rats. *Med Sci Monit*. 2002; 8(9): BR354-361.

²⁴ Lucas G, Spampinato U. Role of striatal serotonin 2A and serotonin 2C receptor subtypes in control of in vivo dopamine outflow in rat striatum. *Journal of Neurochemistry*. 2000; 74: 693-701.

²⁵ Di Matteo V, Cachio M, Di Giulio C, Esposito E. Role of serotonin 2C receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 71: 727-734.

²⁶ De Deurwaerdère P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U. Constitutive activity of the serotonin 2C receptor inhibits in vivo dopamine release in rat striatum and nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*. 2004; 24(13): 3235-3241.

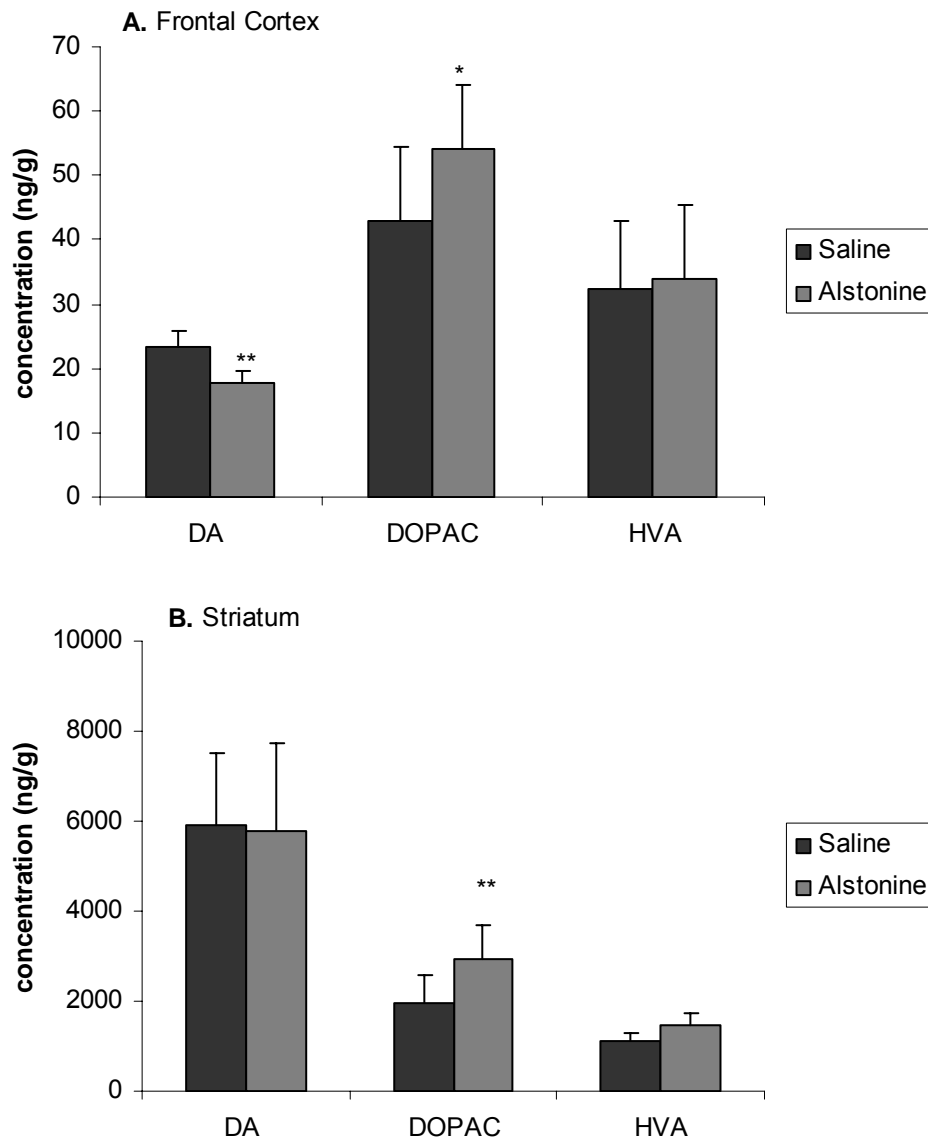


Figure 1: Dopamine (DA) and its metabolites (DOPAC and HVA) in mice frontal cortex (A) and in striatum (B). Mean \pm S.E.M. *= p <0.05, **= p <0.01 when compared with saline, Independent T-test.

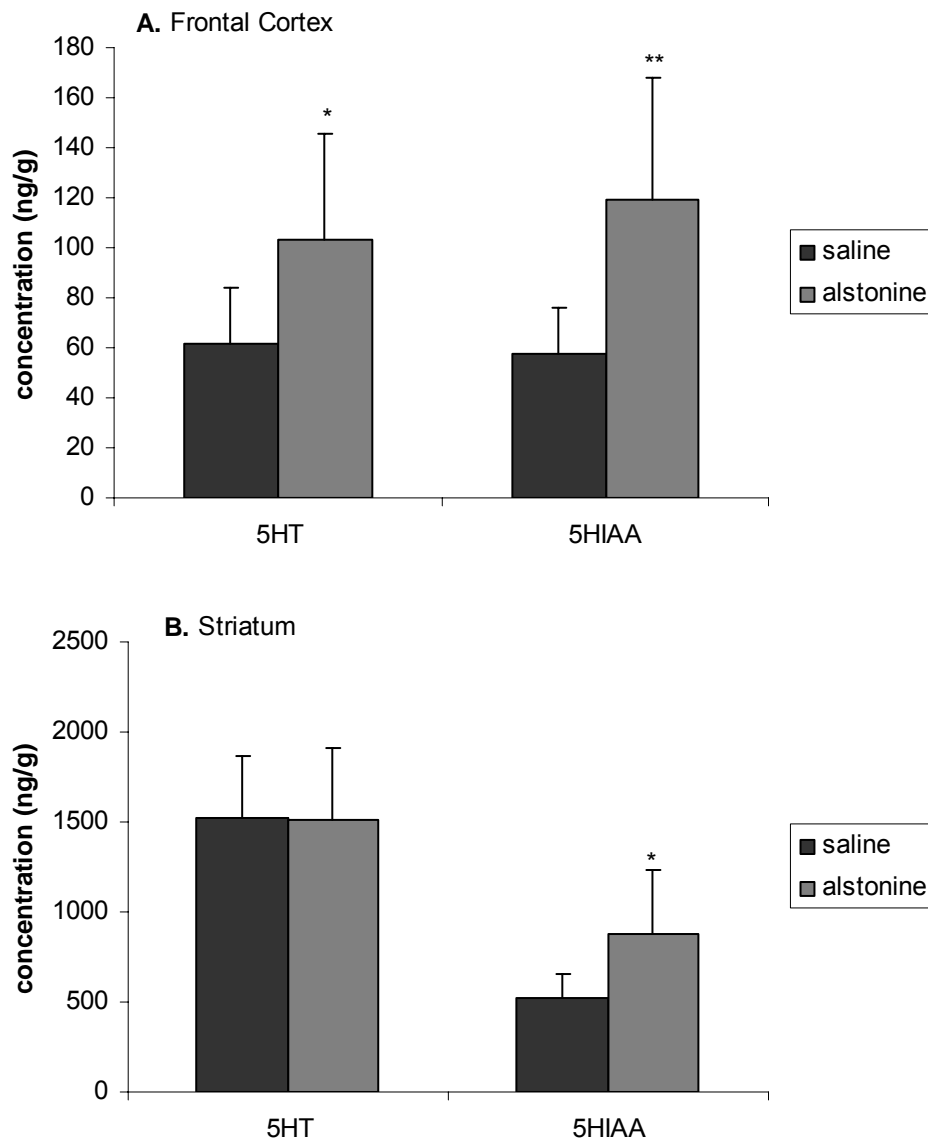


Figure 2: Serotonin (5-HT) and its metabolite (5HIAA) in mice frontal cortex (A) and in striatum (B). Mean \pm S.E.M. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$ when compared with saline, Independent T-test.

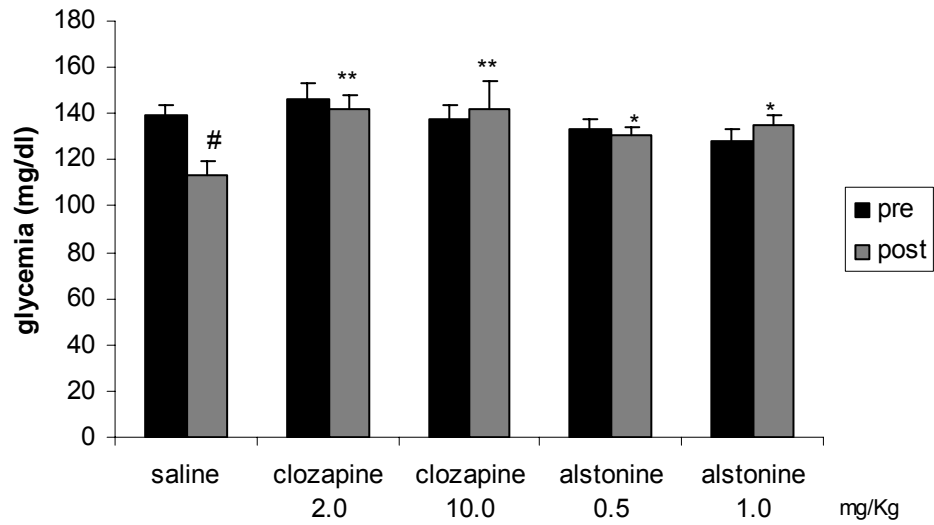


Figure 3: Effects of alstonine and clozapine on glucose levels. Mean \pm S.E.M. #= $p < 0.01$ compared with pre-drug, Paired T-test. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$ compared with saline post-drug, ANOVA/Duncan.

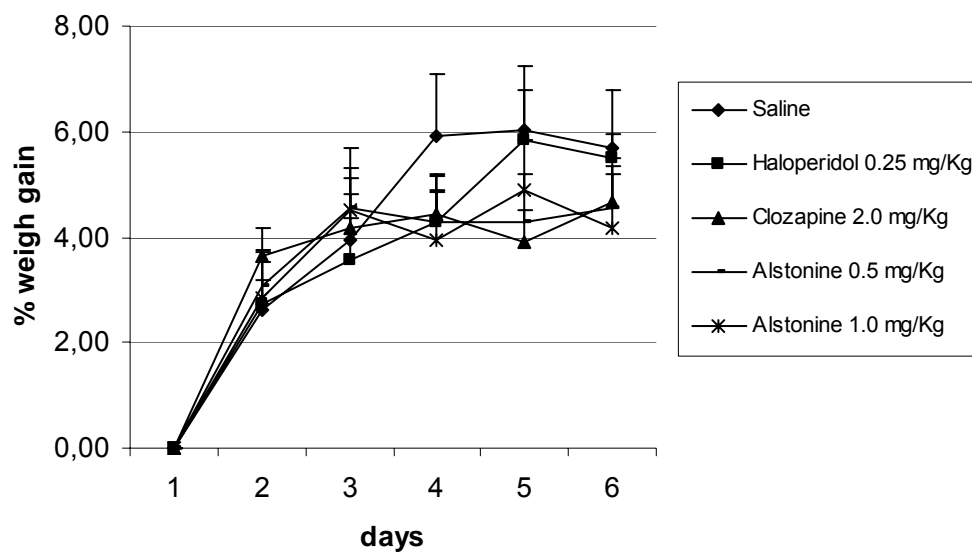


Figure 4: Body weight gain of mice treated with alstonine, haloperidol and clozapine. N=8-10. Mean \pm S.E.M, ANOVA with repeated measures/Duncan.

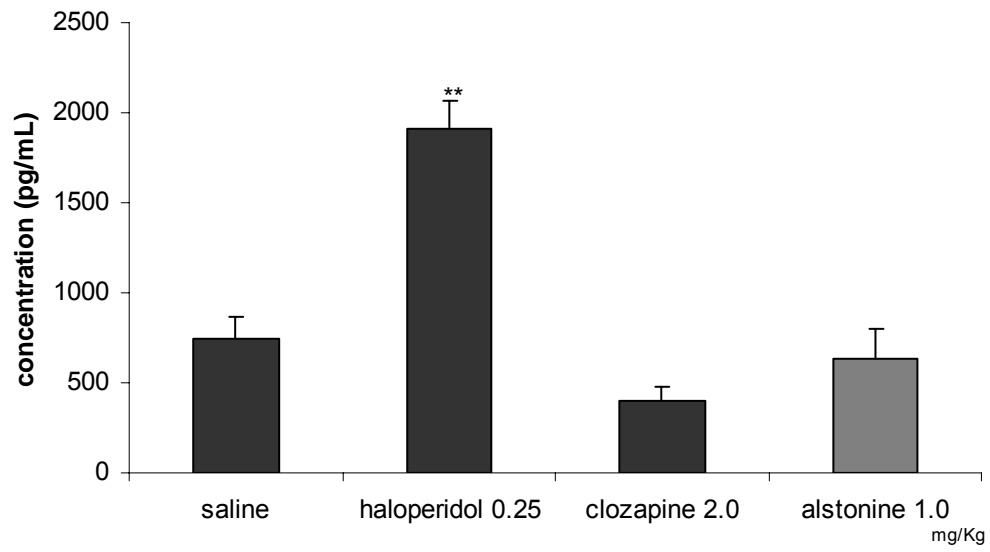


Figure 5: Effects of alstonine, haloperidol and clozapine on prolactin levels. Mean \pm S.E.M. **= $p < 0.01$ when compared with saline. ANOVA/ Duncan.

4. Discussão

A esquizofrenia é considerada por muitos como o tipo mais grave de psicose. Talvez mais do que para qualquer outro tipo de paciente mental, é difícil para esquizofrênicos manterem uma vida dentro dos padrões de normalidade com algum grau aceitável de satisfação pessoal. Uma vez que, em geral, a doença se manifesta no início da vida adulta, esses pacientes não apresentam necessariamente diminuição da escolaridade, mas a doença impede que a maioria possua emprego, poucos se casam e constituem família e entre os que constituem matrimônio o índice de divórcio é mais elevado que no resto da população (MARWAHA e JOHNSON, 2004; SALOKANGAS *et al.*, 2001). Sem uma medicação eficaz poucos esquizofrênicos podem desenvolver uma vida social adequada; no entanto, os tratamentos disponíveis mesmo quando eficazes apresentam uma alta incidência de efeitos adversos levando ao abandono do tratamento (LIEBERMAN *et al.*, 2005).

As primeiras drogas antipsicóticas surgiram no início dos anos 50, e desde então pouca inovação ocorreu no tratamento da esquizofrenia. A introdução dos medicamentos atípicos no mercado cerca de 40 anos depois gerou grande expectativa quanto à melhora dos pacientes esquizofrênicos. No entanto, a prática clínica demonstrou que apesar de praticamente não causarem os indesejados efeitos extrapiramidais observados com os medicamentos clássicos, os fármacos atípicos causam outros efeitos adversos, como aumento de peso, colesterol, triglicérides e propensão ao diabetes (GARDNER *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2006). Apresentam ainda melhora insuficiente dos sintomas negativos e cognitivos que acompanham a esquizofrenia. Mesmo a clozapina, considerada droga de escolha para pacientes refratários, mostra-se ineficaz em parte dos pacientes, e além de induzir os mesmos efeitos metabólicos que outros agentes de sua classe, pode ainda causar crises convulsivas e agranulocitose, fatal em alguns casos (BHANJI *et al.*, 2003; GARDNER *et al.*, 2005). É, portanto, evidente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos úteis ao tratamento da esquizofrenia, que melhorem a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, nos últimos anos a

inovação observada nessa área baseia-se, sobretudo, em análogos dos antipsicóticos disponíveis no mercado (KAPUR e MAMO, 2003). São, portanto, necessárias moléculas com mecanismos inovadores que tragam novas perspectivas para o tratamento de pacientes esquizofrênicos.

A riqueza do conhecimento de comunidades tradicionais quanto ao tratamento de patologias com base na diversidade vegetal encontrada em diversas regiões do planeta, fornece ferramentas úteis no desenvolvimento de novos fármacos. Esse tipo de abordagem na busca de novos fármacos, baseada na observação de alegados efeitos em humanos é de grande valia em doenças onde existe a necessidade de inovação na obtenção de novos fármacos, e sobretudo onde as estratégias de síntese química racional não são adequadas por se desconhecer os alvos biológicos a serem modulados. Nesse contexto se encaixa a esquizofrenia, uma doença descrita há mais de um século, mas ainda sem patofisiologia esclarecida e para a qual a terapia disponível ainda mostra-se deficiente. Foi através da abordagem etnofarmacológica que se identificou o potencial antipsicótico de alstonina, componente principal de uma preparação utilizada por psiquiatras tradicionais na Nigéria. Estudos anteriores mostraram que alstonina apresenta um claro efeito antipsicótico em modelos experimentais, além de apresentar atividade ansiolítica e ser destituída de epileptogenicidade (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998; 2004a; 2004b).

Este trabalho teve por objetivo principal dar continuidade à caracterização de alstonina como antipsicótico. Um dos objetivos foi avaliar o efeito desse alcalóide em modelos animais relacionados a sintomas negativos, uma vez que os estudos prévios baseavam-se, sobretudo em modelos de sintomas positivos. Os resultados indicaram que alstonina aumenta o tempo de interação social em roedores após tratamento sub-crônico (7 dias) na dose de 0,5mg/Kg, mas não de 1,0mg/Kg. Os dados sugerem que alstonina induz alterações plásticas capazes de influenciar o comportamento de interação social em roedores, já que os efeitos são observados mesmo 24 horas após a última administração. A ausência de atividade na dose de 1,0mg/Kg não é de todo surpreendente, uma vez que os estudos anteriores já mostravam uma curva dose efeito em U invertido (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998).

O aumento de interação social em roedores é também observado com agentes ansiolíticos (FILE, 1980). Em nossos experimentos, o antipsicótico clozapina aumentou significativamente o tempo de interação social após tratamento agudo, mas não sub-crônico. O efeito ansiolítico da clozapina é bem estabelecido e envolve, sobretudo, o sistema serotoninérgico (CAO e RODGERS, 1997). O efeito agudo e a falta de efeito no tratamento sub-crônico com clozapina parece sugerir que seu efeito agudo é resultante da propriedade ansiolítica mediada por ação direta em receptores serotoninérgicos, e ainda que nesta dose (2,0mg/Kg) clozapina não é capaz de produzir alterações plásticas que perdurem por ao menos 24 horas após a última administração do tratamento sub-crônico. Ao contrário, a ausência de efeito com administração aguda de alstonina sugere que o efeito sobre interação social é dissociado de sua propriedade ansiolítica previamente caracterizada. Os dados com clozapina estão de acordo com a literatura (RUNG *et al.*, 2005b) e apontam para mais uma diferença entre alstonina e clozapina.

Antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA (ex. fenciclidina, cetamina, MK801) vêm sendo utilizados para mimetizar sintomas negativos em roedores (POWELL e MIYAKAWA, 2006). Déficit de interação social, ou isolamento social, produzido por esses agentes em roedores, vem sendo considerado como modelo útil no estudo do efeito de drogas em sintomas negativos da esquizofrenia (QUIAO *et al.*, 2001; BECKER e GRECKSCH, 2004; RUNG *et al.*, 2005a). Neste trabalho tanto alstonina como o antipsicótico sulpirida mostraram-se eficazes na prevenção do isolamento social produzido por MK801, sugerindo bom potencial de resposta em relação a sintomas negativos em esquizofrênicos. Mais uma vez diferenciando-se de alstonina, clozapina não conseguiu reverter o isolamento social produzido por MK801. Outros estudos também indicaram a incapacidade de clozapina em prevenir o déficit de interação social produzido por MK801 (RUNG *et al.*, 2005b), embora seja efetiva em déficit produzido por cetamina e fenciclidina (QUIAO *et al.*, 2001; BECKER e GRECKSCH, 2004). É importante salientar que cetamina e fenciclidina, ao contrário de MK801 que é um antagonista NMDA puro, interagem também com receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos (STONE *et al.*, 2007). Assim, a capacidade de clozapina em prevenir o déficit causado por esses outros antagonistas NMDA pode refletir ação em outros receptores e não interação com o

sistema glutamatérgico. Os resultados obtidos com alstonina indicam uma interação direta com e/ou modulação indireta do sistema glutamatérgico.

Outro objetivo deste trabalho foi esclarecer aspectos do mecanismo de ação de alstonina. Para tanto, avaliou-se o efeito deste alcalóide sobre o metabolismo central de dopamina e serotonina, através da dosagem desses neurotransmissores e de seus metabólitos em córtex e estriado de camundongos por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Alstonina produziu um aumento na transmissão serotoninérgica, observado pelo aumento de 5HIAA e serotonina no córtex frontal, e aumento de 5HIAA no estriado. Esses dados são consistentes com a hipótese inicial de ação da alstonina como agonista inverso de receptores 5HT_{2A/C}: atuando como agonista inverso em receptores pré-sinápticos 5HT_{2A/C} alstonina levaria a uma maior liberação de serotonina, resultando no aumento de 5HIAA nas duas estruturas. O receptor 5HT_{2A} é particularmente abundante no córtex pré-frontal (JAKAB e GOLDMAN-RAKIC, 1998), enquanto o receptor 5HT_{2C} está distribuído, principalmente, no córtex frontal, núcleo accumbens, plexo coróide e hipocampo (LOPEZ-GIMENEZ *et al.*, 2001). A baixa densidade destes receptores no estriado pode explicar o menor efeito de alstonina sobre a transmissão serotoninérgica nessa estrutura.

De fato, alguns antipsicóticos atípicos, como a clozapina, agem como agonistas inversos em receptores 5HT_{2C}, levando a um aumento na liberação de dopamina, sobretudo no córtex frontal (DE DEURWAERDÈRE *et al.*, 2004), útil no manejo de sintomas negativos (BOCKAERT *et al.*, 2006). No entanto os dados de alstonina sobre a transmissão dopaminérgica sugerem também um aumento do catabolismo intraneuronal de dopamina, demonstrado pelo aumento do metabólito DOPAC. O resultado global da ação da alstonina nas vias dopaminérgicas precisa ser melhor investigado, mas o aumento de degradação de dopamina dentro do neurônio pode resultar de aumento da recaptação sináptica de dopamina (por DAT), do bloqueio da entrada do neurotransmissor na vesícula sináptica (por VMAT) ou ainda o aumento na atividade da enzima MAO. Todos esses mecanismos são neste momento especulativos, no entanto possíveis já que o perfil comportamental encontrado para a ação de alstonina sobre o sistema dopaminérgico parece ser inovador diferindo de outros antipsicóticos. O alcalóide reserpina (possivelmente

produzido pelas mesmas rotas biossintéticas da alstonina) atua sobre transportadores vesiculares de monoaminas; no entanto, esse mecanismo de ação como antipsicótico foi abandonado já que também leva à acentuada hipotensão não provocada por bloqueadores de dopamina (KAPUR e MAMO, 2003). No entanto, esse perfil poderia ser de interesse para o desenvolvimento de fármacos antipsicóticos se a ação fosse específica no SNC.

Como detalhado acima, os efeitos adversos causados pelos antipsicóticos constituem a principal causa de abandono do tratamento. Por isso, um dos objetivos desta dissertação foi avaliar alguns dos possíveis efeitos adversos de alstonina. Estudos prévios demonstram que alstonina não induz catalepsia em roedores (COSTA-CAMPOS *et al.*, 1998), um indicativo de ausência de efeitos extrapiramidais. Alstonina também não possui potencial epileptogênico, como analisado por *kiddling* (COSTA-CAMPOS *et al.*, 2004b). Neste estudo foi demonstrado que alstonina não altera o peso corporal em camundongos durante tratamento sub-crônico (6 dias); no entanto, assim como clozapina, parece alterar o metabolismo de glicose, efeito sugerido pela ausência da diminuição da glicemia após jejum em camundongos tratados com essas drogas. O mecanismo pelo qual clozapina e outros antipsicóticos induzem o diabetes ainda não está claro, e para uma melhor avaliação dos possíveis efeitos de alstonina no metabolismo da glicose são necessários estudos mais específicos. Os níveis plasmáticos de prolactina não são alterados pela administração aguda de alstonina, indicando que a transmissão dopaminérgica na via tuberoinfundibular não é alterada, mais uma indicação de ação diferencial nas vias dopaminérgicas.

A farmacocinética da alstonina não é conhecida. As propriedades físico-químicas inferidas pela estrutura molecular levam a especulações sobre a dificuldade da alstonina em atravessar a barreira hemato-encefálica. Os estudos comportamentais mostram um claro efeito central deste alcalóide, e qualquer dúvida sobre a presença de efeito central 30 minutos após administração intraperitoneal de alstonina em camundongos foi agora descartada pelos dados obtidos com HPLC. A questão de como alstonina, uma amina quaternária, atravessa a barreira hemato-encefálica, se é realmente o alcalóide que age no sistema nervoso central ou um metabólito, são perguntas ainda não respondidas. As possibilidades incluem o papel

de carreadores, a rápida metabolização deste alcalóide em um metabólito passível de atravessar a membrana hemato-encefálica ou ainda alteração de sua polaridade em meio fisiológico. A atividade de alstonina pela via oral ainda não foi avaliada devido à quantidade limitada que dispomos deste composto, mas o extrato SP49000, do qual alstonina é o principal composto, foi ativo por via oral. Além disso, os dados etnofarmacológicos são indicativos de biodisponibilidade oral, embora não se possa descartar que a preparação utilizada na Nigéria seja constituída de um extrato no qual além de alstonina estivessem presentes outras substâncias que podem facilitar a absorção de alstonina. Estudos farmacocinéticos são claramente essenciais para a continuidade dos estudos com alstonina, e experimentos com administração intracerebroventricular (icv) já estão programados.

Para o desenvolvimento destes estudos, é necessária ainda a identificação de fontes abundantes de alstonina. O alcalóide utilizado nesse estudo foi isolado de frutos de *Picralima nitida* Th. & H.Dur. (Apocynaceae), mas sendo alstonina do grupo de alcalóides da reserpina, pode ser encontrada em outras espécies da família Apocynaceae que possuam a rota biossintética para síntese desses alcalóides. Entre as produtoras de alstonina estão a *Alstonia boonei* De Wild, *Rauvolfia vomitória* Afzel, *Rauvolfia serpentina* Baill produtora da reserpina e *Catharanthus roseus* (L.) G. Don produtora dos antitumorais vincristina e vimblastina (IWU, 1993). *Catharanthus roseus* é produzida em larga escala para obtenção de vincristina e vimblastina amplamente usadas na terapia anticancerígena, exemplificando a viabilidade de produção industrial de espécies produtoras desses alcalóides.

Um subsídio importante para uma melhor avaliação do potencial terapêutico de alstonina como agente antipsicótico é a verificação de seus efeitos sobre a função cognitiva, prejudicada em pacientes esquizofrênicos. Uma avaliação deste tipo poderia ser feita, por exemplo, com o modelo de reconhecimento de animais jovens e esquivo inibitória, com protocolos adequados para avaliação de memória de trabalho. Ainda, técnicas neuroquímicas que avaliem pontualmente as hipóteses de mecanismo de ação levantadas por essa dissertação precisam ser realizadas. Entre as possibilidades, autoradiografia quantitativa e *binding* seriam úteis para identificar a ação de alstonina nos alvos moleculares e áreas cerebrais aqui sugeridas.

Esse trabalho ilustra a validade da etnofarmacologia como ferramenta na busca de novos compostos bioativos que além de eventualmente fornecerem moléculas terapeuticamente úteis, podem apontar protótipos de fármacos com mecanismo de ação inovador.

5. Conclusões

Complementando o perfil antipsicótico de alstonina, este trabalho demonstrou que esta possui atividade em modelos de sintomas negativos de esquizofrenia, o que aliado ao seu perfil ansiolítico, é indicativo de possível efetividade no tratamento de sintomas negativos em pacientes esquizofrênicos. Também se verificou alterações na transmissão serotoninérgica e dopaminérgica induzidas por alstonina em córtex frontal e estriado, ambas compatíveis com sua ação em modelos animais relevantes a atividade antipsicótica. O estudo alerta para possíveis efeitos adversos quanto a alterações no metabolismo de glicose.

Especificamente:

- Alstonina aumenta o tempo de interação social em camundongos após tratamento sub-crônico; os resultados também indicam que as alterações neuronais provocadas por alstonina permanecem por ao menos 24 horas após sua administração;
- Alstonina reverte o déficit de interação social induzido por MK801; esse resultado sugere modulação do sistema glutamatérgico, e tem relevância para o manejo de sintomas negativos;
- Alstonina parece aumentar o catabolismo intraneuronal de dopamina, resultando no aumento dos níveis de DOPAC sem alteração dos níveis de HVA; os mecanismos pelos quais alstonina produz essa alteração devem ser esclarecidos por investigações mais específicas;
- Alstonina parece potencializar a transmissão serotoninérgica, resultando no aumento de metabólito 5HIAA verificado em córtex frontal e estriado. Essa ação é compatível com a hipótese de que alstonina atue como agonista inverso $5HT_{2A,C}$ e tem implicações na modulação indireta de vias dopaminérgicas relevantes na esquizofrenia;

– Quanto a efeitos adversos:

Alstonina não parece alterar o ganho de peso corporal com tratamento subcrônico, mas a avaliação desse parâmetro a longo prazo é necessária;

Alstonina impede a queda da glicemia esperada após 3h de jejum, o que pode ser indicativo de que alstonina compartilha com antipsicóticos atípicos a indução de alteração no metabolismo de glicose;

Alstonina não parece alterar os níveis plasmáticos de prolactina, indicando que a transmissão dopaminérgica na via tuberoinfundibular não é afetada por esse alcalóide.

6. Referências

ABI-DARGHAM, A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v.7, n. 1, p.S1-S5, 2004.

AKDEDE, B.B.K.; ALPTEKIN, K.; KITIS, A. ARKAR, H. AKVARDAR, Y. Effects of quetiapine on cognitive functions in schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 29, p. 233-238, 2005.

ALEX, K.D.; PEHEK, E.A. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, p. 296-320, 2007.

ALLDREDGE, B.K. Seizures risk associated with psychotropic drugs: clinical and pharmacokinetic consideration. **Neurology**, v. 53, p. 68-75, 1999.

ANDREASSEN, N. Schizophrenia: the fundamental questions. **Brain. Res. Rev.**, v. 31, p.106-112, 2000.

BALDESSARINI, R.J. Drugs and treatment of psychiatric disorders: psychosis and anxiety. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9^o ed. McGraw-Hill, 1996. Cp.19 p.399-430.

BALICK, M.J.; COX, P.A. **Plants, people, and culture: The science of ethnobotany**. New York: Scientific American Library, 1996. 228 p.

BAN, T.A. Neuropsychopharmacology and genetics of schizophrenia: a history of the diagnosis of schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.28, p.753-762, 2004.

BECKER, A.; GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 28, n. 8, p. 1267-1277, 2004.

BHANJI, N.H.; MARGOLESE, H.C.; CHOUINARD, G.; TURNIER, L. Late-onset agranulocytosis in a patient with schizophrenia after 17 months of clozapine treatment. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 23, n. 5, p. 522-523, 2003.

BOCKAERT, J.; CLAEYSEN, S.; BÉCAMEL, C.; DUMUIS, A.; MARIN, P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. **Cell Tissue Res.**, v. 326, n. 2, p.553-72, 2006.

BOURIN, M.; POISSON, L.; LAROUSSE, C. Piracetam interaction with neuroleptics in psychopharmacological tests. **Neuropsychobiology**. 19: 93-96, 1986.

BREESE, G. R.; KNAPP, D. J.; MOY, S.S. Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptors mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationships to antipsychotic drug action on NMDA antagonist responsiveness. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.26, p. 441-455, 2002.

BRUNDEGER, J.M.; DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Adv Pharmacol.**, v. 39, p. 353-391, 1997.

CAO, B.J.; RODGERS, R.J. Dopamine D4 receptors and anxiety: behavioural profile of clozapine, L-745,870 and L-741,742 in mouse plus-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 335, n. 2-3, p. 117-125, 1997.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effects of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. **Acta. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20, p.140-144,1963.

CEPEDA, C.; LEVINE, M.S. Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. **Sci. STKE.**, pe20, 2006.

COSTA-CAMPOS, L.; LARA, D.R.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. Antipsychotic-like profile of alstonine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.60, n. 1, p. 133-141, 1998.

COSTA-CAMPOS, L.; ELISABETSKY, E.; LARA, D. R.; CARLSON, T. J.; KING, S. R.; UBILLAS, R.; NUNES, D. S.; IWU, M.; NKEMJIKA, C. O.; OZIOKO, A.; AGWU, C.O.C. Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.71, n.2, p. 189 – 201, 1999.

COSTA-CAMPOS, L.; DASSOLER, S.C.; RIGO, A.P.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 77, p. 481-489, 2004a.

COSTA-CAMPOS, L.; IWU, M.; ELISABETSKY, E. Lack of proconvulsant activity of the antipsychotic alkaloid alstonine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, n. 2-3, p. 307 – 310, 2004b.

DE DEURWAERDÈRE, P., NAVAILLES, S.; BERG, K.A., CLARKE, W.P.; SPAMPINATO, U. Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits *in vivo* dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. **J. Neurosci.**, v.24, n. 13, p.3235-3241, 2004.

DI MATTEO, V.; CACHIO, M.; DI GIULIO, C.; ESPOSITO, E. Role of serotonin_{2C} receptors in the control of brain dopaminergic function. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.71, p. 727-734, 2002.

DSM-IV-TR Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 4º ED. Texto revisado. Porto Alegre: Artmed, 2002. 880 p.

DWYER, D.S.; DONOHOE, D. Induction of hyperglycemia in mice with atypical antipsychotic drugs that inhibit glucose uptake. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.75, p. 255-260, 2003.

ELISABETSKY, E.; POSEY, D.A. Pesquisa etnofarmacológica e recursos naturais no trópico úmido: O caso dos índios Kayapó e suas implicações para a ciência médica. **An I. Simp. Trópico Úmido.**, v. 2, p. 85-93, 1985.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Alkaloid alstonine as a prototype drug: a review of its pharmacological properties. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v.3, n.1, p. 39-48, 2006.

ETKIN, N.L.; ELISABETSKY, E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: the future of ethnopharmacology. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, P. 23-26, 2005.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z.. Medicinal plants in therapy. **Bull. World Health Organ.**, v.3, n.6, p. 965-981, 1985

FILE, S.E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **J. Neurosci. Methods**, v. 2, p. 219-238, 1980.

GARDNER, D.M.; BALDESSARINI, R.J.; WARAICH, P. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. **CMAJ.**, v.172, n.13, p.1703-1711, 2005.

GILANI, A.H.; RAHMAN, A. Trends in ethnopharmacology. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p. 43-49, 2005.

HAAN, M.; WYATT, J.S.; ROTH, S.; VARGHA-KHADEM, F.; GADIAN, D.; MISHKIN, M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. **Dev. Sci.**, v.9, n. 4, p. 350-358, 2006.

HALEEM, D.J.; SHIREEN, E.; HALEEM, M.A. Somatodendritic and postsynaptic serotonin 1A receptors in the attenuation of haloperidol-induced catalepsy. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.28, p. 1323-1329, 2004.

HASSON-OHAYO, I.; KRAVETZ, S.; ROE, D.; DAVID, A.S.; WEISER, M. Insight into psychosis and quality of life. **Compr. Psychiatry**, v.47, p. 265-269, 2006.

HECKERT, U.; ANDRADE, L.; ALVES, M. J. M.; MARTINS, C. Lifetime prevalence of mental disorders among homeless people in a southeast city in Brazil. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 249, n. 3, p. 150-155, 1999.

HOLMESTEDT, B.O.; BRUHN, J.G. Ethnopharmacology- A challenge. **J. Ethnopharmacol.**, v.8, n.3, p. 221-256, 1983.

IWU, M. M. (Ed.) **Handbook of African medicinal plants.** Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. 435 p.

- JACOBSON, K.A.; GAO, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic target. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 247-264, 2006.
- JAKAB, R.L.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. 5-Hydroxytryptamine(2A) serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.735-740,1998.
- KAPUR, S.; MAMO, D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D(2) receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 27, n.7, p. 1081-1090, 2003.
- KRISTIANSEN, L.V.; HUERTA, I.; BENEYTO, M.; MEADOR-WOODRUFF, J.H. NMDA receptors and schizophrenia. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 7, p. 48-55, 2007.
- LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. **Med. Hypotheses.**, v. 54, n. 2, p. 157-166, 2000.
- LEAN, M.E.; PANJOK, F.G. Patients on atypical antipsychotics drugs: another high-risk group for type 2 diabetes. **Diabetes Care.**, v.26, n. 5, p. 1597-1605, 2003.
- LIEBERMAN, J.A.; STROUP, T.S.; MCEVOY, J.P.; SWARTZ, M.S.; ROSENHECK, R.A.; PERKINS, D.O.; KEEFE, R.S.; DAVIS, S.M.; DAVIS, C.E.; LEBOWITZ, B.D.; SEVERE, J.; HSIAO, J.K. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **N. Engl. J. Med.** v. 353, n.12, p.1209-23, 2005.
- LOPEZ-GIMENEZ, J.F.; MENGOD, G.; PALACIOS, J.M.; VILARÓ, M.T. Regional distribution and cellular localization of 5-HT_{2C} receptor mRNA in monkey brain: comparison with [3H]mesulergine binding sites and choline acetyltransferase mRNA. **Synapse**, v. 42, n. 1, p.12-26, 2001.
- LUCAS, G.; SPAMPINATO, U. Role of striatal serotonin 2A and serotonin 2C receptors subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum. **J. Neurochem.**, v.74, p. 693-701, 2001
- MARI, J.J.; LEITÃO, R.J. A epidemiologia da esquizofrenia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.22, Supl. I, p. 15-17, 2000.
- MATTHYSE, S. Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? **Fed. Proc.**, v.32, p. 200-205, 1973.
- MARWAHA, S.; JOHNSON, S. Schizophrenia and employment: A review. **Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.**, v.39, p. 337-349, 2004.
- MOHN, A.R.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G.; KOLLER, B.H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. **Cell.**, v.98, p. 427-436, 1999.

- MURPHY, B.P.; CHUNG, Y.C.; PARK, T.W.; MCGORRY, P.D. Pharmacology treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review. **Schizop. Res.**, v. 88, p. 5-25, 2006.
- NORMAM, R.M.G.; MALLA, A. K. Dysphoric mood and symptomatology in schizophrenia. **Psychol. Med.**, v.21, p.897-903, 1991.
- OLNEY, J. W.; FARBER,N.B. Glutamate receptors dysfunction and schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 52, p. 998-1007, 1995.
- QUIAO, H.; NODA, Y.; KAMEI, T.; NAGAI, T.; FURUKAWA, H.; MIURA, H.; KAYUKAWA, Y.; OHTA, T.; NABESHIMA, T. Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. **Neuroreport** , v.12, p.11-15, 2001.
- PINKHAM, A.M.; PENN, D.L.; PERKINS, D.O.; LIEBERMAN, J. Implications for the neural basis of social cognition for the study of schizophrenia. **Am J Psychiatry.**, v.160, p. 815-824, 2003.
- POWELL, C.M.; MIYAKAWA, T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? **Biol. Psychiatry.**, v. 59, p.1198-1207, 2006.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5°ED. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. **Drogas antipsicóticas**. Cap.37 p.598-609.
- RAUSER, L.; SAVAGE, J.E.; MELTZER, H.Y.; ROTH, B.L. Inverse agonist actions of typical and atypical antipsychotic drugs at the human 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 299, n. 1, p.83-9, 2001.
- RUNG, J.P.; CARLSSON, A.; MARKINHUHTA, K.R.; CARLSSON, M.L. (+)-MK801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 29, n.5, p. 827-832, 2005a.
- RUNG, J.P.; CARLSSON, A.; MARKINHUHTA, K.R.; CARLSSON, M.L. The dopaminergic stabilizers (-)-OSU6162 and ACR16 REVERSE (+)-MK801-induced social withdrawal in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.29, n. 5, p. 833-839, 2005b.
- SALOKANGAS, R. K.R.; HONKONEN, .T.; STENGÅRD, E.; KOIVISTO, A.M. To be or not to be married – that is the question of quality of life in men with schizophrenia. **Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.**, v. 36, p. 381-390, 2001.
- SCHULTZ, S.H.; NORTH, S.W.; SHIELDS, C.G. Schizophrenia: a review. **Am. Fam. Physician.**, 75(12): 1822-1829, 2007.
- STONE, J.M.; MORRISON, P.D.; PILOWSKY, L.S. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia- asynthesis and selective review. **J. Psychopharmacol.**, v. 21, n. 4, p. 440-452, 2007.

STONE, J.M.; PILOWSKY, L.S. Novel targets for drugs in schizophrenia. **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.**, v. 6, n.4, p. 1-8, 2007.

TERENIUS, L. Schizophrenia: pathophysiological mechanisms - a synthesis. **Brain. Res. Rev.**, v. 31, p.401-404, 2000.

XIA, Z. A direct interaction of PDS-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 21901-21908, 2003.

7. ANEXO – Carta de aprovação do comitê de ética da UFRGS.