

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

MODULAÇÃO DE VIAS SEROTONÉRGICAS E DOPAMINÉRGICAS POR
ALSTONINA: POSSÍVEL INOVAÇÃO NO MECANISMO DE AÇÃO DE
ANTIPSIÓTICOS

Viviane de Moura Linck

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

MODULAÇÃO DE VIAS SEROTONÉRGICAS E DOPAMINÉRGICAS POR
ALSTONINA: POSSÍVEL INOVAÇÃO NO MECANISMO DE AÇÃO DE
ANTIPSIÓTICOS

TESE DE DOUTORADO

Viviane de Moura Linck

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Elisabetsky

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em
Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre, Maio de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Linck, Viviane de Moura

Modulação de vias serotoninérgicas e dopaminérgicas por alstonina: possível inovação no mecanismo de ação de antipsicóticos / Viviane de Moura Linck. -- 2012. 115 f.

Orientadora: Elaine Elisabetsky.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. antipsicóticos. 2. alstonina. 3. dopamina. 4. serotonina. 5. etnofarmacologia. I. Elisabetsky, Elaine, orient. II. Título.

“Quando você... mexe com meus delírios, com minhas crenças, que não estão alinhadas com a percepção consensual da realidade, você está mexendo com a minha alma.”

Amy Johnson

Paciente esquizofrênica

Schizophrenia Bulletin 38: 207-208, 2012

Agradecimentos

Acredito que todas as teses são feitas com a colaboração de muitas pessoas, mas essa, em especial, foi realizada em colaboração entre três laboratórios, muitas mãos e dois idiomas.

Agradeço à Prof. Elaine simplesmente por tudo. Pela confiança, pelos ensinamentos, pelos xixis, pela risada inconfundível, pelos almoços, pelos chás e acima de tudo pela amizade formada nesses 7 anos de trabalho. Muito obrigada!

Agradezco a Dra. Marta Antonelli por me haber aceptado en su laboratorio, por haber creído en alstonina, por todo lo que me enseñaste, por la paciencia y por ter intentado comprender el portugués. Muchas gracias!

Agradeço ao Prof. Diogo Onofre por ter aberto as portas de seu laboratório, por sempre escutar as mil dúvidas durante as reuniões e pelo senso de humor inconfundível.

Agradeço à Prof. Mirna por ter me trazido ao mundo da ciência, pela amizade e por ter estar ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida acadêmica.

O que seriam de mim sem a minha colega-amiga-irmã Ana Paula? Agradeço por todos os anos juntas, pelo ombro amigo, pela extrema inteligência, pela ajuda em todas as horas, pelo jeito Glorinha de ser, pela paciência, companheirismo, guias de viagens, simplesmente por tudo que tu representa na minha vida.

Agradeço a minha eterna IC Marília Bessa. Pela ajuda nos experimentos, nas seleções musicais, pelos comentários inteligentes, pelo companheirismo, pelas festas, amizade e dedicação.

À velha guarda do laboratório de etnofarmacologia: Ângelo, Micheli e Adriana; agradeço por toda ajuda no início dessa tese, pelo companheirismo, pelas terças-felizes, pelas risadas e pela amizade.

Aos contemporâneos dessa tese no laboratório de etnofarmaco, Camila, Cícero, Elisa e Cássia; agradeço pela alegria diária, por me deixarem escutar a Continental, pela ajuda, pela alegria que era encontrar vocês todos os dias e pela saudade que deixaram na sala dos alunos.

À nova geração do laboratório de etnofarmaco: Cícero (outra vez!), Ricardo, Lully, Guilherme, Marcos, Luciane (nova geração!), agradeço pela ajuda sempre que necessária, pela compreensão das minhas ausências e pela alegria que geram no laboratório. Sigam fortes! Força na peruca!

Los amigos argentinos que me aceptaran en el Lab. 3 como si yo fuera una argentina! Gracias por la ayuda en todo lo que necesite, gracias por muchas veces dejaren sus tesis para ayudarme, gracias por los frutigrans, por los mates y por las clases de castellano de las calles. En especial a las que estuvieran en los últimos momentos: Ezequiela y Eugenia. Seguro que los voy a extrañar!

A mi madre Argentina, Susana Buglione, le agradezco por todos los días que estuvimos juntas! Por la ayuda más que perfecta para todo lo que yo necesitaba desde ratones hasta besos y abrazos. Vos fuera mi familia cuando yo los extrañaba en Buenos Aires y ahora me quedo acá te extrañando del fondo de mi corazón. Te quiero mucho Mamá!

Ao meu chefe do lab 28, Marcelo Ganzella, agradeço pela disposição, por teres aceitado entrar nesse projeto, por todo o ensinamento, pelas risadas, pelas músicas, cervejas e otimismo constante. Muitoobrigada!

À pessoa que diz que uma das coisas de ter se apaixonado por mim é porque eu fazia doutorado! Samuel, te agradeço pelo amor, companheirismo, otimismo, carinho e pela compreensão em todos os dias que precisei estar em outro lugar. Obrigada por sempre me esperar, pelas jantas vias Skype, pela preocupação com meu trabalho, pela ajuda em todos os momentos. Somos uma grande equipe! Ainda teremos muitos desafios por todos os dias das nossas vidas! Obrigada pelo orgulho que sentes pelo meu trabalho. Te amo enormemente!

À minha mãe e meu pai pelo exemplo, apoio, ajuda, incentivo. A minha mãe agradeço pelo caderno de caligrafia, pelos ditados, pelo exemplo de estudo contínuo, pela amizade e por sempre ter acreditado em mim. Ao meu pai agradeço pelas enciclopédias, por ter me levado na banca todo domingo, pelo otimismo, por ter me ensinado o pensamento lógico e científico, pela cerveja, boa comida e amizade. Eu os amo muito!

Agradeço ao Nelson, o melhor cão do mundo!

Agradeço à Deus por sempre me acompanhar, onde quer que eu ande.

Agradeço a secretaria do PPG- bioquímica. Vocês são a melhor secretaria de pós-graduação do mundo, tenho muito orgulho do trabalho exemplar da Sra. Cleia. Também agradeço às secretárias do departamento de Farmacologia: Ângela, Ieda e Dona Jane vocês fazem parte dessa tese.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudo e pelo fomento a pesquisa brasileira.

Apresentação

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos (Parte II). As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos.

Os itens Introdução (Parte I), Discussão e Conclusão (Parte III), encontrados nesta tese, apresentam interpretação e comentários gerais sobre todos os artigos científicos contidos no trabalho. As referências contidas no final da tese referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão.

Sumário

PARTE I.....	2
Resumo	3
Abstract	4
Lista de Abreviaturas.....	5
1. Introdução	7
1.1. Uma brevíssima história da psiquiatria	7
1.2. A abordagem das doenças psiquiátrica no Brasil	8
1.3. Esquizofrenia	10
1.3.1. O sistema dopaminérgico e seu envolvimento na esquizofrenia	14
1.3.2. O sistema serotoninérgico e seu envolvimento na esquizofrenia	19
1.5. Possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da esquizofrenia	27
1.6. Alstonina	30
2. Objetivos	34
2.1. Gerais	34
2.2. Específicos	34
PARTE II.....	36
Capítulo 1	
5-HT _{2A/C} receptors mediate the antipsychotic-like effects of alstonine	37
Capítulo 2	
Serotonin modulation as the key mechanism of alstonine antipsychotic properties: roles of 5HT _{2A} and 5HT _{2C} receptors	43
Capítulo 3	
Alstonine does not block D2 receptors but increases striatal dopamine uptake and modulates DAT and D2 receptors densities: relevance for antipsychotic properties	64
PARTE III.....	89
3. Discussão.....	90
4. Conclusão	100
5. Perspectivas.....	101
Referências	102

PARTE I

Resumo

Ainda que descrita pela primeira vez em 1893 por Emil Kraepelin, a esquizofrenia continua sendo uma doença mental extremamente debilitante e de difícil tratamento. A introdução dos antipsicóticos típicos na década de 50 e dos atípicos na década de 90 mudou consideravelmente a realidade dos esquizofrênicos, no entanto a baixa eficácia (principalmente quanto aos sintomas negativos e cognitivos) associada a alta incidência de efeitos adversos requer inovação na farmacodinâmica de antipsicóticos. Alstonina, um alcaloide indólico, é o componente majoritário de uma preparação utilizada para tratar pacientes esquizofrênicos identificada em 1993 durante uma expedição etnofarmacológica à Nigéria. Alstonina mostra em camundongos um perfil tipo antipsicótico atípico, mas aparentemente difere dos compostos conhecidos sugerindo possíveis diferenças no mecanismo de ação. O objetivo dessa tese foi dar continuidade ao esclarecimento do mecanismo de ação da alstonina, especialmente ao que se refere a sua modulação sobre sistema dopaminérgico e serotoninérgico. Foram utilizados modelos comportamentais com antagonistas específicos, autoradiografia quantitativa e captação sinaptossomal de dopamina para avaliar o efeito de alstonina sobre os receptores 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, D₂ e transportador de dopamina. Os resultados mostraram que o efeito tipo antipsicóticos de alstonina é dependentes dos receptores 5HT_{2A}, 5HT_{2C}; além disso mostrou-se que alstonina liga-se diretamente a receptores 5HT_{2A} mas modula indiretamente receptores 5HT_{2C}. O efeito de alstonina sobre esses receptores pode representar uma estratégia peculiar para modular seletivamente a atividade dopaminérgica em regiões corticais e límbicas, compatível com o desequilíbrio alegado para a patofisiologia da esquizofrenia. Um achado digno de nota é que diferindo de todos os antipsicóticos em clínica, os nossos resultados mostram que alstonina não possui afinidade por receptores dopaminérgicos D₂. Ainda que preliminares, os nossos dados mostram que a administração aguda de alstonina aumenta a captação de dopamina, um mecanismo possível para diminuir a ativação de receptores dopaminérgicos pós sinápticos responsáveis por sintomas positivos. Ainda que haja lacunas no conhecimento do mecanismo de ação de alstonina, este estudo reforça a hipótese de um mecanismo de ação inovador potencialmente útil como protótipo para novos antipsicóticos.

Abstract

Although first described in 1893 by Emil Kraepelin, schizophrenia continues to be an extremely debilitating and difficult to treat mental illness. The introduction of typical antipsychotics in the 50s and atypical in the 90s has considerably changed the reality of schizophrenics, but the low efficacy (especially for the negative and cognitive symptoms) associated with the high incidence of adverse effects requires innovation in the pharmacodynamics of antipsychotics. Alstonine, an indole alkaloid, is the major component of a preparation used for treating mental patients identified in 1993 during an ethnopharmacology field study in Nigeria. In mice alstonine shows the profile of an atypical antipsychotic but, apparently, differs from known compounds suggesting possible differences in the mechanism of action. The aim of this thesis was to continue to clarify the mechanism of action of alstonine, especially with regard to its modulation of dopamine and serotonin system. Behavioral models, specific antagonists, quantitative autoradiography, and dopamine synaptosomal uptake assays were used to evaluate the effect of alstonine on the 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, and D2 dopamine transporter. The results showed that the antipsychotic-like effects of alstonine depend on the 5HT_{2A} and 5HT_{2C} serotonin receptor subtypes; additionally, we showed that alstonine directly binds to 5HT_{2A} receptors but indirectly modulates 5HT_{2C}. The effects of alstonine on these receptors may represent a unique strategy to selectively modulate dopamine activity in limbic and cortical regions, consistent with the imbalance alleged for schizophrenia pathophysiology. Noteworthy is the finding that unlike all antipsychotics in clinical practice, our results show that alstonine has no affinity for dopamine D2 receptors. Though preliminary, our data indicate that acute administration of alstonine increases the uptake of dopamine, a possible mechanism for decreasing the activation of post synaptic dopamine receptors responsible for schizophrenia positive symptoms. In spite of the gaps in the knowledge of the alstonine antipsychotic mechanism of action, this study reinforces the hypothesis that it presents a novel mechanism of action potentially useful as a prototype for innovative antipsychotics.

Lista de Abreviaturas

3MT	3-metoxitiramina
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
5HT	serotonina
CAPS	Centros de Atenção Psicossocial
CATIE	<i>Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness</i>
COMT	catecol-O-metil transferase
CPu	caudato-putamen
DA	dopamina
DAT	transportador de dopamina
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EPS	sintomas extrapiramidais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	ácido gama-amino-butírico
HVA	ácido homovanílico
L-DOPA	L-diidroxifenilalanina
LSD	dietilamida do ácido lisérgico
MAO	monoamina oxidase
NAc	núcleo accumbens
NAPS	Núcleos de Atenção Psicossocial
NET	transportador de noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	receptores NMDA
SERT	transportador de serotonina
SN	substância nigra

VMAT2 transportador vesicular de monoamina do tipo 2
VTA área tegmental ventral

1. Introdução

1.1. Uma brevíssima história da psiquiatria

A noção de “loucura” parece ser tão antiga quanto a humanidade. Crânios datados de 5000a.C. já apresentam sinais de trepanação, resquícios da tentativa de libertar os espíritos responsáveis pela insanidade. A história da psiquiatria, ou melhor, da relação da sociedade com a doença mental, se mescla com o desenvolvimento do pensamento racional e científico. No início, a insanidade esteve fortemente relacionada com a religiosidade. A crença em diversas culturas é que seriam espíritos os responsáveis pela alteração de comportamento. Com o surgimento do catolicismo, o pecado, a fé e a vontade divina também passaram a fazer parte das possíveis causas da insanidade. Era, por isso, função da Igreja católica “tratar” crises convulsivas e exorcizar espíritos. Na idade média, doentes mentais eram tratados da mesma maneira que bruxos e hereges. Embora o pensamento sobre psique e a idéia de doenças da mente tenham surgido na Grécia Antiga (50-40a.C.), a desvinculação da doença mental da religião ocorreu somente no Renascimento, onde as idéias de Aristóteles sobre o comportamento e a mente serviram de base para o pensamento psiquiátrico moderno (Porter 2002).

Até o século XV a responsabilidade pelos doentes mentais era da família, que os mantinham, na maioria das vezes, presos e escondidos em suas próprias casas. Antes do surgimento das grandes cidades era razoavelmente fácil manter os doentes longe da sociedade em grandes propriedades rurais, já que ainda existia um sentimento de vergonha e punição divina pela existência de tais indivíduos numa família. Os primeiros hospícios surgem no final do século XV impulsionados pela necessidade de abrigar doentes mentais que não poderiam perambular pelos recém

formados aglomerados urbanos. No final do século XVII, com o crescimento do absolutismo francês, todos os moradores de ruas (ladrões, prostitutas, andarilhos, pobres, etc) são recolhidos aos hospícios que possuíam muito mais um caráter policial que de tratamento. Essa prática notoriamente contribuiu para estigmatizar ainda mais os doentes mentais. As terapias da época baseavam-se em métodos físicos, como indução de vômito, banhos frios, castigos físicos, lobotomia e sangrias.

Sob a luz das idéias iluministas, no século XVIII, começam a surgir novas formas de ver e tratar os pacientes internados em hospícios. Não parece surpreendente que o fato do Rei George III da Inglaterra necessitar de cuidados psiquiátricos tenha influenciado mudanças na forma de tratamento de paciente mentais, já que não se poderia simplesmente prender e castigar um rei. A nova abordagem chamada de “terapia moral” preconizava que os hospícios deveriam funcionar como um lar; os internos deveriam ter uma vida próxima à normal com horários para lazer e trabalho, e ainda deveriam sentar-se juntos a mesa para as refeições. Nesse contexto, e fortemente influenciado pelas idéias da Revolução Francesa, o médico francês Philippe Pinel, provoca uma verdadeira revolução no tratamento das doenças mentais. Sua filosofia fundamental era que sendo a insanidade uma desordem mental as abordagens físicas além de não terem valia ainda poderiam piorar os sintomas, os tratamentos deveriam então penetrar na psique do indivíduo para atingir a causa da doença: surgia assim o conceito de psicoterapia. A revolução iniciada por Philippe Pinel além de mudar a estrutura dos hospícios espalhou-se por todo mundo, sendo hoje considerado como o pai da psiquiatria moderna (King 1999 a; b; c; Porter 2002).

1.2. A abordagem das doenças psiquiátrica no Brasil

A história da assistência aos doentes psiquiátricos no Brasil, bem como a relação da sociedade em geral com a doença mental é reflexo do que acontecia em boa parte do mundo ocidental. No período colonial médicos eram raros no país e os cuidados médicos eram realizados por curandeiros de todas as crenças, inclusive sacerdotes católicos, especialmente os jesuítas. Posteriormente ocorreu a fundação dos Hospitais da Irmandade de Santa Casa de Misericórdia, que, no entanto não possuíam a especialidade psiquiatria. Até o final do século XVIII, as Santas Casas exerciam mais uma função de albergue que de hospital propriamente dito. Depois da Revolução Francesa ocorre a reforma da psiquiatria na França que serviu de exemplo para o mundo ocidental, e sob influência dos franceses nasce a assistência psiquiátrica pública no Brasil. Em 1852 foi inaugurado no Rio de Janeiro o Hospício Pedro II, um prédio suntuoso e moderno que na época serviu de modelo para a construção dos demais hospícios do país. Hoje, o prédio chamado de Palácio Universitário da Praia Vermelha pertence à Universidade Federal do Rio de Janeiro. Outro marco é a fundação sob administração pública, em 1890, da Assistência Médico-Legal dos Alienados (Miranda-Sá Jr 2007).

A grande revolução da clínica psiquiátrica, no entanto, só ocorreu na década de 50 com a descoberta dos psicofármacos, entre eles os antipsicóticos. Em 1978 inicia-se o movimento de reforma psiquiátrica no Brasil, expressa no Movimento dos Trabalhadores de Saúde Mental (MTSM). O movimento propunha o fim dos manicômios e a reinserção dos doentes mentais na sociedade. Vários movimentos começaram a surgir com o propósito da desospitalização dos pacientes psiquiátricos, e entre 1991 e 2001 diversas portarias do Ministério da Saúde oficializaram a descentralização e a municipalização da atenção psiquiátrica. Em vários estados foram aprovadas leis que determinam a progressiva substituição dos

leitos psiquiátricos por uma rede integrada de atenção à saúde mental. Surgem os primeiros Centros de Atenção Psicossocial (CAPS) e os Núcleos de Atenção Psicossocial (NAPS). Em 2001 é aprovada a Lei Ordinária 10216/2001, modificação do projeto de lei PL 3657/1989, que dispõem sobre a extinção progressiva dos manicômios e sua substituição por outros recursos assistenciais e regulamenta a internação psiquiátrica compulsória. Várias portarias começaram a regulamentar o mecanismo da desospitalização, entre eles o projeto “de volta pra casa” de 2003 que instituiu um auxílio mensal para pacientes que passaram por longos períodos de internação psiquiátrica (Borges e Baptista 2008). Atualmente existem no Brasil 1.924 CAPS (dados de novembro de 2010) e 3.574 beneficiários do programa “de volta pra casa” (dados de julho 2010) (fonte: www.datasus.gov.br).

O progresso da clínica psiquiátrica se deve em grande medida ao desenvolvimento de psicofármacos. Algumas doenças psiquiátricas ainda precisam que novas drogas sejam descobertas para que a integração social dos pacientes seja possível; a principal destas (tanto pela gravidade como pela incidência) é a esquizofrenia. Há um século três doenças privavam os doentes do convívio social e os levava a serem isolados em instituições específicas e tipicamente afastadas dos centros urbanos: a doença mental, a tuberculose e a lepra. Dessas, somente a doença mental continua sem alterações quanto à prevalência e incapacidade (Insel 2010).

1.3. Esquizofrenia

Acredita-se que a esquizofrenia seja tão antiga como a espécie humana. Os relatos mais antigos de psicose datam de 1400 a.C. e estão descritos nos Vedas, textos escritos em sânscrito e base do hinduísmo. Relatos sugestivos de

esquizofrenia paranóide foram feitos por babilônicos (ainda em escrita cuneiforme) e também por mesopotâmicos. Em 1893, na quarta edição de seu livro “Compendium der Psychiatrie”, Emil Kraepelin descreveu pela primeira vez a *dementia praecox*, ainda agrupada dentro dos “processos degenerativos psíquicos”. Ele a definia como uma demência (*dementia*), que ao contrário das outras iniciava mais cedo, ainda no período da adolescência (*praecox*). Já na quinta edição, Kraepelin separa *dementia praecox* de outras demências e essa passa a ser dividida em paranóica e parafrenica. Após várias observações o próprio Kraepelin já concluía que essa patologia estava distribuída igualmente em todo o mundo e que assim não era afetada por nenhuma raça, por nenhum clima ou hábito alimentar. Sua única relação era que havia uma maior incidência de *dementia praecox* em crianças que haviam nascido com complicações obstétricas (Adityanjee et al. 1999).

Foi em 1908 que o psiquiatra suíço Eugene Bleuler introduziu o termo esquizofrenia, do grego *skhizein*- dividido *ephren*- mente (McGlashan 2011). A principal justificativa para a troca do nome é que, segundo as observações de Bleuler, a *dementia praecox* não acometia somente adolescentes podendo iniciar-se mais tarde (McGlashan 2011). Ele afirmava que a esquizofrenia era um distúrbio de pensamento caracterizado por separação/divisão associativa. Foi dele a proposição dos quatro “A” da doença: perda das associações, embotamento afetivo, autismo e ambivalência (Adityanjee et al. 1999). Atualmente, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) define esquizofrenia, tanto para fins de diagnóstico, como para fim de tratamento, 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 (Association 2002).

A esquizofrenia é até hoje uma doença de difícil definição já que existe uma gama de sintomas que se apresentam em espectro de intensidade diferente em cada paciente. Os sintomas da esquizofrenia são classificados como: positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas positivos se caracterizam por uma exacerbação e incluem: ilusões, alucinações, distúrbios de pensamento, entre outros. Já os sintomas negativos podem ser vistos como uma inibição e fazem parte: dificuldade ou ausência de interação social, embotamento afetivo e timidez excessiva. Apenas recentemente os sintomas cognitivos passaram a ser incluídos na caracterização da doença; o paciente esquizofrênico apresenta desconexões e rigidez de raciocínio, déficits de memória de trabalho e função executiva, com forte repercussão na linguagem, aprendizado e memória (Kivircik Akdede et al. 2005; Schaub et al. 2011).

Como já havia observado Kraepelin, a incidência da esquizofrenia é praticamente a mesma em todo mundo. A prevalência mundial da esquizofrenia ao longo da vida é comumente estimada em 1% da população, mas podem ocorrer variações principalmente devido a variações metodológicas e nos critérios de diagnóstico utilizados. Em um estudo mais recente (Perälä et al. 2007), a prevalência foi estimada em 0,87% da população. No Brasil e na América latina, estima-se que a prevalência fique em torno de 1% (Mari e Leitão 2000). Em geral seu início ocorre nos primeiros anos da fase adulta e é mais frequente em homens que em mulheres (Andreasen 2000).

Mesmo mais de um século depois de seu primeiro relato psiquiátrico a esquizofrenia continua sendo uma das doenças psiquiátricas mais devastadoras e incapacitantes (Meyer-Lindenberg 2010). Na Europa menos de 20% das pessoas com esquizofrenia estão empregadas (Folsom et al. 2005). Heckert e colaboradores (1999) mostraram que 9,6% dos moradores de rua da cidade de Juiz de Fora no

estado de São Paulo eram esquizofrênicos. Uma pesquisa feita por uma agência de advocacia americana demonstrou que nos Estados Unidos uma pessoa com doença psiquiatria grave (entre elas principalmente a esquizofrenia) possui 3 vezes mais chances de ser encontrado no sistema judiciário por algum crime que em hospitais (Insel 2010) (<http://www.treatmentadvocacycenter.org>).

A esquizofrenia pertence a um grupo de doenças complexas (como câncer e diabetes), de etiologia multifatorial, sendo que a manifestação da doença é resultado de interações entre susceptibilidades genéticas e exposição a fatores ambientais. Quanto a fatores ambientais, estudos recentes mostraram que crescer em áreas urbanizadas, fazer parte de grupos minoritários, sofrer trauma na infância e consumir maconha na adolescência estão associados com quadros psicóticos (van Os et al. 2010), além da associação entre infecção materna durante a gestação e aumento da incidência de esquizofrenia na prole (Brown e Patterson, 2011). Os genes, por sua vez, exercem impacto por alterar a sensibilidade do indivíduo aos fatores ambientais, resultando na criação de subgrupos mais vulneráveis a certos riscos como os citados acima (Di Forti et al. 2007). Apesar dos avanços na constatação destas associações, ainda não se sabe ao certo quais genes e fatores estão realmente implicados, ou como eles determinam o surgimento da doença.

Muito se questionou se a esquizofrenia seria uma doença neurodegenerativa, principalmente com sua primeira associação com as demências senis. Alterações neuroanatômicas em estudos *post-mortem* e de imagem foram relatadas, incluindo ventrículos aumentados, sulcos cerebrais proeminentes, redução no tamanho dos hipocampos e redução de matéria cinzenta (Andreasen 1994). Entretanto, os primeiros estudos histológicos não observaram gliose, diferenciando os processos neuropatológicos envolvidos na esquizofrenia nas demências senis (Rund 2009).

Vem sendo proposto que em vez da perda de neurônios (neurodegeneração) ocorra uma perda da função e conectividade desses neurônios (Hayashi-Takagi e Sawa 2010) essas observações contribuíram para a formulação de uma hipótese alternativa à neurodegeneração. A hipótese neurodesenvolvimental da esquizofrenia propõe que alterações durante o desenvolvimento do encéfalo, sobretudo no sistema glutamatérgico, levariam a perda de conectividade e as alterações morfológicas observadas nos pacientes esquizofrênicos (Weinberger e McClure 2002; Hayashi-Takagi e Sawa 2010). Determinar se processos neurodegenerativos estão envolvidos na esquizofrenia, ou se ela é decorrência de um processo neurodesenvolvimental, ou ainda se os dois processos estão presentes na doença auxiliaria no desenvolvimento de novas terapias e até mesmo numa possível prevenção da doença (Rund 2009).

Na realidade, pouco se sabe sobre as bases neurobiológicas responsáveis pela doença. Estudos de neuroimagem têm contribuído muito para o entendimento do funcionamento do encéfalo do paciente esquizofrênico (Meyer-Lindenberg 2010). Alterações neuroquímicas relevantes a essa tese serão discutidas nos tópicos subsequentes. Como discutido por Kim e Stahl (2010) em recente revisão, o que se sabe hoje são apenas “partes” da doença, mas o “todo” ainda permanece desconhecido. Mais do que isso o, “todo” não é a simples soma das “partes” e por isso muito ainda terá que ser desvendado até que tenhamos uma visão completa e consistente da patofisiologia subjacente à esquizofrenia.

1.3.1. O sistema dopaminérgico e seu envolvimento na esquizofrenia

O sistema dopaminérgico central é composto por quatro vias principais: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular (Fig.1). A via

mesolímbica é formada por projeções da área tegmental ventral (VTA) para o sistema límbico e está principalmente envolvida com motivação e saliência. A via mesocortical se projeta do VTA à estruturas corticais, principalmente para o córtex frontal, tendo um papel importante na tomada de decisões e processos cognitivos (atenção, memória de trabalho e função executiva). Na via nigroestriatal as projeções iniciam na substância nigra (SN) e se projetam para o corpo estriatal, sendo de importância fundamental para o controle de movimentos. A via tuberoinfundibular inerva a glândula pituitária e possui papel inibitório sobre a secreção do hormônio prolactina. (Kandel et al. 2003; Stahl 2008; Remington et al. 2011)

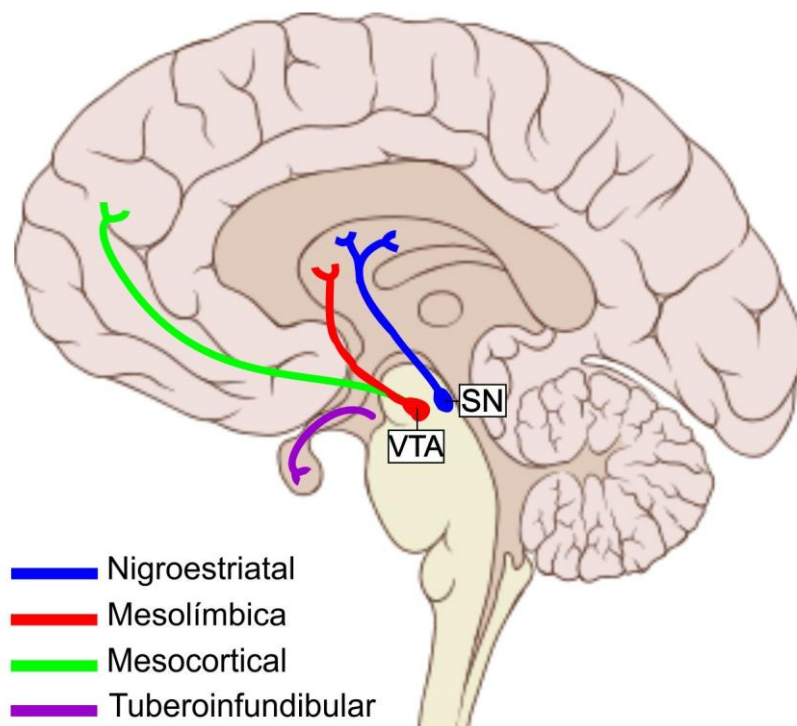


Figura 1: Vias dopaminérgicas.

A dopamina é uma amina biogênica sintetizada a partir do aminoácido essencial tirosina; a enzima tirosina hidroxilase converte tirosina em L-

diidroxifenilalanina (L-DOPA) a qual é descarboxilada pela L-DOPA descarboxilase formando dopamina e CO_2 . A tirosina hidroxilase é a enzima limitante da síntese de dopamina. Após ser sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas sinápticas; sua entrada na vesícula se dá através do transportador vesicular de monoamina do tipo 2 (VMAT2). Após ser liberada na fenda sináptica o efeito da dopamina é terminado por difusão espontânea, degradação pela enzima local ou pela recaptação para o terminal pré-sináptico através do transportador de dopamina (DAT). De todos os mecanismos de inativação o principal deles é a recaptação, responsável por regular a concentração de dopamina na fenda sináptica. Após recaptada a dopamina pode ser degradada ou ser transportada novamente para dentro das vesículas sinápticas. As duas principais enzimas envolvidas na degradação da dopamina são a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). Pela ação da MAO dopamina é oxidada a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e pela ação da COMT a 3-metoxitiramina (3MT), por fim ambos os metabólitos são convertidos em ácido homovanílico (HVA) pela ação da COMT. Estando a MAO na membrana mitocondrial e a COMT na membrana externa do neurônio pós-sináptico, DOPAC é considerado o metabólito intraneuronal da dopamina enquanto o HVA o extraneuronal. (Kandel et al. 2003; Stahl 2008).

Após ser liberada pelo terminal pré-sináptico, a dopamina ativa seus receptores D1-D5 todos acoplados a proteína G. Conforme o tipo de proteína G a que esses receptores estão acoplados eles são divididos em duas classes: D1 e D2. A classe D1 inclui os receptores D1 e D5 e ativa a proteína G_s excitatória que leva a produção de AMPc; são receptores exclusivamente pós-sinápticos. Os receptores da classe D2 são acoplados a proteína G_{α_i} inibitória e por isso levam a inibição da adenilatociclase; os receptores D2 e D3 podem atuar como pós-sinápticos, mas

também como autoreceptores regulando a liberação de dopamina (Beaulieu e Gainetdinov 2011).

O transportador de dopamina (DAT) é membro da família dos transportadores neuronais simporters dependentes de Na^+ , possui 12 domínios transmembrana com os terminais carbonil e amino localizados dentro da membrana neuronal (Volz e Schenk 2005). É responsável pela manutenção da concentração de dopamina na fenda sináptica e está distribuído na maioria das regiões dopaminérgicas com exceção do córtex frontal, nessa região se acredita que o transportador de noradrenalina (NET) e a enzima COMT sejam responsáveis por eliminar a dopamina da fenda sináptica (Carboni et al. 1990; Morón et al. 2002). Por possuir um importante papel como modulador da sinapse dopaminérgica, DAT é alvo de várias drogas psicoestimulantes como metilamfetamina, amfetamina e modafenil, além das drogas de abuso como cocaína e d-metanfetamina (Schmitt e Reith 2010). Interessantemente, o DAT é capaz tanto de captar como liberar dopamina (Cragg e Rice 2004). A ação do DAT pode ser modulada de muitas maneiras, ele é sensível a fosforilação pela proteína cinase C (que o inibe) bem como ao gradiente iônico Na^+/Cl^- , além de poder ser rapidamente internalizado (Leviel 2011).

A primeira hipótese neuroquímica da esquizofrenia foi a Hipótese Dopaminérgica, onde se postulava que um aumento na transmissão dopaminérgica seria responsável pelos sintomas da doença. Essa hipótese foi baseada em duas observações: (1) drogas que aumentavam a transmissão dopaminérgica (ex. amfetamina) produziam em indivíduos normais sintomas psicóticos e pioravam os sintomas positivos em pacientes esquizofrênicos; (2) drogas que produziam efeito antipsicótico (ex. clorpromazina, haloperidol) eram antagonistas de receptores D2 dopaminérgicos (Snyder et al. 1970; Creese et al. 1976; Seeman et al. 1976). No

entanto esta hipótese não conseguia explicar os sintomas negativos e cognitivos da doença, nessa lacuna surgiram ao longo dos anos várias hipóteses envolvendo outros neurotransmissores sendo a principal delas a hipótese glutamatérgica (Olney et al. 1999). Aproximadamente 20 anos atrás a hipótese dopaminérgica clássica começou a ser reformulada levando em conta os outros sintomas da doença (Davis et al. 1991). Através de estudos de neuroimagem observou-se que os pacientes esquizofrênicos apresentam uma diminuição na transmissão dopaminérgica nas áreas corticais, mas ao mesmo tempo possuem uma hiperestimulação na via dopaminérgica mesolímbica. A visão atual é de que exista um desequilíbrio no sistema dopaminérgico, por um lado ocorre uma hiperestimulação da via mesolímbica induzindo os sintomas positivos, enquanto por outro ocorre uma hipostimulação da via mesocortical levando aos sintomas negativos e cognitivos (Abi-Dargham 2004). Esse desequilíbrio é possível porque 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 (Carlsson et al. 2001; Abi-Dargham 2004; Alex e Pehek 2007; Fink e Göthert 2007). Fármacos capazes de modular seletivamente as vias dopaminérgicas seriam, portanto, de grande interesse para a terapia da esquizofrenia.

Alterações pré-sinápticas nos neurônios dopaminérgicos vêm sendo frequentemente relatadas, principalmente em áreas estriatais, em pacientes esquizofrênicos (Miyake et al. 2011). A síntese de dopamina, e conseqüentemente o armazenamento, está aumentada em pacientes esquizofrênicos, sendo mais evidente em pacientes com psicose ativa (Reith et al. 1994; Hietala et al. 1999; Meyer-Lindenberg et al. 2002; Howes e Kapur 2009; Nozaki et al. 2009). Além disso,

o aumento de síntese também é observado em indivíduos com sintomas prodômicos da doença, indicando que a elevação da síntese de dopamina pode estar relacionada com a vulnerabilidade genética da doença (Huttunen et al. 2008). A quantidade de dopamina liberada também está aumentada, principalmente a liberada de forma tônica (basal) (Laruelle et al. 1996; Abi-Dargham et al. 1998; Abi-Breier et al. 1997; Dargham et al. 2000; Kegeles et al. 2010). No entanto, os transportadores DAT e VMAT2 não estão alterados (Miyake et al. 2011).

1.3.2. O sistema serotoninérgico e seu envolvimento na esquizofrenia

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é sintetizada a partir do aminoácido triptofano e pertence ao grupo de compostos indóis aromáticos. A síntese da serotonina (5HT) ocorre em dois passos, primeiro ocorre a hidroxilação do triptofano pela enzima triptofanohidroxilase formando 5-hidroxitriptofano, posteriormente descarboxilado pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase resultando em serotonina. (Kandel et al. 2003).

Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos são encontrados no núcleo da rafe, as projeções desses neurônios estão amplamente distribuídas pelo encéfalo e medula espinal (Kandel et al. 2003). Está envolvidas em funções importantes do sistema nervoso central como controle da pressão arterial, temperatura corporal, apetite, liberação de prolactina e de outros hormônios, percepção de dor, comportamento emocional, atenção e alguns processos cognitivos (Kandel et al. 2003; Fink e Göthert 2007).

Foram identificados 14 tipos de receptores serotoninérgicos pertencentes a 7 família (5HT₁-5HT₇). A maioria desses receptores pertence à família de receptores acoplados a proteína G; a exceção é o receptor 5HT₃ que é ionotrópico. Os

receptores $5HT_{2A}$ e $5HT_{2C}$, que possuem grande relevância no tratamento da esquizofrenia, são acoplados a proteína $G_{q/11}$ que ativa fosfolipase C (Kandel et al. 2003; Fink e Göthert 2007). O transportador de serotonina (SERT) presente na membrana do neurônio pré-sináptico é responsável por terminar o efeito da serotonina na fenda sináptica (Gainetdinov e Caron 2003). Dentro do neurônio a serotonina é metabolizada pela MAO em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Kandel et al. 2003).

Os neurônios serotoninérgicos modulam a liberação de vários outros neurotransmissores (Alex e Pehek 2007; Fink e Göthert 2007). Essas modulações podem ocorrer por dois mecanismos: (1) diretamente através de heteroreceptores serotoninérgicos presentes nos axônios terminais de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos ou GABAérgicos; (2) através de heteroreceptores presentes em interneurônios GABAérgicos que controlam a liberação de dopamina, acetilcolina e noradrenalina (Fink e Göthert 2007). A modulação serotoninérgica sobre a liberação de dopamina é, evidentemente, de grande interesse para a área da esquizofrenia (Meltzer e Massey 2011). Diferentes tipos de receptores serotoninérgicos estão distribuídos nas vias dopaminérgicas, além disso, devido a complexos circuitos neuronais um mesmo tipo de receptor serotoninérgico pode ter efeitos antagônicos conforme a via dopaminérgica. Isso possibilita uma modulação via/receptor específica (Alex e Pehek 2007; Fink e Göthert 2007). A ativação de receptores $5HT_{2A}$ em interneurônios GABAérgicos no VTA e SN diminui a liberação de DA em córtex frontal, núcleo accumbens (NAc) e caudato-putamen (CPu) (Fink e Göthert 2007). Dessa forma antagonistas $5HT_{2A}$, como os antipsicóticos atípicos, aumentariam DA no córtex frontal (Fink e Göthert 2007), o que seria de grande valia

no manejo de sintomas negativos e cognitivos. Além disso, o aumento de DA em CPu diminui a indução de efeitos adversos motores (Kim e Stahl 2010).

Os receptores 5HT_{2C} regulam a liberação tônica de DA nas vias mesolímbica e nigroestriatal (Alex e Pehek 2007). A ativação desses receptores melhora os sintomas positivos da esquizofrenia graças a redução da liberação de DA na via mesolímbica (Millan et al. 1998; Alex e Pehek 2007; Fink e Göthert 2007). No entanto existe a sugestão de que agonistas 5HT_{2C} poderiam piorar os sintomas cognitivos e induzir efeitos adversos motores por também diminuir DA no córtex frontal e em CPu (Kim e Stahl 2010). Alguns antipsicóticos atípicos são antagonistas 5HT_{2C} (Meltzer e Massey 2011). Receptores 5HT_{2C} localizados no hipotálamo estão associados com ganho de peso (Miller et al. 2005), e vem sendo sugerido que o bloqueio desse receptor combinado com a ativação de receptores de histamina H1 seriam os responsáveis pelo ganho de peso induzido por antipsicóticos atípicos (Kim e Stahl 2010).

Na década de 50, observações entre a semelhança estrutural da 5HT e o alucinógeno dietilamida do ácido lisérgico (LSD) levaram às primeiras correlações entre hiperestimulação serotoninérgica e a esquizofrenia (Geyer e Vollenweider 2008). Na década de 80, esse interesse foi reacendido pela introdução do antipsicótico atípico clozapina, que apresenta afinidade por vários receptores serotoninérgicos (Ebdrup et al. 2011). Estudos *post-mortem* têm mostrado alterações no sistema serotoninérgico de pacientes esquizofrênicos (Abi-Dargham 2007). As alterações mais consistentes são a diminuição cortical de SERT (Joyce et al. 1993; Laruelle et al. 1993; Ohuoha et al. 1993) e o aumento dos receptores 5HT_{1A} (Simpson et al. 1996; Sumiyoshi et al. 1996; Burnet et al. 1996; 1997; Gurevich e Joyce 1997;). Também

foram relatadas alterações em receptores 5HT₂, mas os estudos ainda não são conclusivos (Abi-Dargham 2007).

1.4. Antipsicóticos

Em 1951, a indústria Rhone-Poulenc sintetizou compostos anti-histamínicos para serem usados no período pré-operatório para diminuir a ansiedade e potencializar a anestesia. Uma dessas drogas era a clorpromazina, que chamou a atenção por em teste com animais produzir um estado de indiferença. O médico Henri Laborit, em colaboração com Huguenard, resolveu incluir essa droga em um “coquetel lítico” utilizado na pré-anestesia. A observação de que a clorpromazina induzia nos pacientes um interessante estado de indiferença com baixa indução de sonolência e sem perda da consciência chamou atenção da possibilidade do uso psiquiátrico desse fármaco. Os psiquiatras Pierre Deniker e Jean Delay iniciaram o uso de clorpromazina em pacientes e o resultado foi impressionante (Kapur e Mamo 2003; Ban 2007). A clorpromazina foi aprovada para uso psiquiátrico em 1954 pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA). Estima-se que em 1964 50 milhões de pessoas no mundo já haviam sido tratadas com clorpromazina, uma revolução no manejo que desordens psiquiátricas (Kane e Correll 2010).

Paralelamente, o alcalóide reserpina era isolado da *Rauwolfia serpentina*. A *Rauwolfia serpentina* era utilizada tradicionalmente na Índia, chegando a fazer parte do sistema Ayurveda de medicina. Conhecida “*pagal-ka-dawa*” (cura para insanidade) era utilizada tradicionalmente para insônia e insanidade. Os relatos e observações etnofarmacológicas chamaram a atenção do ocidente para reserpina, que em 1956 foi aprovada pelo FDA para tratamento da esquizofrenia (Curzon 1990; Kapur e Mamo 2003).

Esses primeiros fármacos foram inicialmente chamados de tranquilizantes maiores, e mais tarde de neurolépticos, já que induziam comportamento neuroléptico caracterizado por apatia, anedonia, falta de motivação e redução de interesse por qualquer atividade. Somente duas décadas após a descoberta da clorpromazina e da reserpina que surgiu o termo antipsicótico (Kapur e Mamo 2003; Stahl 2008). A reserpina já deixou de ser utilizada como antipsicótico, teve papel importante 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 dois fármacos revolucionaram a forma de tratar e encarar a esquizofrenia, modificando inclusive os sistemas de hospitais psiquiátricos (Duval e Goldman 2000), a figura 2 mostra um anúncio publicitário de 1982 do medicamento Thorazine[®] (clorpromazina) e ilustra a revolução no tratamento da esquizofrênica após a descoberta dos antipsicóticos.

BEFORE THE REVOLUTION

Tortured minds and shackled limbs — common conditions from an era past. The era before the introduction of 'Thorazine', an event that was to revolutionize psychiatric care.

Back in 1954, 'Thorazine' was notable for its effective control of the manifestations of psychosis, for increasing patient accessibility to psychotherapy, for helping restore large numbers of patients to productive lives in the community. Today, 28 years later, it still is.

THORAZINE[®] Tablets: 50 and 100 mg. of the HCl

brand of
CHLORPROMAZINE

The original chlorpromazine.

From SK&F, pioneers in psychopharmacology.

Please see next page for a brief summary of prescribing information

SK&F
a SmithKline company

Figura 2: Publicidade do medicamento Thorazine[®](clorpromazina) de 1982.

Vários outros antipsicóticos foram desenvolvidos nas décadas de 60 e 70. O mecanismo desses primeiros antipsicóticos, assim como o da clorpromazina, baseava-se no antagonismo de receptores dopaminérgicos D2. O bloqueio desses

receptores na via mesolímbica leva a uma melhora significativa dos sintomas positivos, mas, no entanto, esse bloqueio nas outras vias dopaminérgicas produz um grande número de efeitos adversos. Os principais são os chamados sintomas extrapiramidais (EPS), distúrbios motores resultantes do bloqueio de receptores D2 na via nigroestriatal, que incluem: parkinsonismo, discinesia tardia, acatisia e distonia. Outro efeito adverso clássico desses fármacos é o aumento do hormônio prolactina, consequência do bloqueio de receptores D2 na via tuberoinfundibular. Mesmo tendo sido uma revolução no tratamento da esquizofrenia, o tratamento com os primeiros antipsicóticos ainda apresentava vários problemas. Além da grande incidência de efeitos adversos, uma grande porcentagem dos pacientes é resistente a esses fármacos e existe pouca ou nenhuma melhora dos sintomas negativos e cognitivos. (Gardner et al. 2005)

Somente três décadas depois o cenário da terapêutica da esquizofrenia começou a mudar. Em 1989, foi aprovado um novo antipsicótico indicado para pacientes refratários e que não causava efeitos adversos motores. Embora a clozapina tivesse sido sintetizada em 1959, os primeiros estudos foram inconclusivos, e à época não se conseguia sequer entender que uma droga poderia ter efeito antipsicótico sem produzir EPS. Outro fato que atrasou sua aprovação no FDA era o fato da clozapina induzir agranulocitose (Crilly 2007); hoje existem protocolos de controle desse efeito adverso que ocorre de fato em 3-5% dos pacientes (Bhanji et al. 2003).

Os antipsicóticos são hoje divididos em duas classes: típicos (ou primeira geração) e atípicos (ou segunda geração). Essa classificação é baseada na probabilidade do antipsicótico produzir EPS em doses clinicamente relevantes (Kapur e Mamo 2003; Meltzer e Massey 2011). Os fármacos típicos, os primeiros a

serem introduzidos na terapêutica (como por exemplo, clorpromazina, haloperidol e tioridazina), são predominantemente antagonistas D2 e por isso induzem EPS (Baldessarini e Tarazi 1996; Stahl 2008). Os antipsicóticos atípicos (como por exemplo, clozapina, riperidona, olanzapina, etc) possuem múltiplos mecanismos de ação. Vem sendo proposto que a alta afinidade por múltiplos receptores de 5HT e a menor afinidade por receptores D2 seriam os responsáveis pela baixa probabilidade de indução de EPS pelos atípicos (Meltzer e Massey 2011).

Além da óbvia vantagem da diminuição de efeitos extrapiramidais, foi inicialmente sugerido que os atípicos fossem eficazes quanto aos sintomas negativos. Com isso, a introdução destes novos fármacos no manejo de esquizofrenia foi acompanhada de grande expectativa. Infelizmente, muitos pacientes também não respondem a esses medicamentos, o efeito sobre sintomas negativos não se mostrou tão robusto quanto inicialmente esperado 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 (como aumento excessivo de peso e hipercolesterolemia) (Gardner et al. 2005).

O fato do tratamento com antipsicóticos atípicos custar 10 vezes mais que o feito com típicos, gerou a discussão se as vantagens terapêuticas justificavam o elevado custo. O estudo *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness* (CATIE) teve como objetivo comparar a eficácia entre antipsicóticos típicos e atípicos. O estudo comparou o antipsicótico típico perfenazina com os agentes atípicos olanzapina, quetiapina, ziprasidona e risperidona, em um ensaio duplo-cego. Contrariando as expectativas, o estudo não encontrou vantagens significativas entre o antipsicótico típico e os atípicos. A pesquisa mostrou também que em um

total de 1.493 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. A principal conclusão do estudo é que o tratamento deve ser individualizado para cada paciente e que todas as opções terapêuticas deve ser levadas em consideração na hora da prescrição (Lieberman et al. 2005). Um estudo recente procurou analisar se os resultados mostrados no CATIE tiveram algum efeito sobre as prescrições de antipsicóticos no estado de Missouri, Estados Unidos. A conclusão é que embora a mudança tenha sido pequena ela foi significativa principalmente no número de prescrições de perfenazina, os autores justificam que a pequena mudança se deve ao fato da paucidade de alternativas terapêuticas (Berkowitz et al. 2011).

É forçoso reconhecer que tanto os antipsicóticos típicos como os atípicos reduzem os sintomas positivos, mas eles não provocam uma recuperação funcional (como emprego, independência e casamento) dos pacientes esquizofrênicos. A principal explicação é que a incapacidade da esquizofrenia se deve principalmente aos déficits cognitivos, como problemas de atenção e memória de trabalho, sintomas que os antipsicóticos ainda não conseguiram melhorar (Insel 2010).

1.5. Possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da esquizofrenia

A necessidade de inovação na área de antipsicóticos é indiscutível, sobretudo são necessários fármacos capazes de melhorar os sintomas negativos e cognitivos (Insel 2010; Kim e Stahl, 2010; Wong et al. 2010; Goff et al. 2011). Embora várias

estratégias possíveis venham sendo discutidas, até o momento o resultado em estudos clínicos tem sido pouco expressivo (Goff et al. 2011). A seguir serão discutidos possíveis alvos para novos antipsicóticos com ênfase nos sintomas cognitivos e negativos.

O envolvimento do sistema dopaminérgico na patofisiologia da esquizofrenia é indiscutível (Remington et al. 2011). No entanto, em vez de bloquear os receptores D2 em todas as vias dopaminérgicas, o ideal seria restabelecer o equilíbrio das vias corticais e subcorticas (Stahl 2008). Uma estratégia que vem sendo apontada são os antagonistas de receptores D3 (Joyce 2001; Joyce e Millan 2005; Kim e Stahl 2010). Autoreceptores D3 possuem um importante papel na regulação do sistema límbico: regulam a quantidade de dopamina extracelular através de interação com o DAT (Zapata e Shippenberg 2002). Além disso, a dopamina possui uma afinidade 60 vezes maior por receptores D3 que por D2; isso associado a presença de receptores D3 fora das sinapses tem sugerido que estes funcionem como sensores da quantidade de dopamina (Joyce 2001). Relevante para os sintomas cognitivos, antagonistas D3 aumentam a liberação de acetilcolina no córtex frontal, o que resulta em melhora de atenção e memória de trabalho em ratos (Millan et al. 2010). Em um estudo clínico randomizado duplo-cego o antagonista D3 ABT-925 não mostrou diferença em comparação ao placebo, no entanto o estudo foi inconclusivo porque a dose utilizada resultou em baixa ocupação dos receptores (Redden et al. 2011).

Como mencionado, o sistema serotoninérgico sempre foi de interesse para o desenvolvimento de novos antipsicóticos, principalmente após a chegada do protótipo dos antipsicóticos atípicos, clozapina (Meltzer et al. 2003). Em particular, receptores 5HT_{1A} diminuem a liberação de DA no estriado e a aumentam em córtex

frontal (Alex e Pehek 2007; Fink e Göthert 2007). Agonistas 5HT_{1A} possuem efeito sinérgico com antagonistas 5HT_{2A} e por essa razão tem disso proposto uma possível vantagem da sua associação com antipsicóticos atípicos (Stahl 2008; Meltzer e Massey 2011). Em estudos pré-clínicos, tanto agonistas como antagonistas 5HT_{1A} melhoraram a cognição (Gray e Roth 2007). Ainda, a ativação de receptores 5HT_{2C} poderia ser útil no manejo dos sintomas positivos sem indução de sintomas extrapiramidais, uma vez que eles diminuem a liberação tônica de DA na via mesolímbica (Kim e Stahl 2010). O agonista 5HT_{2C} WAY163909 possui efeito tipo antipsicóticos em modelos animais de esquizofrenia (Marquis et al. 2007), além de potencializar o efeito de antipsicóticos em roedores (Grauer et al. 2009).

A hipótese glutamatérgica da esquizofrenia gerou interesse por fármacos que modulassem esse sistema (Stahl 2007). Verificou-se que em pacientes esquizofrênicos os receptores NMDA estão menos ativos (Kristiansen et al. 2007), no entanto, agonistas diretos de receptores NMDA são inviáveis clinicamente devido ao grande número de efeitos adversos; já moduladores positivos podem contribuir para o restabelecimento da função desses receptores. Agonistas do sítio de glicina dos receptores NMDA potencializam alostericamente a função desses receptores, o que evita a hiperativação dos mesmos (Kim e Stahl 2010; Labrie e Roder 2010). Estudos clínicos com D-serina, D-cicloserina e glicina, mostraram que essas drogas podem ser úteis em associação com antipsicóticos, especialmente no manejo dos sintomas negativos (Labrie e Roder 2010). No entanto estes dados vêm de estudos preliminares de curta duração e com poucos pacientes, mais estudos são necessários para avaliar o potencial dessas drogas no manejo da esquizofrenia. Outra forma de ativar o sítio de glicina é aumentar a concentração da glicina endógena através da inibição do transportador de glicina GLYT1 (Hashimoto 2011).

Estudos clínicos realizados com o inibidor N-metilglicina (inibidor endógeno do transportador) também são preliminares, mas parecem promissores (Labrie e Roder 2010).

A tentativa de criar drogas seletivas com um único mecanismo de ação é frustrada pela complexidade da esquizofrenia (Roth et al. 2004). Apesar de sua patofisiologia não estar totalmente esclarecida, sabe-se que é pouco provável que um único alvo neurobiológico esteja afetado na esquizofrenia. Somado a isso, a diversidade de sintomas e espectros faz com que drogas que apresentem múltiplos alvos sejam superiores as com especificidade por um único alvo. As chamadas “drogas sujas” podem representar uma alternativa melhor do que a associação de vários fármacos (polifarmácia), tanto por terem melhor adesão como por apresentarem menos efeitos adversos (Kim e Stahl 2010). Como é comum na área de produtos naturais, na maioria dos casos o efeito farmacológico final não é a soma dos efeitos farmacológicos individuais, mas sim a interação entre diferentes efeitos farmacológicos, quer seja pela presença de mais de um composto ativo quer por moléculas que tem mais de um mecanismo de ação.

1.6. Alstonina

Em fevereiro de 1993, foi realizada uma expedição etnofarmacológica pela companhia Shaman Pharmaceuticals à Nigéria, especificamente entre os Igbo. O objetivo era encontrar drogas antimicóticas e antivirais. Embora preparações com efeito central não fossem o objetivo da expedição, o psiquiatra tradicional nigeriano Dr. Chidi Osondu, foi visitado em sua clínica. Foi de particular interesse a descrição dada pelo Dr. Chidi do uso da planta medicinal denominada “uhumaobi-nwoke” (“coração de homem” em idioma Igbo) utilizada para o tratamento de diferentes tipos

de “loucura”, epilepsia e ainda como sedativo (Costa-Campos et al. 1999). Nessa clinica havia vários pacientes que estavam sendo tratados; chamou a atenção dos pesquisadores que os pacientes não apresentavam sinais de síndrome neuroléptica, sedação excessiva, aparentes distúrbios motores e tão pouco pareciam estar hipotensos. O Dr. Chidi não se dispôs a coletar a planta para posterior identificação, mas concedeu uma amostra (45 gramas) do pó do material seco de seu estoque para ser analisado em laboratório. Desse material foi produzido um extrato bruto aquoso (SP49000), que apresentou um interessante perfil tipo antipsicótico em modelos animais (Elisabetsky e Costa-Campos 2006).

Estudos fitoquímicos do extrato SP49000 identificaram o alcalóide alstonina como componente majoritário. Alstonina (Figura 3) é um alcaloide indólico tipo heteroioimbina (3, 4, 5, 6, 16, 17-hexadeidro-16-(metoxicarbonil)-19- α -metil-20- α -oxaioimbanium) (Costa-Campos et al. 1999).

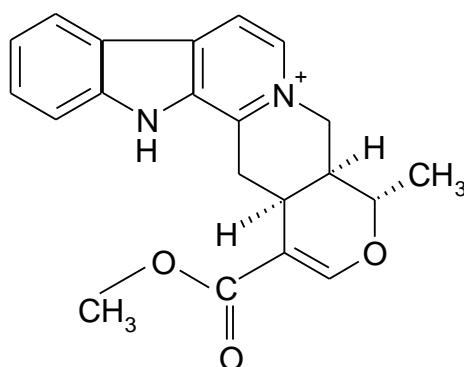


Figura 3: Fórmula estrutural do alcalóide alstonina

O perfil como antipsicóticos de alstonina começou a ser investigado em modelos animais. Os primeiros experimentos utilizando modelos de sintomas positivos demonstraram um claro perfil tipo antipsicótico, sendo esse ainda mais parecido com antipsicóticos atípicos já que alstonina não induzia catalepsia (Costa-

Campos et al. 1998), um comportamento correlato de EPS em humanos (Kapur e Mamo 2003). Posteriormente foi demonstrado que alstonina possui efeito ansiolítico em camundongos (Costa-Campos et al. 2004). Relevante para seu perfil antipsicótico, alstonina aumenta interação social em camundongos e que é capaz de prevenir o déficit de interação social induzido por MK801, um modelo de sintoma negativo (de Moura Linck et al. 2008). Avaliações quanto a indução de efeitos adversos comum a antipsicóticos também foram realizadas. Alstonina não aumentou os níveis de prolactina e tampouco alterou o ganho de peso em camundongos. No entanto assim como clozapina, alstonina impediu a diminuição de glicemia induzida por jejum (Linck et al. 2011).

O mecanismo de ação de alstonina não está completamente elucidado, mas ela parece diferir dos antipsicóticos disponíveis na terapêutica. Estudos preliminares de ligação (*binding*) mostraram que *in vitro* alstonina parece não ter afinidade por receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} no córtex ou receptores dopaminérgicos D1 e D2 no estriado (Costa-Campos et al. 1998). A administração aguda de alstonina a camundongos diminui a concentração de DA e aumenta a concentração de seu metabolito intraneuronal DOPAC, sem modificar a concentração de HVA em córtex frontal e estriado. No sistema serotoninérgico, alstonina aumenta tanto a concentração de 5HT como do seu metabolito 5HIAA, também em córtex frontal e estriado (Linck et al. 2011).

Outras evidências mostraram que o sistema serotoninérgico parece ter grande importância no mecanismo de ação de alstonina. O bloqueio de receptores 5HT_{2A/C} pelo antagonista ritanserina faz com que alstonina perca seu efeito ansiolítico (Costa-Campos et al. 2004). Alstonina inibe a captação de glutamato em fatias

hipocampais agudas, mas novamente quando os receptores 5HT_{2A} ou 5HT_{2C} são bloqueados esse efeito é perdido (Herrmann et al. 2012).

2. Objetivos

2.1. Gerais

Dar continuidade ao esclarecimento do mecanismo de ação da alstonina, especialmente ao que se refere a sua modulação sobre sistema dopaminérgico e serotoninérgico.

2.2. Específicos

- I. Verificar a relevância de receptores 5HT_{2A/C} no efeito de alstonina em modelos de sintomas positivos, negativos e cognitivos em camundongos;
- II. Verificar o envolvimento individual de receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} na prevenção por alstonina da hiperlocomoção induzida por MK801 em camundongos;
- III. Verificar efeitos de alstonina na densidade de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} e 5HT_{2C} em camundongos;
- IV. Verificar efeitos de alstonina se liga aos receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} e 5HT_{2C} em camundongos;
- V. Verificar efeitos de alstonina na captação de DA em sinaptossomas de camundongos;
- VI. Verificar efeitos de alstonina na densidade do transportador de dopamina (DAT) em regiões do encéfalo relevantes a esquizofrenia em camundongos;

VII. Verificar se alstonina se liga ao transportador de dopamina (DAT) em regiões do encéfalo relevantes a esquizofrenia em camundongos;

VIII. Verificar efeitos de alstonina na densidade de receptores D2 em regiões do encéfalo relevantes a esquizofrenia em camundongos;

VIII. Verificar se alstonina se liga no transportador de dopamina (DAT) em regiões do encéfalo relevantes a esquizofrenia em camundongos;

PARTE II

5-HT_{2A/C} receptors mediate the antipsychotic-like effects of alstonine

Artigo publicado na revista Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry, 36(1):29-33 (2012).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

5-HT_{2A/C} receptors mediate the antipsychotic-like effects of alstonine

V.M. Linck^{a,b,*}, M.M. Bessa^a, A.P. Herrmann^{a,b}, M.M. Iwu^c, C.O. Okunji^c, E. Elisabetsky^{a,b}^a Laboratório de Etnofarmacologia, Depto de Farmacologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil^c International Centre for Ethno Medicine and Drug Discovery (InterCEDD), Nsukka, Enugu State, Nigeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2011

Received in revised form 11 August 2011

Accepted 31 August 2011

Available online 8 September 2011

Keywords:

Alstonine

Antipsychotics

Working memory

5-HT_{2A/C} receptors

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of alstonine, an indole alkaloid with putative antipsychotic effects, on working memory by using the step-down inhibitory avoidance paradigm and MK801-induced working memory deficits in mice. Additionally, the role of serotonin 5-HT_{2A/C} receptors in the effects of alstonine on mouse models associated with positive (MK801-induced hyperlocomotion), negative (MK801-induced social interaction deficit), and cognitive (MK801-induced working memory deficit) schizophrenia symptoms was examined. Treatment with alstonine was able to prevent MK801-induced working memory deficit, indicating its potential benefit for cognitive deficits now seen as a core symptom in the disease. Corroborating previously reported data, alstonine was also effective in counteracting MK801-induced hyperlocomotion and social interaction deficit. Ritanserin, a 5-HT_{2A/C} receptor antagonist, prevented alstonine's effects on these three behavioral parameters. This study presents additional evidence that 5-HT_{2A/C} receptors are central to the antipsychotic-like effects of alstonine, consistently seen in mouse models relevant to the three dimensions of schizophrenia symptoms.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Although schizophrenia was first described as dementia (*praecox dementia*), cognitive deficits are increasingly regarded as the core symptom of the disease and, unfortunately, the one where treatment failure is more evident (Insel, 2010). More specifically, problems with working memory (WM) are seen to be one aspect of cognitive processes that have a substantial and broad impact on the daily activities of schizophrenic patients (Silver et al., 2003).

Almost 60 years after the introduction of the first antipsychotic in pharmacotherapy, clinical trials still clearly show that improved treatments for psychosis are sorely needed (Insel, 2010). Moreover, the superiority of the second-generation antipsychotics (SGA) is now under question (Anil Yağcıoğlu, 2007; Hamann et al., 2003). The modest and controversial effects of antipsychotics on cognitive deficits and negative symptoms, combined with the associated unwanted side effects, result in discontinued treatments (Lieberman et al., 2005) reinforcing the need for drugs with a better profile. Overall, the clinical data suggest that significant improvement in the treatment of schizophrenia is likely to require drugs with an innovative mechanism of action (Gründer et al., 2009).

Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid; DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin.

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS, Rua Sarmento Leite 500/202, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel./fax: +55 51 33083121. E-mail address: vivilinck@gmail.com (V.M. Linck).

0278-5846/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pnpbp.2011.08.022

We have reported the antipsychotic-like effects of alstonine, a putative antipsychotic, which consistently differ from the effects of known drugs in various mouse models (de Moura Linck et al., 2008; Elisabetsky and Costa-Campos, 2006; Linck et al., 2011). Alstonine is an indole alkaloid present in plant species traditionally used in Nigeria to treat mental illnesses, and its mechanism of action remains unclear (Costa-Campos et al., 1998). Importantly, D₂ blockade does not appear to play an important role in alstonine's antipsychotic-like effects, whereas its anxiolytic effects depend on serotonin 5-HT_{2A/C} receptor (Costa-Campos et al., 2004). Alstonine-induced increases in serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in mouse frontal cortex and striatum further suggest its modulatory effect on this neurotransmitter system (Linck et al., 2011).

The validity of the glutamatergic hypothesis of schizophrenia was notably reinforced by the observation that NMDA antagonists (such as phencyclidine and ketamine) induce schizophrenia-like symptoms in normal volunteers and worsen symptoms in schizophrenic patients (Javitt, 2010). Accordingly, animal models based on NMDA receptor antagonists have been given preference over the older dopamine based rodent models, especially because the latter display the full array (negative, positive and cognitive) of symptoms observed in schizophrenia (Large, 2007).

The first purpose of this study was to evaluate the effects of alstonine on MK801-induced working memory deficit in mice. Additionally, we further examined the role of 5-HT_{2A/C} receptors in alstonine's effects on mouse models associated with positive, negative and cognitive schizophrenia symptoms.

2. Methods

2.1. Animals

Experiments were performed with male (CF1) adult albino mice (40–45 g) obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) at 2 months of age. Mice were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions (22 ± 1 °C, 12-h light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water), for at least two weeks before the experiments.

The study was approved by the University ethics committee (approval #18236); all procedures were carried out in accordance with institutional policies on experimental animal handling.

2.2. Drugs

Clozapine and sulphiride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); MK801 (dizocilpine) and ritanserin were from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). Clozapine and sulphiride were solubilized in HCl (1 N), and the pH adjusted to 6.0 with NaOH 1 N; ritanserin was dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO); all other drugs were diluted in distilled water. Pilot studies showed that DMSO 10% did not affect any of the behavioral tests (data not shown); hence, saline was used as a blank control. Treatments were administered intraperitoneally (0.1 mL/10 g of body weight). With the same dose and timing alstonine does not alter locomotion or social interaction (Costa-Campos et al., 2004; de Moura Linck et al., 2008).

2.3. Isolation and identification of alstonine

Alstonine hydrochloride used in this study was isolated from the fruit rinds of *P. nitida* Stampf Th. et H.Dur. (Apocynaceae). The separations used pH-zone-refining counter-current chromatography as previously detailed (Okunji et al., 2005, 2011). 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 sample solution was prepared by dissolving 15.0 g of alkaloid fraction of the methylene chloride extract of *P. nitida* in 100 mL of a phase mixture consisting of equal volumes of each phase. The separation was initiated by completely filling the column with the stationary phase (LC pump) before loading the sample; the mobile phase was pumped into the column at 2 mL/min while the column was rotated at 834 rev/min in the combined head to tail elution mode (Shinomiya et al., 1993). 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. The purity of the isolated alstonine sample was 98%.

2.4. Does alstonine improve working memory deficit?

Step-down inhibitory avoidance: The protocol was adapted from Barros et al. (2005). Mice were habituated to the dimly lit experimentation room for at least 30 min before the procedure. The inhibitory avoidance training apparatus was a plastic box of 30 × 30 × 40 cm, with a fixed platform (5 × 5 × 4 cm) at the center of the grid floor. Mice were individually placed on the platform, and the latency to step-down (four paws on the grid) was automatically recorded in training and test sessions. In the training session, upon stepping

down, the mouse received a 0.3 mA scrambled foot shock for 5 s. Test sessions were performed 10 s later, with the same procedure except that no shock was administered after stepping down; a 300-s cut-off time was set for stepping down.

2.4.1. Working memory assessment

Mice (n = 14–17) were treated with saline, clozapine (2 mg/kg), sulphiride (10 mg/kg) or alstonine (0.5 or 1 mg/kg). Thirty minutes after treatment mice were subjected to the training session.

2.4.2. MK801-induced working memory deficit

Mice (n = 23–31) were likewise treated with saline, clozapine, sulphiride or alstonine; 30 min later mice received a second treatment with either saline or MK801 (0.05 mg/kg). The step-down training session was performed 30 min after the last treatment.

2.5. Are the effects of alstonine dependent on 5-HT_{2A/C} receptors?

In order to evaluate the involvement of 5-HT_{2A/C} on alstonine antipsychotic-like effects mice were pre-treated with the 5-HT_{2A/C} receptor antagonist ritanserin before behavioral tests. Drug doses and administration schedules were based on Su et al. (2007), as well as on pilot studies showing that ritanserin was devoid of effects *per se*.

2.5.1. MK801-induced working memory deficit

After habituation mice (n = 9–17) received saline or the 5-HT_{2A/C} antagonist ritanserin (0.1 mg/kg); 10 min later animals were treated with saline or alstonine 1 mg/kg, followed 30 min later by a third administration of either saline or MK801 (0.05 mg/kg). Working memory was tested as described above, 30 min after the last treatment.

2.5.2. MK801-induced social withdrawal

Method was adapted from Rung et al. (2005). Mice were acclimated to a reversed 12-h light cycle (lights on at 20:00 h), housed at 8/cage (familiar group) for 2 weeks before the experiments. Mice were randomly assigned to groups (n = 8–13 pairs) that received saline or ritanserin (0.1 mg/kg), and 10 min later were treated with saline or alstonine 1 mg/kg. Social withdrawal was induced with MK801 (0.3 mg/kg), given 30 min after the second saline or ritanserin treatment (Rung et al., 2005). Experiments were performed 30 min after the last treatment, in a faintly lit room (red bulb, 40 W); the social interaction apparatus (test box) consisted of a topless transparent acrylic box (25 × 20 × 20 cm). Forty-eight and 24 h before the test mice were individually submitted to 10 min habituation sessions in the test box. Then, on the test day, mice were allocated to selected pairs so that the two animals came from unfamiliar groups (different home cages), had matching body weights, and received the same drug treatment. The behavior of each pair was video-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 later analyzed by a trained observer, blind to experimental groups, using the software The Observer® XT5.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). Passive contact (sitting or lying with bodies in contact) was not considered as social interaction.

2.5.3. MK801-induced hyperlocomotion

The method was adapted from Ninan and Kulkarni (1998). Activity cages (45 × 25 × 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Porto Alegre, Brazil) were equipped with three parallel photocells, which automatically recorded the number of crossings. Mice (n = 6–9) were treated with saline or ritanserin (0.1 mg/kg), and 10 min later with saline or alstonine 1 mg/kg; 30 min after the second treatment the animals received saline or MK801 (0.25 mg/kg). Mice were individually placed in the activity cages 30 min after the last administration, and locomotion was recorded from the 5th minute for 10 min (first 5 min considered as exploratory behavior).

2.6. Statistics

Step-down inhibitory avoidance results are expressed as median \pm interquartile ranges; other data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed with SPSS for Windows, version 17. The results from step-down avoidance failed to satisfy the assumptions for normality and homogeneity of variance; therefore, nonparametric analyses were applied. Wilcoxon's test was used to compare training and test latencies within groups, while Kruskal–Wallis/Mann–Whitney U was used to compare the latencies among the groups. All other data did satisfy the assumptions of normality and homogeneity of variance, and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The analysis focused on the effects of ritanserin on MK801-induced social withdrawal and hyperlocomotion where the effects of alstonine in these models were previously established. SNK post-hoc test was used where appropriate to analyze differences between the groups. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

Neither alstonine, nor ritanserin, clozapine, sulpiride or MK801 0.05 mg/kg significantly altered locomotion at the doses used in the study (data not shown).

3.1. Does alstonine improve working memory deficit?

As previously reported (Barros et al., 2005), with the adopted training paradigm consistently longer test latencies were observed in all groups, confirming that working memory can be reliably assessed using this procedure. As can be seen in Fig. 1A, neither alstonine, clozapine nor sulpiride modified working memory (comparable training [$H_{(4)} = 3.13$] and test session [$H_{(4)} = 1.76$]), with test session latencies significantly longer than training ones ($p < 0.05$ Wilcoxon).

MK801 effectively induced working memory deficit (Fig. 1B). Mann–Whitney showed reduced test latencies in the saline group treated with MK801 in comparison with controls ($H_{(5)} = 19.2$, $p = 0.018$); accordingly, in this group no significant differences exist between training and test session latencies (Wilcoxon, $p = 0.76$). Clozapine, sulpiride and alstonine effectively prevented the MK801-induced working memory deficit ($p < 0.01$, Wilcoxon for test \times training session latencies in all treatment groups).

3.2. Are the effects of alstonine dependent on 5-HT_{2A/C} receptors?

3.2.1. Working memory deficit

The alstonine preventive effect against MK801-induced working memory deficit (Wilcoxon, $p = 0.001$) was abolished by pretreatment with ritanserin (Wilcoxon, $p = 0.13$). Training session latencies were comparable [$H_{(5)} = 4.18$] (Fig. 2A).

3.2.2. Social withdrawal

One-way ANOVA revealed a significant difference between groups ($F_{5,96} = 8.68$) (Fig. 2B). SNK indicated that MK801 clearly reduced social interaction time ($p < 0.01$) in relation to control. SNK showed that pretreatment with ritanserin modified the effects of alstonine (but not MK801 *per se*) on social interaction ($p < 0.05$); while alstonine prevented the effect of MK801 on social interaction ($p < 0.05$), this effect is abolished by pre-administration of ritanserin ($p > 0.05$).

3.2.3. Hyperlocomotion

As shown in Fig. 2C, there was a significant effect of treatments in locomotor activity ($F_{5,54} = 9.83$). SNK revealed that, as expected, MK801 significantly ($p < 0.01$) increased crossings in relation to control. Although alstonine prevented the MK801-induced hyperlocomotion ($p < 0.05$), pre-treatment with ritanserin abolished this effect ($p > 0.05$).

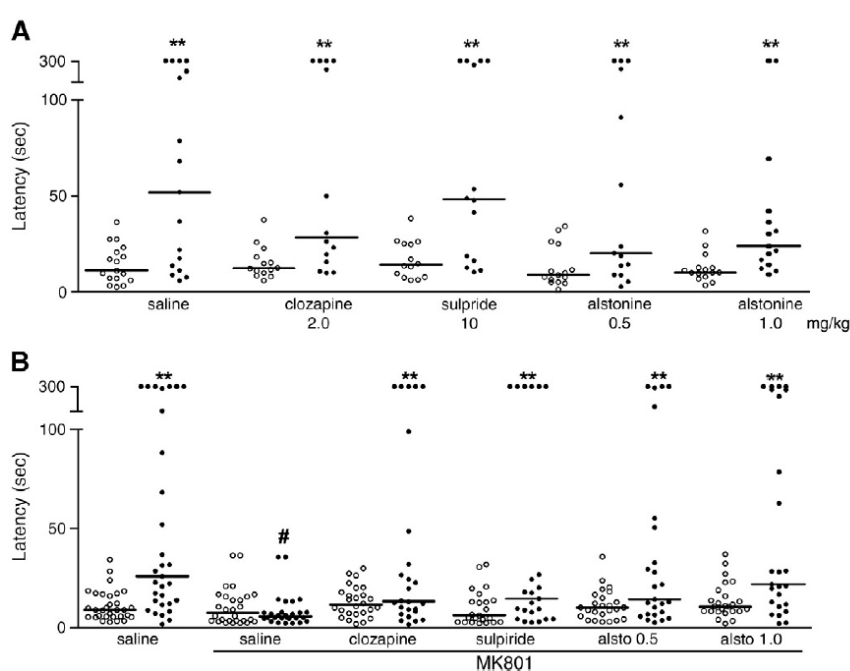


Fig. 1. Alstonine effects on inhibitory avoidance working memory ($n = 14$ – 17) (A) and MK801-induced deficit ($n = 23$ – 31) (B). Open dots (\circ) represent training latencies and closed dots (\bullet) test latencies. Lines represent median. ** = $p < 0.01$ test \times training (Wilcoxon). # = $p < 0.01$ compared to saline test session latency (Kruskal–Wallis/Mann–Whitney).

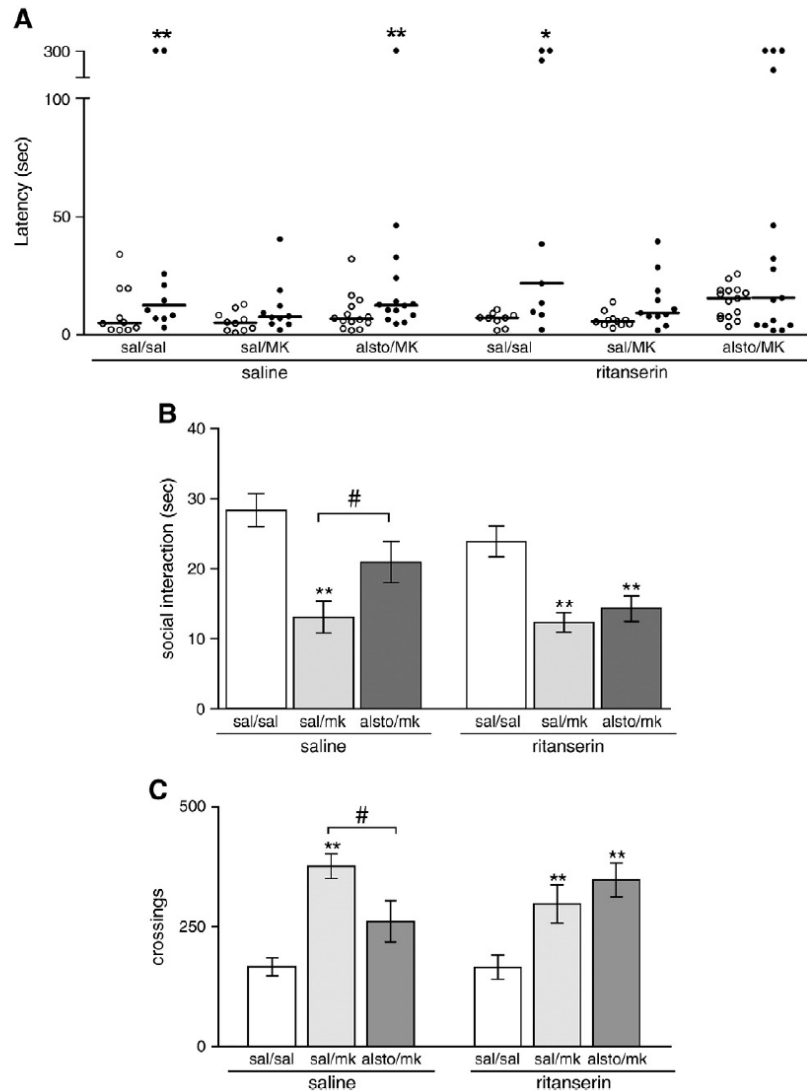


Fig. 2. Ritanserin modifies alstonine effects on working memory deficit ($n=9-17$) (A), social withdrawal ($n=8-13$ pairs) (B), and hyperlocomotion ($n=6-8$) (C). 2A open dots (\circ) represent training latencies and closed dots (\bullet) test latencies (sec). Lines represent median (sec). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ test \times training (Wilcoxon). 2B columns represent time spent on social interaction (sec, mean \pm S.E.M). 2 C columns represent crossings (mean \pm S.E.M); ** = $p < 0.01$ compared with control, and # = $p < 0.05$ compared to sal/sal/MK.

4. Discussion

Though effective treatments are not available (Harvey, 2009; Keefe et al., 2007), several authors advocate a more careful clinical assessment of cognitive deficits in schizophrenics (Keefe et al., 2007; Keefe and Fenton, 2007; Wykes et al., 2007), since the former are currently considered a key component of schizophrenia (Barch, 2005). Special attention has been given to working memory deficits, directly associated with troublesome daily tasks, communication, social relations, and executive activities (Hyman and Fenton, 2003; Silver et al., 2003).

In order to assess working memory we used the inhibitory avoidance paradigm with a 10 s training-test interval (Bianchin et al., 1999). Results show consistently longer test sessions indicating that memory is reliably evaluated, and also that a significant deficit (amnesia) is induced by MK801 with this protocol. Treatment with

alstonine was effective in preventing the MK801-induced deficit. It is noteworthy that animal models based on NMDA antagonists such as MK801 are regarded as having reasonable face validity and predictive value (Large, 2007; Rujescu et al., 2006).

We further show that pre-treatment with ritanserin reliably blocked the effects of alstonine on these mouse models of cognitive deficit (MK801-induced working memory deficit), positive (MK801-induced hyperlocomotion) and negative (MK801-induced social withdrawal) schizophrenia symptoms. This body of results is consistent with the hypothesis that 5-HT_{2A/C} receptors are involved in alstonine's antipsychotic-like profile, and consistent with its effects on mouse models of anxiety (Costa-Campos et al., 2004). Indeed, atypical antipsychotics act as 5-HT_{2A/C} receptor antagonists and/or inverse agonists (Meltzer and Massey, 2011), and this serotonergic modulation is thought to be crucial for the purported advantages of these

medications over classical agents (Gründer et al., 2009). Additional evidence for the role of serotonin in alstonine's mechanism of action is that serotonin and 5-HIAA levels were found to be increased in mouse frontal cortex and striatum after alstonine administration (Linck et al., 2011).

Even though the neuropathological basis of schizophrenia remains to be elucidated, accumulating evidence indicates that hypofunction of NMDA receptors does occur in this disease (Belforte et al., 2010; Kristiansen et al., 2007; Paz et al., 2008). It is to be expected that altered NMDA function would imply meaningful changes in various neurotransmission systems (including GABA, 5-HT, DA) contributing to the complex patterns of behavioral alterations seen in schizophrenic patients (Kristiansen et al., 2007). It is relevant to this discussion that NMDA blockade has been shown to lead to a 5-HT_{2A}-dependent increase in serotonergic transmission (López-Gil et al., 2007; Martin et al., 1998). Similar modulation is illustrated by the finding that the increased firing rate in prefrontal cortex glutamatergic neurons induced by MK801 (0.05 mg/kg, i.p., as in this study) can be prevented by ritanserin (Labonte et al., 2009).

In 2009, natural product-derived drugs represented 50% of all approved new drugs; moreover, between 2005 and 2007, of the 13 natural products-derived drugs approved in the USA 5 were the first member of a new class (Li and Vederas, 2009). While this clearly shows the role of natural products in pharmaceutical innovation, it is arguable that natural compounds identified through ethnopharmacological analysis of traditional uses may be especially useful in the case of illnesses with an ill-defined pathophysiology (Patwardhan, 2005), such as schizophrenia (Elisabetsky, 2007). Considering the pitfalls of currently available medication, the coherence of the animal data presented here with claims of therapeutic benefit in mentally ill patients is promising. A clear characterization of alstonine's mechanism of action is therefore warranted and necessary, including *in vitro* functional binding to clarify the exact nature of the interaction between alstonine and serotonin receptor subtypes.

5. Conclusion

Alstonine is an indole alkaloid with an antipsychotic-like profile in mouse models; it has been identified as the main component in plant-based formulations used to treat mentally ill patients in Africa. We here show that alstonine prevents MK801-induced working memory deficit in mice. Additionally, ritanserin blocked the effects of alstonine on mouse models of cognitive deficit, positive and negative symptoms in schizophrenia. In agreement with current understanding of the pharmacodynamic basis of atypical antipsychotic action, 5-HT_{2A/C} receptors are implicated in alstonine's effects.

Acknowledgments

The authors are thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowships. This work was supported by CNPq (490493/2008–4) and by Rede Instituto Brasileiro de Neurociência IBN.Net# 01.06.0842-00.

References

- Anil Yağcıoğlu A. The mechanisms of action of antipsychotic drugs: is atypicality superior in schizophrenia treatment? *Turk Psikiyatri Derg* 2007;18:364–74.
- Barch D. The cognitive neuroscience of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 2005;1:321–53.
- Barros D, Ramirez M, Izquierdo I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2005;83:113–8.
- Belforte J, Zsiros V, Sklar E, Jiang Z, Yu G, Li Y, et al. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 2010;13:76–83.
- Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999;71:127–31.

- Costa-Campos L, Lara D, Nunes D, Elisabetsky E. Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:133–41.
- Costa-Campos L, Dassoler S, Rigo A, Iwu M, Elisabetsky E. Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:481–9.
- de Moura Linck V, Herrmann A, Goerck G, Iwu M, Okunji C, Leal M, et al. The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32.
- Elisabetsky E. Phytotherapy and the new paradigm of drugs mode of action. *Rev Prod Nat* 2007;XII:159–64.
- Elisabetsky E, Costa-Campos L. The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3:39–48.
- Gründer G, Hippus H, Carlsson A. The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:197–202.
- Hamann J, Leucht S, Kissling W. Are the second-generation antipsychotics cost-effective? A critical review on the background of different health systems. *Pharmacopsychiatry* 2003;36:18–26.
- Harvey P. Pharmacological cognitive enhancement in schizophrenia. *Neuropsychol Rev* 2009;19:324–35.
- Hyman SE, Fenton WS. Medicine. What are the right targets for psychopharmacology? *Science* 2003;299:350–1.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature* 2010;468:187–93.
- Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2010;7:4–16.
- Keefe R, Fenton W. How should DSM-V criteria for schizophrenia include cognitive impairment? *Schizophr Bull* 2007;33:912–20.
- Keefe R, Bilder R, Davis S, Harvey P, Palmer B, Gold J, et al. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:633–47.
- Kristiansen L, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff J. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:48–55.
- Labonte B, Bambico FR, Gobbi G. Potentiation of excitatory serotonergic responses by MK-801 in the medial prefrontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2009;380:383–97.
- Large CH. Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs? *J Psychopharmacol* 2007;21:283–301.
- Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009;325:161–5.
- Lieberman J, Stroup T, McEvoy J, Swartz M, Rosenheck R, Perkins D, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 2005;353:1209–23.
- Linck VM, Herrmann AP, Piato AL, Detanico BC, Figueiró M, Florio JC, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky E. Alstonine as an antipsychotic: Effects on brain amines and metabolic changes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)* 2011;2011:1–7.
- López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:2087–97.
- Martin P, Carlsson M, Hjorth S. Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport* 1998;9:2985–8.
- Meltzer H, Massey B. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:59–67.
- Ninan I, Kulkarni S. 5-HT_{2A} receptor antagonists block MK-801-induced stereotypy and hyperlocomotion. *Eur J Pharmacol* 1998;358:111–6.
- Okunji CO, Iwu MM, Ito Y. Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining counter-current chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2005;28:775–83.
- Okunji CO, Awachie PI, Iwu MM, Tchimine M, Knight M, Ito Y. Preparative separation of picralima alkaloids using a new flat-twisted tubing in pH-zone-refining counter-current chromatography mode. *Planta Med* 2011;77(5):P-101.
- Patwardhan B. Ethnopharmacology and drug discovery. *J Ethnopharmacol* 2005;100:50–2.
- Paz RD, Tardito S, Atzori M, Tseng KY. Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: from basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008;18:773–86.
- Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann A, Ohl F, Raeder H, et al. A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 2006;59:721–9.
- Rung J, Carlsson A, Rydén Markinhuhta K, Carlsson M. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:827–32.
- Shinomiya K, Menet JM, Fales HM, Ito Y. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing countercurrent chromatography. 1. Design of the apparatus, retention of the stationary-phase, and efficiency in the separation of proteins with polymer phase systems. *J Chromatogr* 1993;644:215–29.
- Silver H, Feldman P, Bilker W, Gur R. Working memory deficit as a core neuropsychological dysfunction in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003;160:1809–16.
- Su Y, Si T, Zhou D, Guo C, Wang X, Yang Y, et al. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT_{2A/C} receptors. *Eur J Pharmacol* 2007;564:123–30.
- Wykes T, Newton E, Landau S, Rice C, Thompson N, Frangou S. Cognitive remediation therapy (CRT) for young early onset patients with schizophrenia: an exploratory randomized controlled trial. *Schizophr Res* 2007;94:221–30.

Capítulo 2

Serotonin modulation as the key mechanism of alstonine antipsychotic properties: roles of 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors

Artigo a ser submetido à revista Behavioural Brain Research.

Instruções de autores: www.journals.elsevier.com/behavioural-brain-research/
Observação: para facilitar a leitura da banca, as figuras foram inseridas no texto.

Serotonin modulation as the key mechanism of alstonine antipsychotic properties: roles of 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors.

Viviane M. Linck^{a,b*}, Luísa K. Pilz^{a,b}, Ana P. Herrmann^{a,b}, Christopher O. Okunji^c, Marta C. Antonelli^d, Elaine Elisabetsky^{a,b}

^aLaboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c International Centre for Ethnomedicine and Drug Development (InterCEDD), Nsukka, Enugu State, Nigeria.

^d Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina.

*Corresponding author:

Viviane M. Linck

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone/Fax: +55 51 33083121

E-mail address: vivilinck@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the role of 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors in the antipsychotic-like effects of alstonine, a putative antipsychotic with apparent innovative mechanism of action. Alstonine preventive effects against MK801-induced hyperlocomotion were abolished by the 5HT_{2A} antagonist altanserin and the 5HT_{2C} antagonists SB 242084. Quantitative autoradiography (QAR) results indicated that alstonine binds *in vitro* to 5HT_{2A}, but not to 5HT_{2C}, receptors. Subchronic (7 days) treatment with behaviorally effective doses of alstonine decreased 5HT_{2A} density in mPFC (~30%) and NAc (~20%), and increased it in lateral CPu (~22%). The same treatment increased 5HT_{2C} receptor density in NAc shell (~12%), CA1 (~32%) and CA3 (~22%), and decreased it in mPFC (~18%). This work corroborates that, though not exclusive, 5HT_{2A} and 5HT_{2C} are key to the mechanism of action subjacent to the antipsychotic-like properties of alstonine. Schizophrenia neurobiology is complex and involves region specific imbalance of various neurotransmitters. Because 5HT receptors have been implicated in the regulation of dopamine and GABA release, and given that modulation appears to be region specific and receptors subtype dependent, interfering with serotonin transmission is thought to be a promising strategy to treat schizophrenia. Considering the evidence that alstonine does not block D₂ receptors but indirectly modulates dopamine, and interferes with dopamine and glutamate uptakes, this study places alstonine further apart from known antipsychotics and opens possibility for the development of newer antipsychotic agents.

Keywords: antipsychotic, alstonine, serotonin, autoradiography, 5HT_{2A} receptors and 5HT_{2C} receptors

1. Introduction

The early observations that the hallucinogenic drug lysergic acid diethylamide (LSD) produces psychosis-like symptoms in healthy subjects led to the first suggestion regarding the existence of a relation between the serotonergic system and schizophrenia [1]. The involvement of serotonin (5HT) in the pathophysiology of schizophrenia was later suggested by postmortem studies [2], and the most consistent changes included reduced serotonin transporter [3] [4] [5], and increased 5HT_{1A} receptor binding [6] [7] [8] [9] [10] in cortical areas.

After nearly half a century focusing on the dopaminergic system for treating schizophrenia, 5HT receptors once again became the focus of attention after Meltzer et al [11] [12] identified 5HT key role in setting apart older and newer (atypical) medication. Recently, Meltzer and Massey [13] reviewed the role of 5HT receptors in the action of atypical antipsychotics and its better effectiveness in comparison to typical antipsychotics. Briefly, the 5HT_{2A}/D₂ affinity ratio for atypical antipsychotics appears to determine the efficacy and tolerability different compounds. Despite the evidences of 5HT relevance for the effects of atypical drugs, there is a consensus that D₂ dopamine receptors antagonism is essential for antipsychotic effect [2] [14]. Nevertheless, though all antipsychotics currently approved in clinic show some degree of D₂ receptors affinity [14], there are reports of various compounds lacking D₂ antagonism that possess antipsychotic-like profile in animal models [15]. Of these, serotonin is thought to be central for the effects of the 5HT_{2C} agonist WAY-163909 [16] [17] and the indole alkaloid alstonine [18] [19].

Alstonine was characterized as presenting the behavioral profile of an atypical antipsychotic in mice, upon identified as the major component of herbals used to treat mental patients in Nigeria [20,21]. We showed that the alstonine effects are prevented by the 5HT_{2A/C} antagonist ritanserin [19] on mouse models relevant to positive, negative and cognitive symptoms, as well by the 5HT_{2A} receptor (5HT_{2A}) antagonist altanserin and the 5HT_{2C}

receptor (5HT_{2C}) antagonist SB242084 on alstonine-induced decrease in glutamate uptake in acute hippocampus slices [19]. Intriguingly, 5HT and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were found to be significantly increased in frontal cortex and striatum from mice treated with behaviorally effective doses of alstonine [22].

In order to clarify if 5HT_{2A} and 5HT_{2C} are both relevant alstonine behavioral effects, as indicated by the data obtained with ritanserin, in this study we evaluated the effects of 5HT_{2A} and 5HT_{2C} specific antagonists (altanserin and SB 242084, respectively) on alstonine preventive effects on MK801-induced hyperlocomotion. Additionally the effects of acute and repeated (7 days) administration of alstonine on 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors were analyzed by quantitative autoradiography (QAR) in various brain areas.

This study shows that alstonine binds to 5HT_{2A} and indirectly modulates 5HT_{2C}, serotonin receptors, both seemingly required for its antipsychotic effects. It reiterates that serotonin modulation is the primary mechanism of action of alstonine, setting this drug apart from known antipsychotics.

2. Methods

2.1. Animals

Two months old male (CF1) adult albino mice (40-45g) were used. Mice were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions (22 ± 1°C, 12 h light/dark cycle, free access to food and water), for at least two weeks before the experiments.

The study was approved by the University ethics committee (approval #18236); all procedures were carried out in accordance with institutional policies on experimental animal handling.

2.2. Drugs

As detailed elsewhere [23], alstonine hydrochloride was isolated from *Picralima nitida* Th. & H. Dur. (Apocynaceae) by Okunji; the structure was confirmed by HPLC-MS. Altanserin, SB

242084, spiperone, mianserin and clozapine were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); MK801 (dizocilpine) was acquired from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). [³H]-ketanserin (60Ci/mmol) and [³H]-mesulergine (84.5Ci/mmol) were purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA).

Clozapine was solubilized in 1N HCl, and the pH adjusted to 6.0 with 1N NaOH; SB242084 was dissolved in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO); all other drugs were diluted in distilled water. Pilot studies showed that DMSO 5% did not affect any of the behavioral tests (data not shown); hence, saline was used as control. Treatments were administered intraperitoneally (0.1 mL/10 g of body weight). Alstonine treatments here used were performed with the same dose and timing known to alter behavior but not locomotion [24].

2.3. Behavior

MK801-induced hyperlocomotion: The method was adapted from Ninan and Kulkarni [25]. Activity cages (45×25×20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Porto Alegre, Brazil) were equipped with three parallel photocells, which automatically recorded the number of crossings. Mice (n = 7-10) were treated with saline, ketanserin (0.01 mg/kg) or SB 242084 (0.5 mg/kg) and 10 min later with saline or alstonine 1 mg/kg; 30 min after the second treatment the animals received saline or MK801 (0.25 mg/kg). Mice were individually placed in the activity cages 30 min after the last administration, and locomotion was recorded for 10 min after 5 minutes discarded as exploratory behavior. Doses were chosen based on the literature and upon pilot experiments as the highest dose that did not *per se* produced significant changes in locomotion.

2.4. Receptor binding

2.4.1 Treatment schedule

(a) *in vitro*: naive mice were used and 10 and 100 uM clozapine or 10 and 100 uM alstonine were added to the brain slices during the incubation; (b) acute *ex vivo*: mice were treated with saline or alstonine (0.5 or 1.0 mg/kg) and sacrificed 30 min later; (c) subchronic *ex vivo*: mice were treated daily for 7 days with saline or alstonine (0.5 or 1.0 mg/kg) and sacrificed 24 h after the last administration.

2.4.2. Tissue preparation

Mice were sacrificed, the whole brains quickly removed, immediately frozen by immersion for 15-20 seconds in Freon and stored at -80 °C. Cryostat sections (Leica CM18-50, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Germany), 12 µm thick, were thawed-mounted onto gelatin-coated microscope slides and air on a warm plate for 30 seconds. Six sections were mounted per slide, which were desiccated with silica and stored at -80 °C until use [26]. The sections were obtained through medial prefrontal cortex (mPFC), caudate-putamen (CPU), nucleus accumbens (NAc), hippocampal regions CA1 and CA3 according to Franklin and Paxinos [27]. These selected cortical, extrapyramidal, and limbic areas mediate cognitive, motor, and emotional functions often altered in patients with psychotic disorders and/or by antipsychotic treatment.

2.4.3. 5HT_{2A} autoradiography

The methodology was adapted from Chavez et al [28]. Incubations were performed at room temperature (RT). Sections were pre-incubated in 170 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) containing 120 mM NaCl for 30 min. Sections were then incubated for 1 h in the binding buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.7) and 10 nM [³H]ketanserin. To assess nonspecific binding, sections were incubated in the binding buffer in the presence of 10 µM spiperone.

2.4.4. 5HT_{2C} autoradiography

The 5HT_{2c} receptor autoradiography protocol was modified from López-Giménez et al [29]. Sections were pre-incubated (RT) with 170 mM Tris-HCl (pH 7.7) for 30 min. Sections were then incubated for 1 h in the binding buffer containing 170 mM Tris-HCl (pH 7.7), 100 nM spiperone and 5 nM [³H]mesulergine. For nonspecific binding, sections were incubated in the binding buffer containing additional 10 µM mianserin.

2.4.5. Film Exposure and Image Analysis

Following incubation the sections were rinsed twice in Tris/HCl buffer (4 °C, 5 min) and dipped three times in cold distilled water. The sections were air dried, briefly placed on a

warm plate (60 °C, 60 seconds) and exposed to film. The autoradiograms were obtained after exposing the sections to Kodak BIOMAX MR-1 (Sigma) film at -4 °C for 30-60 days in light-tight cassettes. Radioactivity standards (American Radiolabeled Chemical Inc.) consisting of 14 sections of methacrylate plastic impregnated with tritium (0.14 - 489 μ Ci/g) were jointly exposed with the sections. Films were developed in Kodak Dektol developer (Sigma) and fixative. Autoradiography images were scanned in conventional scanner, relevant brain regions were outlined (Fig. 1) and the analyses made using Image J software (developed at the U.S. National Institutes of Health, available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Optic density was converted to nCi/mg of tissue with calibrated methacrylate tritium standards, and after subtracting nonspecific (15-22%) from total binding, specific binding was expressed as fmol/mg tissue.

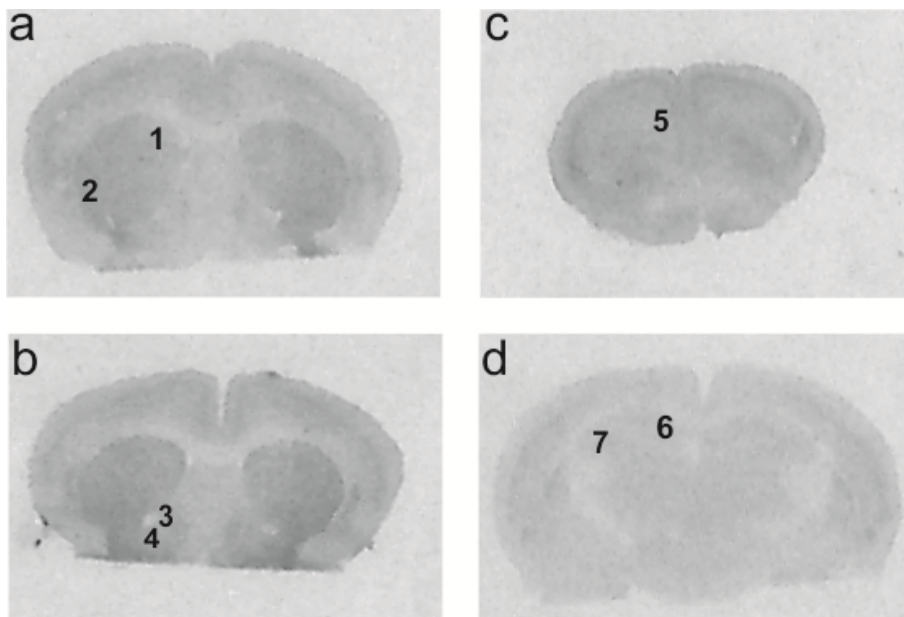


Figure 1: Representative images from [3 H]ketanserin QAR. Mouse brain regions areas analyzed: (1) medial CPu; (2) lateral CPu; (3) NAc shell; (4) NAc core; (5) mPCF; (6) CA1; (7) CA3.

2.6. Statistics

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. GraphPad Prism 5 for Windows was used for the statistical analysis; $p < 0.05$ was set as statistically significant.

3. Results

3.1. Behavior

Figure 2A shows that altanserin abolished the effects of alstonine on MK801-induced hyperlocomotion. While ANOVA shows that, as expected, treatments significantly altered the locomotion ($F_{(5,45)}=16.2$; $p < 0.01$), SNK revealed that MK801 significantly increased locomotion, that alstonine prevented this effect, and that altanserin did not produce changes in locomotion *per se* but was able to abolish alstonine effects. Figure 2B shows that a similar pattern was found with SB242084. One-way ANOVA indicated that treatments significantly affected locomotion ($F_{(5,41)}=15.8$); SNK indicated that MK801 induced hyperlocomotion, that alstonine prevented this effect, and that SB242084 though not effective *per se* completely abolished alstonine effects.

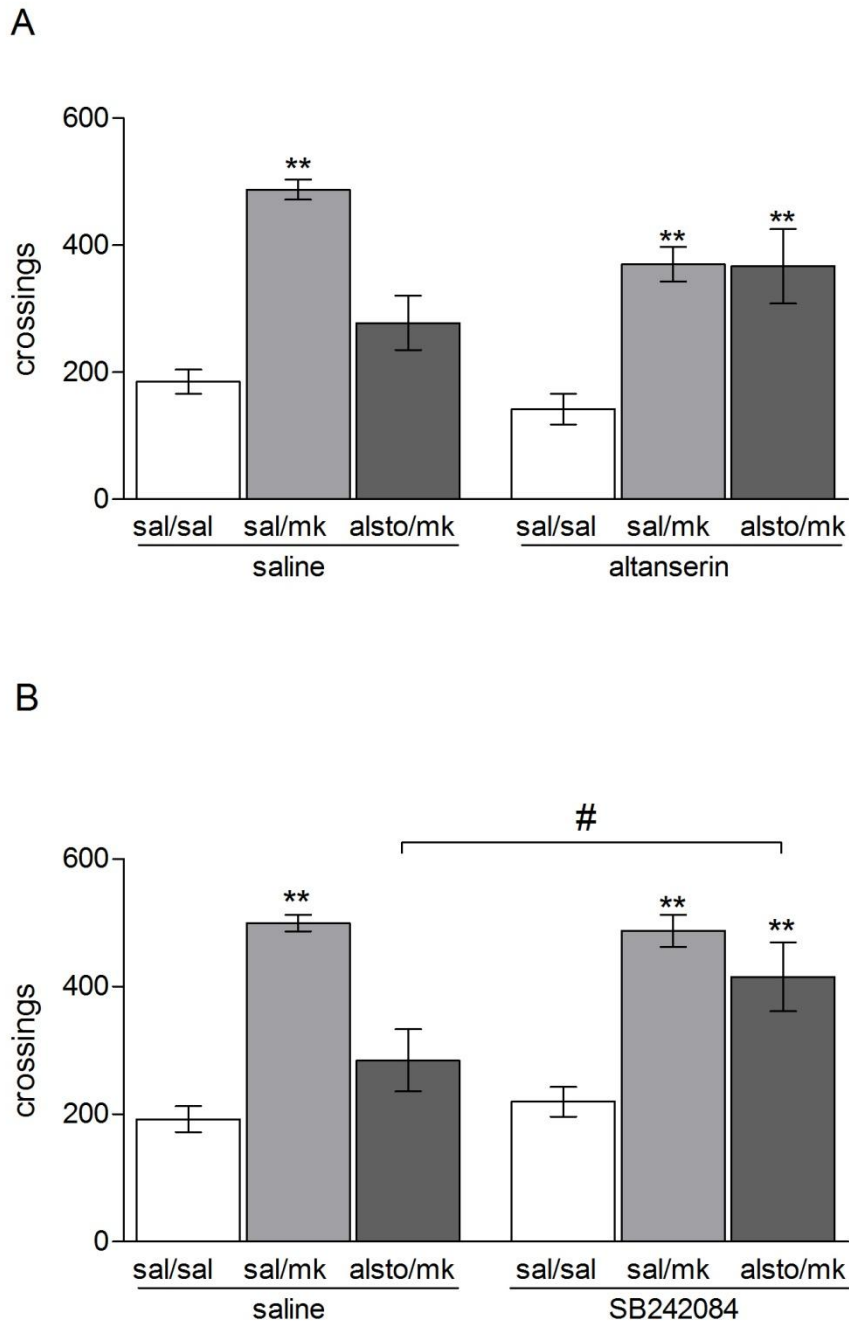


Figure 2: Effects of alstonine on MK801-induced hyperlocomotion and its prevention by specific serotonin antagonists: altanserin (5HT_{2A}, A) and SB 242084 (5HT_{2C} B). Altanserin 0.01 mg/kg, SB 242084 0.5 mg/kg, MK801 (mk) 0.3 mg/kg and alstonine (alsto) 1.0 mg/kg. **=p<0.01 compared to saline/saline/saline group. #=p<0.05 compared with the group indicated in the chart, ANOVA/SNK. Data expressed as mean ± S.E.M.

3.2. Autoradiography

3.2.1. 5HT_{2A} binding

Experiments with *in vitro* incubation shows that likewise clozapine, alstonine decreased [³H]ketanserin binding in all of the brain regions (mPFC $F_{(4,17)}=19.3$; medial CPu $F_{(4,19)}=9.1$; lateral CPu $F_{(4,19)}=13.9$; NAc core $F_{(4,19)}=27.7$; NAc shell $F_{(4,19)}=26.6$; CA1 $F_{(4,19)}=5.9$; CA3 $F_{(4,19)}=8.7$; $p<0.01$) (Table 1).

While acute alstonine treatment (0.5 and 1.0 mg/kg) did not modify [³H]ketanserin binding in any brain region (mPFC $F_{(2,11)}=1.2$; medial CPu $F_{(2,6)}=0.02$; lateral CPu $F_{(2,6)}=0.5$; NAc core $F_{(2,10)}=0.9$; NAc shell $F_{(2,10)}=0.3$; CA1 $F_{(2,11)}=2.4$; CA3 $F_{(2,11)}=2.1$; $p>0.05$), subchronic treatment significantly decreased [³H]ketanserin binding in mPFC ($F_{(2,12)}=16.0$; $p<0.01$), NAc core ($F_{(2,10)}=6.9$; $p<0.05$) and shell ($F_{(2,10)}=8.6$; $p<0.01$), and increased it in lateral CPu ($F_{(2,10)}=2.5$; $p<0.05$) without changes in the other areas (medial CPu $F_{(2,10)}=0.9$; CA1 $F_{(2,12)}=0.9$; CA3 $F_{(2,12)}=2.3$; $p>0.05$) (Table 2).

3.2.2. 5HT_{2C} binding

In vitro experiments showed that while 100 μ M clozapine decreased [³H]mesulergine binding in all brain regions (mPFC $F_{(4,16)}=3.5$; medial CPu $F_{(4,15)}=5.5$; lateral CPu $F_{(4,15)}=7.8$; NAc core $F_{(4,15)}=8.9$; NAc shell $F_{(4,15)}=6.3$; CA1 $F_{(4,19)}=4.6$; CA3 $F_{(4,19)}=4.8$; $p<0.05$), alstonine did not differ from the blank control (Table 3).

While acute treatment with alstonine did not modify [³H]mesulergine binding in any of the brain regions (mPFC $F_{(2,12)}=0.19$; medial CPu $F_{(2,9)}=0.2$; lateral CPu $F_{(2,9)}=0.5$; NAc core $F_{(2,9)}=0.3$; NAc shell $F_{(2,9)}=0.9$; CA1 $F_{(2,10)}=0.1$; CA3 $F_{(2,12)}=0.2$; $p>0.05$), the 7 days subchronic treatment significantly decreased [³H]mesulergine binding in mPFC ($F_{(2,11)}=4.5$; $p<0.05$) and increased it in NAc shell ($F_{(2,11)}=7.0$; $p<0.05$) and hippocampus (CA1 $F_{(2,10)}=4.4$ and CA3 $F_{(2,10)}=4.3$; $p<0.05$). No significant changes were seen at the other regions (medial CPu $F_{(2,12)}=0.9$; lateral CPu $F_{(2,12)}=0.8$; NAc core $F_{(2,11)}=2.4$; $p>0.05$) (Table 4).

Table 1: Effects of clozapine and alstonine on [³H]ketanserin binding *in vitro*

<i>In vitro</i>					
	Ctrl	Clozapine		Alstonine	
		10	100	10	100 μ M
mPFC	101 (6.5)	51 (3.5)**	42 (3.6)**	64 (2.5)**	77 (7.2)**
CPu					
medial	141 (13.7)	93 (8.8)**	80 (6.8)**	99 (7.4)**	74 (4.9)**
lateral	168 (13.7)	112 (11.6)**	87 (4.4)**	116 (9.1)**	76 (5.0)**
NAc					
core	198 (12.1)	94 (8.8)**	75 (5.2)**	118 (9.9)**	81 (8.7)**
shell	158 (8.1)	89 (9.2)**	71 (5.7)**	94 (6.0)**	70 (2.8)**
Hip					
CA1	82 (5.8)	62 (4.1)**	59 (2.1)**	69 (1.9)*	75 (4.9)
CA3	94 (6.2)	65 (4.8)**	59 (1.7)**	72 (2.9)*	79 (5.4)*

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M). mPFC - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions.

**=p<0.01; *=p<0.05 compared to control (Ctrl) group, ANOVA/SNK (n=3-5).

Table 2: Effects of acute and sub-chronic (7 days) alstonine treatment (0.5 and 1.0 mg/kg) on [³H]ketanserin binding.

	Acute			Sub-Chronic		
	Saline	Alstonine		Saline	Alstonine	
		0.5	1.0		0.5	1.0 mg/kg
mPFC	119 (7.1)	108 (7.3)	105 (5.6)	145 (5.6)	113 (4.5)**	99 (7.3)**
CPu						
medial	118 (8.9)	119 (7.4)	120 (8.6)	113(3.9)	105 (1.8)	117 (9.1)
lateral	162 (15.6)	152 (4.7)	169 (10.6)	134 (5.9)	128 (4.8)	164 (11.3)*
NAc						
core	150 (16.6)	178 (20.7)	197 (24.9)	142 (4.7)	121 (6.9)*	115 (5.3)*
shell	119 (7.9)	123 (8.4)	129 (11.9)	107 (1.8)	88 (4.9)**	96 (1.9)*
Hip						
CA1	81 (1.8)	89 (6.6)	99 (6.5)	74 (3.5)	69 (2.8)	71 (1.0)
CA3	75 (0.4)	87 (4.7)	91(10.6)	76 (2.3)	76 (1.5)	71 (2.2)

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M). mPFC - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions. **=p<0.01; *=p<0.05 compared to saline, ANOVA/SNK (n=3-5).

Table 3: Effects of clozapine and alstonine on [³H]mesulergine binding *in vitro*

	<i>In vitro</i>				
	Ctrl	Clozapine		Alstonine	
		10	100	10	100 μ M
mPFC	38 (5.7)	25 (3.2)	14 (2.0)*	30 (5.7)	37 (6.8)
CPu					
medial	25 (2.9)	20 (1.7)	16 (1.7)*	29 (2.7)	21 (1.4)
lateral	33 (3.8)	31 (1.9)	19 (2.2)**	37 (2.9)	24 (1.0)
NAc					
core	35 (3.4)	22 (2.6)**	16 (1.9)**	35 (3.8)	36 (2.8)
shell	35 (5.4)	26 (3.0)	18 (1.8)**	38 (2.0)	32 (2.3)
Hip					
CA1	27 (1.7)	28 (1.3)	18 (2.7)**	30 (2.0)	28 (3.1)
CA3	24 (1.6)	23 (0.6)	16 (1.6)*	23 (2.1)	22 (1.1)

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M).mPFC - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions.
 **=p<0.01; *=p<0.05 compared to control (Ctrl) group, ANOVA/SNK (n=3-5).

Table 4: Effects of acute and sub-chronic (7 days) alstonine treatment (0.5 and 1.0 mg/kg) on [³H]mesulergine binding.

	Acute			Sub-Chronic		
	Saline	Alstonine		Saline	Alstonine	
		0.5	1.0		0.5	1.0 mg/kg
mPFC	60 (6.2)	60 (3.8)	56 (4.2)	53 (3.1)	49 (0.8)	43 (1.8)*
CPu						
medial	49 (1.4)	52 (1.8)	48 (4.0)	48 (2.3)	44 (1.6)	47 (1.8)
lateral	54 (2.4)	55 (3.0)	52 (3.9)	48 (1.5)	45 (1.3)	47 (2.5)
NAc						
core	60 (2.8)	65 (4.1)	62 (5.2)	54 (2.5)	48 (1.4)	54 (2.7)
shell	66 (4.0)	65 (2.8)	59 (4.0)	50 (1.5)	49 (1.3)	56 (1.55)*
Hip						
CA1	48 (2.7)	49 (4.4)	47 (2.9)	43 (1.1)	45 (3.8)	57 (4.9)*
CA3	49 (2.7)	49 (3.4)	47 (3.7)	44 (1.3)	46 (1.1)	54 (4.3) *

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M). mPFC - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions. * = p < 0.05 compared to saline, ANOVA/SNK (n=3-5).

4. Discussion

A key role for 5HT_{2A/C} receptors in alstonine antipsychotic profile was hypothesized as ritanserin abolished the effects of alstonine in various behavioral models [19]. The present study refines this hypothesis by clarifying that both 5HT_{2A} and 5HT_{2C} are in fact relevant, since specific antagonists equally prevented alstonine effects on MK801-induced hyperlocomotion. Consistently, the same antagonists used in this study (altanserin and SB 242084) also abolished alstonine-induced reduction in glutamate uptake observed in acute hippocampal slices [30]. Glutamate modulation by serotonin has been extensively documented. Relevant to this discussion, both the behavioral effects and the increased levels of serotonin and glutamate (mPFC) induced by NMDA antagonists are known to be modulated by various serotonin receptors [13] [31]. Moreover, multiple 5HT receptors agents (including 5HT_{1A} agonists, 5HT_{2A} antagonists, 5HT_{2C} agonists/inverse agonists, and 5HT₇ antagonists) are able to attenuate the acute and chronic effects of NMDA receptors antagonists (for review see [13]).

In vitro [³H]ketanserin QAR binding confirms that alstonine binds to 5HT_{2A}, along with other atypical antipsychotics [32] [33], a result not replicated in the acute *ex vivo* experiment. A limitation of the QAR technique when applied to *ex vivo* analysis is that it requires preincubation with buffer, during which treatments may be washed away from the receptors, which is likely to explain this apparent controversial result. Nonetheless, data clearly show that repeated alstonine administration induced significant changes in 5HT_{2A} receptor binding: decrease in mPFC (~30%) and NAc (~20% core, ~10% shell), and increase in lateral CPU (~22%). Though alstonine-induced changes in receptor affinity cannot be excluded, the behavioral antipsychotic effects of alstonine would be compatible with changes in 5HT_{2A} density. Since 5HT_{2A} receptors can be down-regulated by either agonists or antagonists [34] [35], functional binding experiments are required to define the exact nature of alstonine

interaction with 5HT_{2A}. Given that 5HT_{2A} agonists are usually hallucinogenic, that behavioral (Fig. 2) and neurochemical [30] effects of alstonine are blocked by altanserin, and that atypical antipsychotics are either 5HT_{2A} antagonists or inverse agonists [36], we propose that alstonine is likely to act as 5HT_{2A} inverse agonist.

In vitro incubation with alstonine did not alter [3H]mesulergine binding, indicating that alstonine does not bind to this receptor. Nevertheless, alstonine subchronic treatment resulted in increased 5HT_{2C} binding in NAc shell (~10%), CA1 (~30%) and CA3 (~22%), decreased 5HT_{2C} binding in the mPFC (~18%), suggesting that these receptors are somehow modulated. Because behavioral and neurochemical effects of alstonine are reversed by the specific 5HT_{2C} antagonist SB242084, the data indicate that alstonine modulates 5HT_{2C} receptors, either indirectly or allosterically. Alstonine ability to act as 5HT receptors positive modulator is compatible with the marked increase in 5HT and 5HIAA found in frontal cortex from alstonine treated mice [22]. Activation of 5HT_{2C} receptors can reduce mesolimbic dopamine transmission resulting in reduced schizophrenia positive symptoms [37] [38]. In fact, 5HT_{2C} receptor agonism is thought to be the basis for WAY163909 antipsychotic-like effects [16] [17]. In the case of alstonine the modulation of 5HT_{2C} ultimately reducing dopamine assumes a central role for a putative antipsychotic drug devoid of D₂ dopamine receptors.

Though clinical trials are at this point inconclusive [38] [39], the atypicality of antipsychotics defined by the D₂/5HT_{2A} affinity ratio [36] has promoted a great deal of attention to the potential of serotonin associated targets for innovative antipsychotics. The serotonergic modulation of dopamine release seems to be region specific and receptor subtype dependent [34], representing an attractive possibility to counteract the dopaminergic imbalance in schizophrenia [2] [40]. Moreover, 5HT receptors have also been implicated in regulating the release of other neurotransmitters, including noradrenaline and GABA [41]. Such modulation can occur directly by 5HT heteroreceptors on axon terminal of

dopaminergic neurons or indirectly by GABAergic interneurons that containing 5HT heteroreceptors [41].

It has been proposed that for treating schizophrenia multiple-target drugs have better odds than single-mechanism drugs [42] [38] [43]. One line of reasoning to reconcile the importance of 5HT₂ receptors for the alleged superiority of atypical drugs with the apparently unsuccessful clinical results with pure 5HT receptors modulators [15] is that the outcomes of 5HT_{2A} and/or 5HT_{2C} receptor modulation are best fit when associated with other mechanisms. This paper corroborates that, though not exclusive, 5HT_{2A} and 5HT_{2C} are key to the mechanism of action subjacent to the antipsychotic-like properties of alstonine. Considering the evidence that alstonine does not block D2 receptors but modulates dopamine [18], and interferes with dopamine and glutamate uptakes [30], this study places alstonine further apart from known antipsychotics. Noteworthy, though the published evidence of antipsychotic-like properties come from rodent models, the fact that alstonine was identified in the first place as a component of remedies used to treat mental patients vests the data with considerable higher significance.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for fellowships and financial support (#490493/2008-4). Additional financial support came from FAPERGS (PRONEX #10/0031-1). We express appreciation for the skillful technical assistance provided by Mrs. Susana Buglione with the autoradiograph experiments.

6. References

1. Rinkel M, Hyde RW, Solomon HC, Hoagland H: **Experimental psychiatry. II. Clinical and physio-chemical observations in experimental psychosis.** *Am J Psychiatry* 1955, **111**:881-895.
2. Abi-Dargham A: **Alterations of serotonin transmission in schizophrenia.** *Int Rev Neurobiol* 2007, **78**:133-164.
3. Oluoha DC, Hyde TM, Kleinman JE: **The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin**

- receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology (Berl)* 1993, **112**:S5-15.
4. Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toti R, Weinberger DR, Kleinman JE: **Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study.** *Arch Gen Psychiatry* 1993, **50**:810-818.
 5. Joyce JN, Shane A, Lexow N, Winokur A, Casanova MF, Kleinman JE: **Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics.** *Neuropsychopharmacology* 1993, **8**:315-336.
 6. Simpson MD, Lubman DI, Slater P, Deakin JF: **Autoradiography with [3H]8-OH-DPAT reveals increases in 5-HT(1A) receptors in ventral prefrontal cortex in schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 1996, **39**:919-928.
 7. Sumiyoshi T, Stockmeier CA, Overholser JC, Dilley GE, Meltzer HY: **Serotonin1A receptors are increased in postmortem prefrontal cortex in schizophrenia.** *Brain Res* 1996, **708**:209-214.
 8. Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ: **5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia.** *Neuropsychopharmacology* 1996, **15**:442-455.
 9. Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ: **[3H]WAY-100635 for 5-HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia.** *Neurochem Int* 1997, **30**:565-574.
 10. Gurevich EV, Joyce JN: **Alterations in the cortical serotonergic system in schizophrenia: a postmortem study.** *Biol Psychiatry* 1997, **42**:529-545.
 11. Meltzer HY, Nash JF: **Effects of antipsychotic drugs on serotonin receptors.** *Pharmacol Rev* 1991, **43**:587-604.
 12. Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J: **Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003, **27**:1159-1172.
 13. Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW: **The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment.** *Psychopharmacology (Berl)* 2011, **213**:289-305.
 14. Howes OD, Kapur S: **The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway.** *Schizophr Bull* 2009, **35**:549-562.
 15. Ellenbroek BA: **Psychopharmacological treatment of schizophrenia: What do we have, and what could we get?** *Neuropharmacology* 2012, **62**:1371-1380.
 16. Marquis KL, Sabb AL, Logue SF, Brennan JA, Piesla MJ, Comery TA, Grauer SM, Ashby CR, Nguyen HQ, Dawson LA, et al.: **WAY-163909 [(7bR,10aR)-1,2,3,4,8,9,10,10a-octahydro-7bH-cyclopenta-[b][1,4]diazepino[6,7,1hi]indole]: A novel 5-hydroxytryptamine 2C receptor-selective agonist with preclinical antipsychotic-like activity.** *J Pharmacol Exp Ther* 2007, **320**:486-496.
 17. Grauer SM, Graf R, Navarra R, Sung A, Logue SF, Stack G, Huselton C, Liu Z, Comery TA, Marquis KL, et al.: **WAY-163909, a 5-HT2C agonist, enhances the preclinical potency of current antipsychotics.** *Psychopharmacology (Berl)* 2009, **204**:37-48.
 18. Costa-Campos L, Lara DR, Nunes DS, Elisabetsky E: **Antipsychotic-like profile of alstonine.** *Pharmacol Biochem Behav* 1998, **60**:133-141.

19. Linck VM, Bessa MM, Herrmann AP, Iwu MM, Okunji CO, Elisabetsky E: **5-HT_{2A/C} receptors mediate the antipsychotic-like effects of alstonine.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012, **36**:29-33.
20. Costa-Campos L, Elisabetsky E, Lara DR, Carlson TJ, King SR, Ubillas R, Nunes DS, Iwu MM, Nkemjika CO, Ozioko A, et al.: **Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy.** *An Acad Bras Cienc* 1999, **71**:189-201.
21. Elisabetsky E, Costa-Campos L: **The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2006, **3**:39-48.
22. Linck VM, Herrmann AP, Piato AL, Detanico BC, Figueiró M, Flório J, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky E: **Alstonine as an Antipsychotic: Effects on Brain Amines and Metabolic Changes.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, **2011**:1-7.
23. Okunji CO, Iwu MM, Ito Y: **Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining countercurrent chromatography.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2005, **28**:775-783.
24. Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M, Elisabetsky E: **Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine.** *Pharmacol Biochem Behav* 2004, **77**:481-489.
25. Ninan I, Kulkarni S: **5-HT_{2A} receptor antagonists block MK-801-induced stereotypy and hyperlocomotion.** *Eur J Pharmacol* 1998, **358**:111-116.
26. Antonelli MC, Baskin DG, Garland M, Stahl WL: **Localization and characterization of binding sites with high affinity for [³H]ouabain in cerebral cortex of rabbit brain using quantitative autoradiography.** *J Neurochem* 1989, **52**:193-200.
27. Franklin KBJ, Paxinos G: **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** edn Third Edition. Edited by: Elsevier Inc.; 2007.
28. Chavez C, Hollaus M, Scarr E, Pavey G, Gogos A, van den Buuse M: **The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study.** *Brain Res* 2010, **1321**:51-59.
29. López-Giménez JF, Tecott LH, Palacios JM, Mengod G, Vilaró MT: **Serotonin 5-HT_{2C} receptor knockout mice: autoradiographic analysis of multiple serotonin receptors.** *J Neurosci Res* 2002, **67**:69-85.
30. Herrmann AP, Lunardi P, Pilz LK, Linck VM, Okunji CO, Gonçalves CA, Elisabetsky E: **Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices.** *Neurochem Int*, 2012, *subtted*.
31. Labonte B, Bambico FR, Gobbi G: **Potentiation of excitatory serotonergic responses by MK-801 in the medial prefrontal cortex.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009, **380**:383-397.
32. Meltzer HY, Huang M: **In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems.** *Prog Brain Res* 2008, **172**:177-197.
33. Stahl SM: *Antipsychotics and Mood Stabilizers.* New York, USA: Cambridge University Press; 2008.
34. Gray JA, Roth BL: **Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists.** *Brain Res Bull* 2001, **56**:441-451.
35. Allen JA, Roth BL: **Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011, **51**:117-144.

36. Meltzer H, Massey B: **The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs.** *Curr Opin Pharmacol* 2011, **11**:59-67.
37. Alex KD, Pehek EA: **Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission.** *Pharmacol Ther* 2007, **113**:296-320.
38. Kim DH, Stahl SM: **Antipsychotic drug development.** *Curr Top Behav Neurosci* 2010, **4**:123-139.
39. Ebdrup BH, Rasmussen H, Arnt J, Glenthøj B: **Serotonin 2A receptor antagonists for treatment of schizophrenia.** *Expert Opin Investig Drugs* 2011, **20**:1211-1223.
40. Abi-Dargham A: **Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2004, **7 Suppl 1**:S1-5.
41. Fink KB, Göthert M: **5-HT receptor regulation of neurotransmitter release.** *Pharmacol Rev* 2007, **59**:360-417.
42. Roth B, Sheffler D, Kroeze W: **Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**:353-359.
43. Wong EH, Tarazi FI, Shahid M: **The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action.** *Pharmacol Ther* 2010, **126**:173-185.

Capítulo 3

Alstonine does not block D2 receptors but increases striatal dopamine uptake and modulates DAT and D2 receptors densities: relevance for antipsychotic properties

Artigo a ser submetido à revista Psychopharmacology.

Instruções de autores: www.springer.com/biomed/neuroscience/journal/213
Observação: para facilitar a leitura da banca, as figuras foram inseridas no texto.

Alstonine does not block D2 receptors but increases striatal dopamine uptake and modulates DAT and D2 receptors densities: relevance for antipsychotic properties

Viviane M. Linck^{a,b*}, Marcelo Ganzella^b, Ana P. Herrmann^{a,b}, Christopher O. Okunji^c, Diogo O. Souza^b, Marta C. Antonelli^d, Elaine Elisabetsky^{a,b}

^aLaboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c International Centre for Ethnomedicine and Drug Development (InterCEDD), Nsukka, Enugu State, Nigeria.

^dInstituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina.

*Corresponding author:

Viviane M. Linck

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone/Fax: +55 51 33083121

E-mail address: vivilinck@gmail.com

Abstract

Rationale: There is an undisputed need for innovative medication to treat schizophrenics. Alstonine is a putative antipsychotic effective in rodent models for positive, negative and cognitive symptoms. Evidence suggests that alstonine does not block D₂ dopamine receptors (D₂R) in contrast to known antipsychotics. HPLC analysis showed that alstonine treatment results in increased levels of the intraneuronal dopamine (DA) metabolite, but not in the extraneuronal metabolite, suggesting that DA uptake could be implicated in alstonine effects. *Objectives:* This study investigated the effects of alstonine on dopamine transporter (DAT) function and density, as well as the D₂R density in relevant brain regions. *Methods:* The effects of alstonine were assessed in mouse striatal synaptosomal [³H]DA uptake *in vitro* and *ex vivo* (acute and sub-chronic treatments). Quantitative autoradiography (QAR) was used to determine alstonine effects on DAT and D₂R densities in medial pre frontal cortex (mPFC), hippocampus (CA1 and CA3), caudate-putamen (medial and lateral) and nucleus accumbens (core and shell). *Results:* DA uptake was increased by nearly twofold after acute alstonine treatment, but unchanged with sub-chronic treatment. Sub-chronic treatment decreased DAT density at mPFC but increased at nucleus accumbens core and CA3, as well as decreased D₂R density at caudate-putamen. *Conclusions:* This study provides additional evidence that alstonine does not bind to D₂R. Congruent with alstonine behavioral profile, it indicates that dopamine is nevertheless indirectly modulated, possibly including regulation of DA uptake. While reinforcing the possibility that alstonine has an innovative antipsychotic mode of action, the study also adds to clarifying its multiple mechanism of action.

Keywords: alstonine, antipsychotic, schizophrenia, dopamine transporter, D₂ dopamine receptor, dopamine uptake

1. Introduction

The early 1970s concept of schizophrenia as a dopaminergic disorder was based on the observations that while dopaminergic-releasing drugs induced psychoses-like behaviors, D₂ dopamine receptor (D₂R) antagonists had antipsychotic effects (Carlsson 1988). Despite the fact that the common feature of all currently clinical approved antipsychotic drugs is the D₂R antagonism, another agreed notion, unfortunately, is that more than 60 years after introducing antipsychotics in clinic only modest improvement can be expected in most schizophrenics patients (Insel 2010). The classic dopaminergic hypothesis gave place to the current understanding that it is rather a dopaminergic imbalance to be attributed for schizophrenia (Abi-Dargham 2004). Dopaminergic hypoactivity in cortical regions would lead to negative (e.g. social interaction withdrawal and affective flattening) and cognitive symptoms (e.g. attention and memory deficits), while hyperactivity on mesolimbic dopaminergic pathways correlates to positive symptoms (e.g. delusions and hallucinations). D₂R blockade is only effective on positive symptoms, while responsible for extrapyramidal side effects (by blocking nigrostriatal dopamine) and increases on prolactin levels (by blocking tuberoinfundibular dopamine) (Stahl 2008). Therefore, a better effective antipsychotic would somehow balance the disease bound dopamine (DA) imbalance (Kim and Stahl 2010).

Even though postsynaptic D₂R blockade has been the mainstream treatment for schizophrenia, a growing body of evidence suggests that the focus should instead be on the presynaptic terminal. As recently reviewed by Miyake et al. (2011), data indicate that in schizophrenia DA synthesis and storage are increased in the dorsal caudate, along with an increased basal occupancy of striatal D₂R. The increase in DA tonus is more evident in patients with active psychosis, and appears to be somewhat present during the prodromal period (Huttunen et al. 2008).

Current antipsychotics drugs are classified as typical agents (e.g. chlorpromazine and haloperidol), associated with extra pyramidal (EPS) side effects, and atypical agents (e.g. clozapine, olanzapine, risperidone), less associated with EPS but with unwanted metabolic side effects (Stahl 2008). Though all antipsychotic medications are associated with poor adherence and less than ideal effectiveness (Lieberman et al. 2005), (Insel 2010), the mechanism that differs both classes is that atypical drugs show greater 5HT_{2A}/D₂ affinity ratio (Meltzer et al. 1989) (Meltzer et al. 2003) (Schotte et al. 1996).

Alstonine, a putative antipsychotic suggested to be devoid of direct D₂R antagonism, consistently displayed the profile of an atypical antipsychotic in animal models of positive (Costa-Campos et al. 1998), negative (de Moura Linck et al. 2008), and cognitive (Linck et al. 2012) schizophrenia symptoms. Collectively, the data suggest that alstonine could differentially regulate DA in limbic and cortical areas, a property of obvious advantage in treating schizophrenia. Exactly how alstonine modulates DA is still unclear, though it is apparent that 5HT_{2A} and 5HT_{2C} are implicated in alstonine antipsychotic-like effects (Linck et al. 2012), and the crosstalk between DA neurons and these serotonin receptors have been documented (Millan et al. 1998) (Alex and Pehek 2007) (Fink and Göthert 2007) (Di Giovanni et al. 2008) (Di Matteo et al. 2008).

The findings that cortex and striatum homogenates from mice treated with alstonine showed decreased levels of DA, increased levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, the DA intraneuronal metabolite), but no changes in homovanillic acid (HVA, the DA extra neuronal metabolite) (Linck et al. 2011) lead to the hypothesis that alstonine could modulate dopamine uptake. Thus, in the present study we evaluated the effects of alstonine on DA uptake in mouse striatal synaptosomes. Additionally, dopamine transporter (DAT) and D₂R densities were investigated by quantitative autoradiography (QAR) in areas relevant to antipsychotic properties.

2. Methods

2.1. Animals

Experiments were performed with male (CF1) 2 months old adult albino mice (40-45 g). Animals were maintained in our own animal facility under controlled environmental conditions (22 ± 1 °C, 12-h light/dark cycle, free access to food and water), for at least two weeks before the experiments.

The study was approved by the University Ethics Committee (approval #18236); all procedures were carried out in accordance with institutional policies on experimental animal handling.

2.2. Drugs

Alstonine hydrochloride was isolated (98% purity) from *Picralima nitida* Th. & H. Dur. (Apocynaceae) as previously detailed (Okunji et al. 2005); the structure was verified by HPLC-MS. 1,3-ditolyguanidine (DTG), clozapine, GBR12909, pargyline and dopamine were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); sulpiride, cis-flupentixol and pindolol from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). [^3H]dopamine (38.7 Ci/mmol), [^3H]nemonapride (YM-09151-2, 85.5 Ci/mmol) and [^3H]GBR12935 (40 Ci/mmol) were purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). Clozapine, sulpiride and pindolol were solubilized in HCl (1N), and the pH adjusted to 6.0 with 1N NaOH; DTG was solubilized in methanol; all other drugs were diluted in distilled water. Treatments were administered intraperitoneally (0.1 mL/10 g of body weight).

2.3. Dopamine uptake

Synaptosomal preparations were obtained from: (a) *in vitro* experiments: naive mice were used and drugs (10 and 100 uM clozapine and 0.1, 1.0, 10 and 100 uM alstonine) were directly incubated with the synaptosomal preparations. (b) *ex vivo* acute: mice were treated with saline, clozapine (2.0 mg/kg) or alstonine (0.5 or 1.0 mg/kg) and sacrificed 30 min later. (c) *ex vivo* subchronic: mice were treated with saline, clozapine (2.0 mg/kg) or alstonine (0.5 and 1.0 mg/kg) daily for 7 days, and sacrificed 24 h after the last administration.

[^3H] Dopamine uptake was determined in rat striatal synaptosomal preparations based on Fleckenstein et al. (1999) and Pandolfo et al. (2011). Briefly, synaptosomes were prepared

by homogenizing mouse striatal fresh tissue in ice-cold Tris buffer (0.32 M sucrose, 1nM EDTA and 0.25 nM DTT; pH 7.4), followed by centrifugation (1000 g/10 min/4 °C). Supernatants (S1) were centrifuged at 17000 g for 20 min at 4 °C; the resulting pellets (P2) were re-suspended in assay buffer (in mM: 126 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 CaCl, 1.4 MgSO, 11 glucose, 1.1 ascorbic acid, 16 sodium fosfate; pH 7.4) and centrifuged (17000 g/10 min/4 °C) in order to completely remove residual sucrose. The final P2 pellets were re-suspended in ice-cold assay buffer. Aliquots of striatal synaptosome (50 ul) were warmed for 4 min at 37 °C then incubated in glass test-tubes with 500 nM dopamine (0.09 uCi/mL [³H]dopamine was used as trace with unlabeled dopamine), 1 uM pargyline (to prevent dopamine metabolization by MAO) and with tested drugs in *in vitro* incubation during 5 min at 37 °C (500 ul final incubation volume). Incubations were stopped by adding 2 ml of ice-cold assay buffer, followed by vacuum filtration through glass microfiber filters (Whatman GF/B). The filters were washed twice with 3 ml ice-cold 0.32 M sucrose. Filters were dried for 10 min at 60 °C and placed in scintillation vials with 1.5 ml scintillation liquid. Radioactivity was measured in a scintillation counter (2800TR TriCarb Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer - Waltham, MA, USA). Synaptosome protein was measured following the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard. Dopamine uptake was converted in pmol DA/min/mg protein and expressed as % of control. All experiments were performed in triplicate.

Pilot experiments demonstrated that the selective DAT inhibitor GBR 12909 (1 uM) blocked dopamine uptake by 89.3% in this preparation, demonstrating that dopamine was mainly transported by DAT. The use of 50 uM unlabeled dopamine also resulted in 89.9% inhibition, indicating that the non-specific uptake was 11%. The unspecific uptake was determined for each synaptosomal preparation (using 50 uM unlabeled DA) and subtracted from total uptake to yield the specific uptake.

2.4. Quantitative Autoradiography Assays

2.4.1. Tissue preparation

Treatments were as follows: (a) *in vitro*: naive mice were used and drugs (10 and 100 μ M clozapine and 10 and 100 μ M alstonine) were directly incubated with the brain slices together in the binding buffer. (b) *ex vivo* acute: mice were treated with saline or alstonine (0.5 or 1.0 mg/kg) and sacrificed 30 min later. (c) *ex vivo* subchronic: mice were treated with saline or alstonine (0.5 and 1.0 mg/kg) daily for 7 days, and sacrificed 24 h after the last administration.

Mice were sacrificed, the whole brains quickly removed and immediately frozen by immersion for 15-20 seconds in Freon and stored at -80 °C. Cryostat sections (Leica CM18-50, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Germany), 12 μ m thick, were thawed-mounted onto gelatin-coated microscope slides and dried on a warm plate for 30 seconds. Six sections were mounted per slide, which were desiccated with silica and stored at -80°C until use. The sections were obtained through medial prefrontal cortex (mPFC), caudate-putamen (CPu), nucleus accumbens (NAc), hippocampal regions CA1 and CA3 according to Franklin and Paxinos (2007). These selected cortical, extrapyramidal, and limbic areas mediate cognitive, motor, and emotional functions often altered in patients with psychotic disorders and/or by antipsychotic treatment.

2.4.2. Dopamine transporter (DAT)

The methodology was adapted from Chavez et al. (2010). Incubations were prepared at room temperature (RT). Sections were preincubated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.7) containing 70 mM NaCl and 0.025% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at RT. A second 1 h incubation followed with the binding buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.7, 1 μ M cis-flupentixol and 2 nM [³H]GBR12935). To assess nonspecific binding, sections were incubated in the binding buffer in the presence of 10 μ M GBR12909.

2.4.3. D₂-like receptors

The D₂R autoradiography protocol was modified from Berger et al. (2002). Incubations were performed at RT. Sections were preincubated for 1 h in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂. Sections were then incubated for 1 h in the same buffer with additional 1.0 nM [³H]nemonapride, 0.5 mM DTG, and 0.1 mM pindolol to block sigma ($\sigma_{1,2}$) and 5HT_{1A} sites, respectively. Nonspecific binding was determined with 40 μ M sulpiride.

2.4.4. Film exposure and Image analysis

Following incubation the sections were rinsed twice in Tris-HCl buffer (4 °C, 5 minutes) and dipped three times in cold distilled water. The sections were dried under a stream of air at room temperature (RT), briefly placed on a warm plate (60 °C, 60 seconds) and cooled to RT before film exposure. The autoradiograms were obtained after exposure of the sections to Kodak BIOMAX MR-1 (Sigma) film at -4 °C for 30-60 days in light-tight cassettes. Radioactivity standards (American Radiolabeled Chemical Inc.) consisting of 14 sections of methacrilate plastic impregnated with tritium (0.14 - 489 μ Ci/g) were jointly exposed with the sections. Films were developed in Kodak Dektol developer and fixative (Sigma). Autoradiography images were scanned in conventional scanner, relevant brain regions were outlined (Fig. 1) and the analyses obtained using Image J software (developed at the U.S. National Institutes of Health, available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Optic density was converted to nCi/mg of tissue with calibrated methacrylate tritium standards, and after subtracting nonspecific (15-22%) from total binding, specific binding was expressed as fmol/mg tissue.

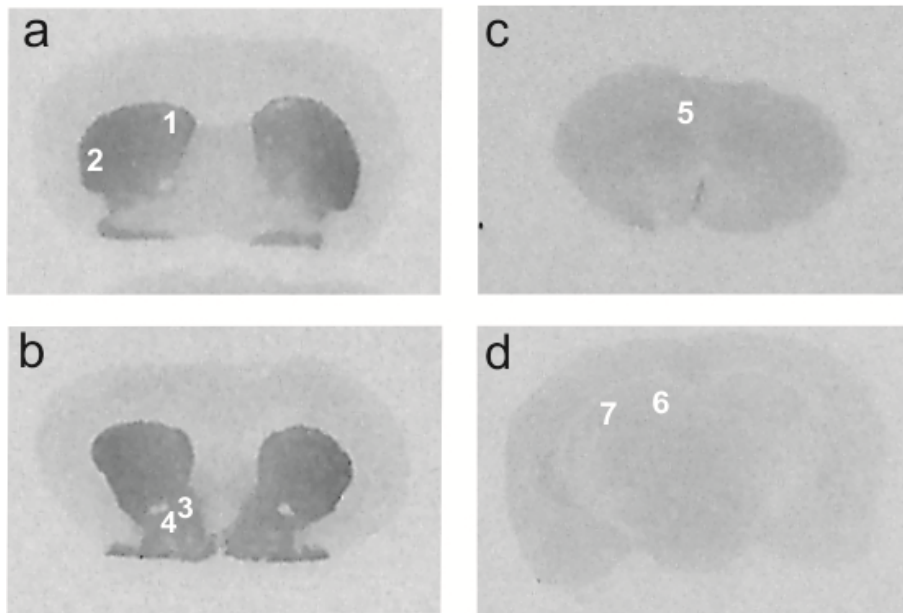


Figure 1: Representative images from [³H]nemonapride QAR. Mouse brain regions areas analyzed: (1) medial CPu; (2) lateral CPu; (3) NAc shell; (4) NAc core; (5) mPCF; (6) CA1; (7) CA3.

2.5. Statistics

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. GraphPad Prism 5 for Windows was used for the statistical analysis; $p < 0.05$ was set as statistically significant.

3. Results

3.1 Dopamine uptake

One-way ANOVA showed that *in vitro* incubation with clozapine or alstonine decreased dopamine uptake ($F_{(6,49)}=14.3$; $p < 0.05$). The post hoc indicated that 100 μ M clozapine and 100 μ M alstonine markedly inhibited dopamine uptake (78 and 39%, respectively) (Fig. 2). Dopamine uptake in synaptosomes obtained from acutely treated mice was also modified ($F_{(3,32)}=3.2$; $p < 0.05$), though in this case increased (109%; $p < 0.05$) by alstonine (1.0 mg/kg); but not significantly altered by clozapine (2.0 mg/kg). Subchronic treatment did not modify

dopamine uptake ($F_{(3,33)}=0.3$; $p>0.05$) (Fig.3). The possibility that radioactivity measurement could result from [^3H]dopamine metabolism by MAO (into [^3H]DOPAC) is discarded by the presence of pargyline.

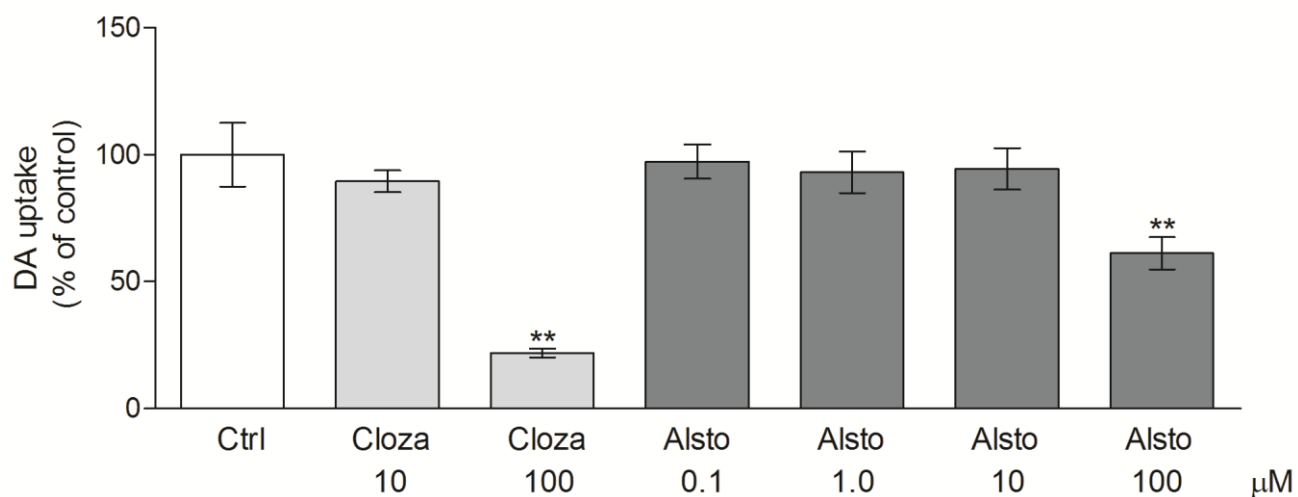


Figure 2: Effects of *in vitro* incubation with clozapine (Cloza) and alstonine (Alsto) on mouse striatal synaptosomal DA uptake (n=8). Data expressed as % control. ** = $p<0.01$ compared to control (Ctrl) group, ANOVA/SNK.

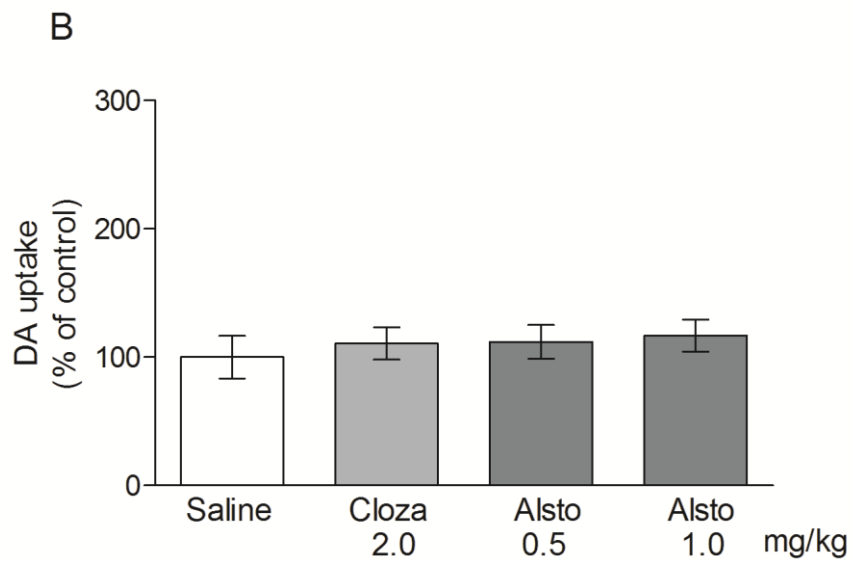
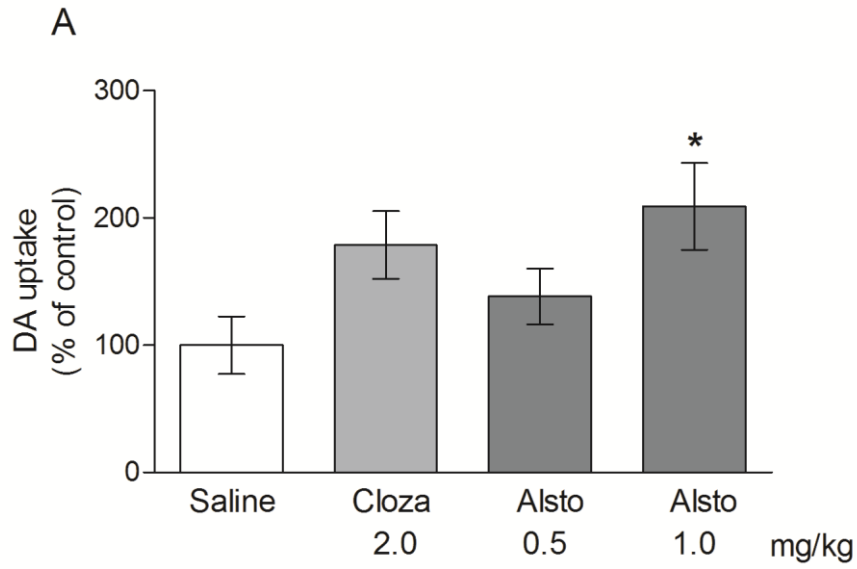


Figure 3: Effects of (A) acute and (B) sub-chronic (7 days) treatment with clozapine (Cloza) and alstonine (Alsto) on mouse striatal synaptosomal DA uptake (n=8-10). * = $p < 0.05$ compared to saline group, ANOVA/SNK. Data expressed as % control.

3.2. DAT autoradiography

In vitro incubation with 100 μ M clozapine (but not with 10 μ M) decreased [3 H]GBR12935 binding in all regions (mPFC $F_{(4,18)}=37.0$; medial CPu $F_{(4,18)}=25.7$; lateral CPu $F_{(4,18)}=49.4$; NAc core $F_{(4,19)}=12.4$; NAc shell $F_{(4,19)}=14.5$; CA1 $F_{(4,16)}=34.2$; CA3 $F_{(4,16)}=25.7$; $p<0.01$). Noteworthy, the active concentration was the same that inhibited synaptosomal DA uptake. Alstonine (10 and 100 μ M) did not alter [3 H]GBR12935 binding (Table 1).

Table 2 shows the effects of alstonine treatment on [3 H]GBR12935 binding. While acute treatment was devoid of effects (mPFC $F_{(2,9)}=0.8$; medial CPu $F_{(2,9)}=0.05$; lateral CPu $F_{(2,9)}=3.5$; NAc core $F_{(2,9)}=2.7$; NAc shell $F_{(2,9)}=0.03$; CA1 $F_{(2,9)}=0.5$; CA3 $F_{(2,9)}=2.5$; $p>0.05$), subchronic alstonine induced region specific changes. Post hoc indicated that alstonine (0.5 and 1.0 mg/kg) increased [3 H]GBR12935 binding in NAc core ($F_{(2,10)}=5.1$; $p<0.05$) and CA3 ($F_{(2,9)}=5.3$; $p<0.05$), decreased it in mPFC ($F_{(2,10)}=7.4$; $p<0.01$), with no changes observed in the other areas (medial CPu $F_{(2,12)}=2.4$; lateral CPu $F_{(2,12)}=1.0$; NAc shell $F_{(2,10)}=1.9$; CA1 $F_{(2,9)}=0.4$; $p>0.05$).

3.3. D₂R autoradiography

In vitro: As expected, clozapine (10 and 100 μ M) decreased [3 H]nemonapride binding in all regions (mPFC $F_{(4,18)}=20.4$; medial CPu $F_{(4,20)}=41.1$; lateral CPu $F_{(4,19)}=72.2$; NAc core $F_{(4,19)}=65.6$; NAc shell $F_{(4,19)}=39.9$; CA1 $F_{(4,18)}=8.4$; CA3 $F_{(4,19)}=8.6$; $p<0.01$). Alstonine (10 and 100 μ M) did not modified *in vitro* [3 H]nemonapride binding (table 3).

Table 4 shows the effect of alstonine treatment on [3 H]nemonapride binding. While acute treatment was devoid of effects (mPFC $F_{(2,11)}=0.01$; medial CPu $F_{(2,10)}=2.3$; lateral CPu $F_{(2,10)}=0.2$; NAc core $F_{(2,10)}=2.7$; NAc shell $F_{(2,10)}=0.9$; CA1 $F_{(2,11)}=0.4$; CA3 $F_{(2,11)}=0.2$; $p>0.05$), subchronic alstonine decreased [3 H]nemonapride binding in medial and lateral CPu (by 17 and 18%, $F_{(2,11)}=4.8$ and $F_{(2,11)}=6.2$; respectively; $p<0.05$), with no significant changes in other regions (mPFC $F_{(2,12)}=0.5$; NAc core $F_{(2,11)}=0.5$; NAc shell $F_{(2,11)}=0.1$; CA1 $F_{(2,11)}=1.4$; CA3 $F_{(2,11)}=3.2$; $p>0.05$).

Table 1: Effects of clozapine and alstonine on [³H]GBR12935 binding *in vitro*

	<i>In vitro</i>				
	Ctrl	Clozapine		Alstonine	
		10	100	10	100 _{μM}
mPFC	91 (3.2)	105 (5.7)	19 (0.3)**	97 (7.9)	108 (10.1)
CPu					
medial	153 (11.2)	139 (9.7)	62 (1.0)**	144 (3.0)	148 (10.0)
lateral	169 (5.6)	148 (6.6)	62 (1.6)**	155 (4.9)	160 (11.2)
NAc					
core	145 (18.9)	16.1(9.5)	66 (1.2)**	159 (5.8)	162 (16.3)
shell	160 (17.9)	143 (9.1)	62 (1.1)**	144 (4.8)	154 (12.5)
Hip					
CA1	194 (17.5)	166 (9.2)	52 (1.5)**	158 (5.0)	192 (14.3)
CA3	151 (19.3)	194 (13.0)	60 (1.1)**	173 (5.6)	197 (15.5)

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M).mPFC - medial prefrontal cortex;

CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions.

**=p<0.01 compared to control (Ctrl) group, ANOVA/SNK (n=3-5).

Table 2: Effects of acute and sub-chronic (7 days) alstonine treatment (0.5 and 1.0 mg/kg) on [³H]GBR12935 binding.

	Acute			Sub-Chronic		
	Saline	Alstonine		Saline	Alstonine	
		0.5	1.0		0.5	1.0 mg/kg
mPCF	53 (3.9)	45 (6.3)	48 (3.2)	32 (3.7)	20 (1.6)*	21 (1.3)**
CPu						
medial	127 (8.3)	121 (12.1)	125 (6.2)	81(4.5)	90 (3.8)	91 (1.8)
lateral	158 (6.8)	151 (0.8)	143 (3.4)	89 (5.9)	100 (5.4)	94 (4.7)
NAc						
core	138 (2.8)	163 (8.6)	159 (7.6)	79 (4.4)	99 (3.0)*	96 (5.1)*
shell	141 (7.0)	147 (18.2)	145 (12.1)	82 (6.4)	95 (2.1)	91 (4.8)
Hip						
CA1	190 (17.0)	199 (12.5)	210 (10.7)	111 (5.4)	121 (9.7)	119 (9.4)
CA3	158 (11.8)	185 (13.0)	193 (10.6)	94 (2.8)	116 (4.4)*	122 (9.9)*

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M). mPCF - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions.

*=p<0.05 and **=p<0.01 compared to saline, ANOVA/SNK (n=3-5).

Table 3: Effects of clozapine and alstonine on [³H]nemonapride binding *in vitro*.

	<i>In vitro</i>				
	Ctrl	Clozapine		Alstonine	
		10	100	10	100 μ M
mPCF	23 (1.6)	18 (0.3)**	16 (0.4)**	26 (0.9)	21 (0.6)
CPu					
medial	141 (8.9)	63 (2.9)**	30 (0.3)**	157 (14.1)	133 (9.3)
lateral	206 (20.7)	102 (6.7)**	34 (0.8)**	271 (16.0)	229 (11.4)
NAc					
core	100 (7.5)	51 (2.5)**	29 (0.6)**	105 (3.8)	90 (2.1)
shell	92 (6.4)	49 (1.2)**	28 (0.6)**	88 (6.4)	84 (4.7)
Hip					
CA1	39 (2.1)	33 (0.9)	29 (1.1)**	38 (0.7)	35 (1.8)
CA3	38 (2.1)	33 (1.0)	28 (0.5)**	34 (1.1)	34 (0.5)

mPCF - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens;
 Hip - hippocampal regions. **= $p < 0.01$ compared to control (Ctrl) group, ANOVA/SNK (n=3-5).
 Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M).

Table 4: Effects of acute and sub-chronic (7 days) alstonine treatment (0.5 and 1.0 mg/kg) on [³H]nemonapride binding.

	Acute			Sub-Chronic		
	Saline	Alstonine		Saline	Alstonine	
		0.5	1.0		0.5	1.0 mg/kg
mPCF	26 (1.0)	27 (1.6)	26 (3.1)	33 (2.0)	31 (3.4)	29 (2.3)
CPu						
medial	138 (8.2)	134 (6.1)	150 (2.0)	187 (6.6)	181 (9.7)	155 (6.9)*
lateral	191 (10.6)	202 (11.9)	195 (11.8)	305 (16.7)	292 (6.2)	249 (5.2)*
NAc						
core	127 (3.3)	133 (4.2)	120 (3.5)	140 (7.3)	132 (4.7)	133 (7.1)
shell	120 (6.7)	127 (5.9)	113 (9.4)	108 (11.5)	107 (6.5)	102 (9.2)
Hip						
CA1	52 (4.0)	59 (5.7)	54 (6.2)	49 (4.0)	56 (2.1)	51 (2.4)
CA3	47 (2.0)	49 (3.1)	47 (2.7)	43 (2.6)	47 (1.2)	40 (1.0)

Data in fmol/mg tissue expressed as mean (S.E.M).mPCF - medial prefrontal cortex; CPu - caudate-putamen; NAc - nucleus accumbens; Hip - hippocampal regions. *=p<0.05 compared to saline, ANOVA/SNK (n=3-5).

4. Discussion

An optimal antipsychotic medication would reinstate dopamine levels in the cortex and mesolimbic areas of schizophrenics, requiring drugs that differentially modulate dopamine function in different brain regions (Correll 2011). Though behavior and neurochemical data suggest that alstonine differentially modulates dopamine in cortex and striatum (Costa-Campos et al. 2004a; 2004b), the mechanisms by which dopaminergic transmission is modulated by alstonine requires elucidation. In this study we evaluated the effects of alstonine on DAT function and DAT and D₂R densities.

DA synaptosomal uptake was used to evaluate DAT activity. In line with the literature (Ruiu et al. 2000), results show that *in vitro* clozapine inhibits DA uptake; likewise, *in vitro* alstonine (at the highest concentration) inhibited DA uptake. Additionally, mice treated with alstonine in the same experimental design that induces behavioral effects (Costa-Campos et al. 1998) (Costa-Campos et al. 2004a) (de Moura Linck et al. 2008) (Linck et al. 2012) showed a twofold increased in DA uptake; this effect disappeared with subchronic (7 days) treatment. The increased DA uptake is congruent with increases in striatal DOPAC levels induced by alstonine with the same dose and pre-administration timing (Linck et al. 2011). The apparently controversy between alstonine *in vitro* incubation and acute treatment could indicate that functional structure and indirect neurotransmitter modulation are important for alstonine effects on DAT. While in experiments using *in vitro* incubation only direct drugs effects in the synaptosome can be analyzed, *ex vivo* treatment allows the evaluation of complex structural modulation and neurotransmitters cross-talk.

QAR was used to assess DAT binding (*in vitro*) as well as changes in DAT density (*ex vivo*), using the same treatment conditions used for behavioral and dopamine uptake experiments. Clozapine markedly decreased [³H]GBR12935 binding in the same concentration that inhibited DA uptake, suggesting that clozapine acts as a direct DAT inhibitor. Acute alstonine did not modify [³H]GBR12935 binding, though DAT density was diminished in mPFC while

increased in NAc core and CA1 after subchronic treatment. It is noteworthy that increases in DA uptake and DOPAC correlates in dose and timing with alstonine effects on mice models of positive symptoms (amphetamine-induced lethality in grouped mice, MK801-induced hyperlocomotion, apomorphine-induced stereotypy) (Costa-Campos et al. 1998); (Costa-Campos et al. 2004a).

DAT has been proposed as a target of interest for developing new antipsychotics (Runyon and Carroll 2006). With the exception of the cortex, the primary responsible for regulating DA availability at the synaptic cleft is DAT (Runyon and Carroll 2006) (Leviel 2011). Indeed, DAT activity has been shown to play key roles in cognition, affect, behavioral reinforcement and motor function (Gainetdinov and Caron 2003; Volz and Schenk 2005). DAT density is lower in the frontal cortex in comparison to other dopaminergic areas (see table 1 and 2) because in cortex noradrenaline transporters (NET) and catechol-O-methyltransferase (COMT) are responsible for DA inactivation (Carboni et al. 1990) (Karoum et al. 1994) (Morón et al. 2002). While *de novo* DAT synthesis is a relative slow process (Kimmel et al. 2000), DAT function can be rapidly regulated by various post-translational mechanisms, of which the most predominant are those affecting its trafficking to the plasma membrane. DAT traffic is sensitive to: (1) DAT ligands (e.g. cocaine, GBR12909) or presynaptic G protein-coupled receptors (e.g. D₂-like receptors agonist/antagonist and k-opioid agonist); (2) second messenger-regulated enzymatic modifications (e.g. protein kinase C, protein kinase A, phosphatidylinositol-3-kinase, protein tyrosine kinase and mitogen-activated protein families); (3) protein-protein interactions, such as DAT and scaffolding proteins (Schmitt and Reith 2010).

Behavioral and neurochemical data suggest that 5HT_{2A/2C} serotonergic receptors and the glutamate system are central to alstonine antipsychotic-like effects (Herrmann et al. 2012); (Linck et al. 2012). Given the dopamine/serotonin and dopamine/glutamate crosstalk, alstonine ability to counteract D₂R receptors activation cannot be attributed solely to its

effects in DAT. The differences between *in vitro* and *ex vivo* effects of alstonine on DA uptake also point to an indirect modulation.

QAR was also used to assess alstonine effects on D₂R binding and density. Corroborating early results (Costa-Campos et al. 1998), this study shows that alstonine (*in vitro* or acute treatment) does not alter D₂R binding. Though evidence from various mice models indicates that alstonine modulates dopaminergic pathways, the lack of effects on D₂R binding correlates well with the findings that alstonine does not influence prolactin levels, amphetamine-induced stereotypy or climbing behavior (Costa-Campos et al. 1998); (Linck et al. 2011). Interestingly, alstonine-induced alterations in D₂R density was noted with subchronic administration in the CPu alone, where a modest (~17%) decrease was observed. Increased D₂R density has been reported for classic D₂R antagonists and atypical antipsychotics in the striatum (McCormick et al. 2010) (Tarazi et al. 2001), again placing alstonine apart from known antipsychotics.

The fact that alstonine consistently behaves as antipsychotic (in mouse models and as the main component of herbal medication) but lacks D₂R binding is certainly of note. There are about 40 different antipsychotics on the market and all of them block D₂R in some degree (Insel 2010) (Ellenbroek 2012). There are a few compounds with alleged antipsychotic-like effects on animal models that do not block D₂R receptors. The 5HT_{2C} agonist (vabicaserin) and ampakines (farampator and CX516) had their development interrupted at phase II, and the glycine transporter inhibitor (AMG 747) at phase I. Though other compounds lacking D₂R binding are being developed, including mGluR2/3 ligands, α_7 nicotine agonists and 5-HT₆ antagonists (Ellenbroek 2012), to the best of our knowledge there is not any that modulates DAT. As discussed above for DAT, influences of alstonine in serotonin and glutamate can ultimately modulate dopamine and its receptors, including D₂. Though dopaminergic system abnormalities presented in schizophrenia were not reproduced in this study (Shannon et al. 1991), it is conceivable that the effects seen on DAT and D₂R densities would be useful to restore homeostasis in an overactive dopamine pathway.

This study presents some limitations. Since QAR method requires a preincubation period in buffer to remove endogenous compounds (and maybe pharmacological treatment too), *ex vivo* techniques does not allow direct binding evaluation, and for this reason *in vitro* incubations were carried out. Receptor densities were properly assessed with *ex vivo* treatments. Moreover, a comprehensive pattern of alstonine effects on DA uptake can only be attained with kinetic and complementary studies; DA uptake could result from increased DAT activity, though drugs that increase transporter activity are currently unknown. Additionally, the stress inherent to a 7-day treatment schedule could have itself influenced DAT and D₂R density on QAR. The analysis is nevertheless validated by the use of controls in all experimental conditions.

Antipsychotics have changed the life prognosis of schizophrenic patients (Duval and Goldman 2000), though cognitive and negative symptoms are, sadly, hardly improved; (Lieberman et al. 2005); (McEvoy et al. 2006) (Keefe et al. 2007). Thus, the need for innovative treatments is consensual (Kim and Stahl 2010). We here provide additional evidence that alstonine does not block D₂R but modulates dopamine transmission in a manner and at regions relevant for schizophrenia; data suggest that DAT modulation is involved in dopamine modulation by alstonine. To the best of our knowledge, there are no known drugs that stimulate DA uptake, in principle a mechanism adequate to the desired attenuation of postsynaptic dopamine receptor activation, but potentially devoid of the unwanted side effects associated with direct blockade of these receptors. As pointed out by Howes and Kapur (Howes and Kapur 2009) the primary defect in dopamine transmission in schizophrenia is presynaptic in nature, despite the fact that schizophrenia has been treated for nearly a century with drugs that primarily interfere with postsynaptic receptors. Regulating dopamine uptake could be an entirely different approach in this context.

Due to the complexity of schizophrenia underlying neurobiology, multiple-target drugs are suggested to possess a better profile as antipsychotics (Roth et al. 2004) (Kim and Stahl 2010) (Wong et al. 2010). In addition to the already identified participation of 5HT_{2A/C}

receptors and glutamate, the indirect effects of alstonine on dopamine transmission contribute to its overall antipsychotic-like effects, in overall an innovative antipsychotic mechanism. Taken into consideration that alstonine was originally identified as the major component of homemade remedies used to treat “madness” in rural Nigeria (Costa-Campos et al. 1999) (Elisabetsky and Costa-Campos 2006), our study is in line with the historical contribution of natural products to the development of prototypic drugs.

5. Acknowledgements

The authors are thankful to CNPq for fellowships. This work was supported by CNPq (490493/2008-4) and by PRONEX N^o 10/0031-1. We also are pleased to the skillful technical assistance of Mrs. Susana Buglione.

6. References

- Abi-Dargham A (2004) Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1: S1-5.
- Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113: 296-320.
- Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, Tarazi FI, Antonelli MC (2002) Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. *Neurochem Res* 27: 1525-33.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990) Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* 55: 1067-70.
- Carlsson A (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1: 179-86.
- Chavez C, Hollaus M, Scarr E, Pavey G, Gogos A, van den Buuse M (2010) The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. *Brain Res* 1321: 51-9.
- Correll CU (2011) What are we looking for in new antipsychotics? *J Clin Psychiatry* 72 Suppl 1: 9-13.
- Costa-Campos L, Dassoler SC, Rigo AP, Iwu M, Elisabetsky E (2004a) Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 481-9.

- Costa-Campos L, Elisabetsky E, Lara DR, Carlson TJ, King SR, Ubillas R, Nunes DS, Iwu MM, Nkemjika CO, Ozioko A, Agwu CO (1999) Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. *An Acad Bras Cienc* 71: 189-201.
- Costa-Campos L, Iwu M, Elisabetsky E (2004b) Lack of pro-convulsant activity of the antipsychotic alkaloid alstonine. *J Ethnopharmacol* 93: 307-10.
- Costa-Campos L, Lara DR, Nunes DS, Elisabetsky E (1998) Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 133-41.
- de Moura Linck V, Herrmann AP, Goerck GC, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky E (2008) The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 1449-1452.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E (2008) Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res* 172: 45-71.
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, Esposito E (2008) Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog Brain Res* 172: 7-44.
- Duval AM, Goldman D (2000) The new drugs (chlorpromazine & reserpine): administrative aspects. 1956. *Psychiatr Serv* 51: 327-31.
- Elisabetsky E, Costa-Campos L (2006) The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 3: 39-48.
- Ellenbroek BA (2012) Psychopharmacological treatment of schizophrenia: What do we have, and what could we get? *Neuropharmacology* 62: 1371-80.
- Fink KB, Göthert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 59: 360-417.
- Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR (1999) Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Eur J Pharmacol* 382: 45-9.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2007) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Inc.
- Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 261-84.
- Herrmann AP, Lunardi P, Pilz LK, Linck VM, Okunji CO, Gonçalves CA, Elisabetsky E (2012) Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices. *Neurochem Int*: *in press*.
- Howes OD, Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 35: 549-62.
- Huttunen J, Heinimaa M, Svirskis T, Nyman M, Kajander J, Forsback S, Solin O, Ilonen T, Korkeila J, Ristkari T, McGlashan T, Salokangas RK, Hietala J (2008) Striatal dopamine synthesis in first-degree relatives of patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 63: 114-7.
- Insel TR (2010) Rethinking schizophrenia. *Nature* 468: 187-93.
- Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF (1994) 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *J Neurochem* 63: 972-9.

- Keefe RS, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, Palmer BW, Gold JM, Meltzer HY, Green MF, Capuano G, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Davis CE, Hsiao JK, Lieberman JA, Investigators C, Group NW (2007) Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry* 64: 633-47.
- Kim DH, Stahl SM (2010) Antipsychotic drug development. *Curr Top Behav Neurosci* 4: 123-39.
- Kimmel HL, Carroll FI, Kuhar MJ (2000) Dopamine transporter synthesis and degradation rate in rat striatum and nucleus accumbens using RTI-76. *Neuropharmacology* 39: 578-85.
- Leviel V (2011) Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences. *J Neurochem* 118: 475-89.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK (2005) Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353: 1209-23.
- Linck VM, Bessa MM, Herrmann AP, Iwu MM, Okunji CO, Elisabetsky E (2012) 5-HT_{2A/C} receptors mediate the antipsychotic-like effects of alstonine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 36: 29-33.
- Linck VM, Herrmann AP, Piato AL, Detanico BC, Figueiró M, Flório J, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky E (2011) Alstonine as an Antipsychotic: Effects on Brain Amines and Metabolic Changes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 1-7.
- McCormick PN, Kapur S, Graff-Guerrero A, Raymond R, Nobrega JN, Wilson AA (2010) The antipsychotics olanzapine, risperidone, clozapine, and haloperidol are D₂-selective *ex vivo* but not *in vitro*. *Neuropsychopharmacology* 35: 1826-35.
- McEvoy JP, Lieberman JA, Stroup TS, Davis SM, Meltzer HY, Rosenheck RA, Swartz MS, Perkins DO, Keefe RS, Davis CE, Severe J, Hsiao JK, Investigators C (2006) Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment. *Am J Psychiatry* 163: 600-10.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1159-72.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 238-46.
- Millan MJ, Dekeyne A, Gobert A (1998) Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex *in vivo*. *Neuropharmacology* 37: 953-5.
- Miyake N, Thompson J, Skinbjerg M, Abi-Dargham A (2011) Presynaptic dopamine in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* 17: 104-9.
- Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22: 389-95.
- Okunji CO, Iwu MM, Ito Y (2005) Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 28: 775-783.

- Pandolfo P, Silveirinha V, dos Santos-Rodrigues A, Venance L, Ledent C, Takahashi RN, Cunha RA, Köfalvi A (2011) Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur J Pharmacol* 655: 38-45.
- Roth B, Sheffler D, Kroeze W (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3: 353-9.
- Ruiu S, Marchese G, Saba PL, Gessa GL, Pani L (2000) The 5-HT₂ antagonist ritanserin blocks dopamine re-uptake in the rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 5: 673-7.
- Runyon SP, Carroll FI (2006) Dopamine transporter ligands: recent developments and therapeutic potential. *Curr Top Med Chem* 6: 1825-43.
- Schmitt KC, Reith ME (2010) Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1187: 316-40.
- Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, De Loore K, Leysen JE (1996) Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* 124: 57-73.
- Shannon HE, Bemis KG, Peters SC (1991) Potency and efficacy of dopamine agonists in mouse strains differing in dopamine cell and receptor number. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 103-7.
- Stahl SM (2008) *Antipsychotics and Mood Stabilizers*. Cambridge University Press, New York, USA
- Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ (2001) Long-term effects of olanzapine, risperidone, and quetiapine on dopamine receptor types in regions of rat brain: implications for antipsychotic drug treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 711-7.
- Volz TJ, Schenk JO (2005) A comprehensive atlas of the topography of functional groups of the dopamine transporter. *Synapse* 58: 72-94.
- Wong EH, Tarazi FI, Shahid M (2010) The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action. *Pharmacol Ther* 126: 173-85.

PARTE III

3. Discussão

Esta tese teve como objetivo principal dar segmento à caracterização do alcalóide alstonina como antipsicótico, colaborando para a elucidação do seu mecanismo de ação com ênfase nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico.

No primeiro trabalho (capítulo 1) o objetivo foi avaliar se os receptores 5HT_{2A/C} eram relevantes para o efeito tipo antipsicótico de alstonina, já que estes tinham sido identificados como responsáveis pelo seu efeito ansiolítico (Costa-Campos et al. 2004). Como se considerava relevante que o efeito ansiolítico seria relevante para a melhora de sintomas negativos obtida com alguns antipsicóticos (Benvenha e Leander 1995; Cao e Rodgers 1997), cabia verificar se estes receptores também estavam envolvidos no efeito antipsicótico da alstonina de modo geral. Por isso foram usados modelos animais relevantes para sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia e o pré-tratamento com ritanserina para bloquear os receptores 5HT_{2A/C}. Ritanserina preveniu o efeito de alstonina em todos os comportamentos, sugerindo que os receptores 5HT_{2A/C} são necessários para os efeitos tipo antipsicótico de alstonina. Sendo ritanserina um antagonista não-seletivo não foi possível avaliar, naquele momento, a contribuição individual de cada subtipo de receptor, ou sequer se ambos eram de fato necessários.

Ainda nesse capítulo demonstramos pela primeira vez que alstonina é capaz de prevenir em animais o déficit de memória de trabalho, um déficit cognitivo relevante à esquizofrenia. Os sintomas cognitivos surgem, geralmente, antes do primeiro surto psicótico (Erlenmeyer-Kimling 2000; Niendam et al. 2003) e persistem durante todo o curso da doença (Reichenberg 2010). A memória de trabalho, juntamente com velocidade de processamento, memória episódica, e função

executiva, são os principais domínios da função cognitiva afetados na esquizofrenia (Barch 2005; Schaub et al. 2011). O fato de alstonina ser efetiva no modelo de déficit de memória de trabalho induzido por MK801, um dos modelos com melhor valor preditivo quanto aos déficits cognitivos, foi um acréscimo importante na construção de seu perfil antipsicótico. O resultado é relevante para a seleção de critérios de observação para futuros estudos clínicos e comparação com compostos conhecidos, já que os déficits cognitivos são um dos principais responsáveis pela incapacitação de pacientes esquizofrênicos (Goff et al. 2011), e os antipsicóticos hoje disponíveis produzem pouca ou nenhuma melhora dos sintomas cognitivos (Gardner et al. 2005; Keefe et al. 2007).

O caráter atípico dos novos antipsicóticos está relacionado exatamente com razão da afinidade D2/5HT_{2A}, diferindo dos clássicos tanto pela sua menor afinidade a D2 quanto a sua atuação em 5HT_{2A} (Meltzer et al. 2003). Já os agonistas de receptores 5HT_{2C} vem sendo propostos como uma alternativa para diminuir a atividade dopaminérgica límbica sem bloqueio de receptores D2 (Kim 2010). Era, portanto importante esclarecer que tipos de receptores serotoninérgicos (5HT_{2A}, 5HT_{2C} ou os dois) são relevantes para a ação de alstonina. Assim o objetivo do segundo trabalho (capítulo 2) foi avaliar individualmente a relevância dos receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} sobre o efeito tipo antipsicótico de alstonina. A estratégia escolhida foi usar antagonistas seletivos para receptores 5HT_{2A} (altanserina) e 5HT_{2C} (SB 242084) no mesmo modelo de hiperlocomoção induzida por MK801.

Os dois antagonistas bloquearam o efeito de alstonina neste modelo de sintoma positivo, sugerindo que ambos são necessários para a atividade de alstonina. O dado é consistente com a demonstração, obtida por experimentos realizados em paralelo, de que altanserina e SB 242084 previnem o efeito inibitório

de alstonina sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais agudas (Herrmann et al. 2012).

No entanto uma prova mais direta da interação de alstonina com estes receptores era desejável. A técnica de autorradiografia foi escolhida pela vantagem de permitir o estudo concomitante da interação de alstonina com estes receptores (e outros) em várias regiões do cérebro. Os resultados obtidos com autorradiografia quantitativa com incubação *in vitro* permitiram concluir que alstonina se liga a receptores 5HT_{2A} (deslocamento de [³H]ketanserina) mas não a receptor 5HT_{2C}, pelo menos não no mesmo sítio de ligação do antagonista seletivo de [³H]mesulergina. Já nos estudos *ex vivo* (animais tratados com alstonina nas mesmas doses ativas em modelos comportamentais) vimos ainda que enquanto o tratamento agudo com alstonina não modificou a densidade de nenhum dos receptores, o tratamento sub-crônico modificou a densidade de ambos de maneira distinta nas várias regiões analisadas. Especificamente a densidade de receptor 5HT_{2A} foi diminuída no mPFC no NAc (centro e concha), e foi aumentada no CPu lateral. A densidade do receptor 5HT_{2C} foi diminuída apenas no mPFC e aumentada no NAc (shell) e nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Esse conjunto de resultados indica que alstonina liga-se diretamente no receptor 5HT_{2A}, mas modula indiretamente o receptor 5HT_{2C} reiterando a idéia de que ambos são relevantes para sua ação.

A modulação da densidade de receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} é peculiar, já que tanto agonistas, agonistas inversos e antagonistas podem produzir *down-regulation* (Gray e Roth 2001; Devlin et al. 2004; Allen e Roth 2011). Assim, os efeitos observados nos receptores após tratamento sub-crônico demonstram apenas que esses receptores são modulados por alstonina, mas a natureza dessa modulação não pode ser concluída. Estudo de ligação (*binding*) funcional como mensuração de

segundos mensageiros e técnica de GTPgamaS seriam uma estratégia adequada para obter essa resposta. No entanto, cabe notar que já havíamos visto que a administração aguda de alstonina aumenta os níveis de serotonina e de seu metabólito 5HIAA no córtex frontal e apenas 5HIAA em estriado de camundongos (Linck et al. 2011). O mecanismo pelos quais alstonina aumenta a transmissão serotoninérgica ainda não está bem claro, mas se exclui um aumento somente de liberação já que a quantidade total de serotonina está aumentada e a técnica utilizada não faz distinção entre as intra e extra-sinapse. O aumento de serotonina poderia explicar a modulação do receptor $5HT_{2C}$, mas não se pode excluir que alstonina atue nesse receptor como modulador alostérico ligando-se em um sítio diferente que o da mesulergina.

Os receptores serotoninérgicos são relevantes na atenuação dos comportamentos induzidos por antagonistas não competitivos de receptores NMDA (NMDAR) (fenciclidina, cetamina, MK801). O aumento de liberação de serotonina induzido por antagonistas NMDA parece ser crucial para a hiperlocomoção e especula-se ainda que esse aumento seja responsável pelo aumento de dopamina (Schmidt e Fadayel 1996). De acordo com essa hipótese, a hiperlocomoção induzida por antagonistas NMDAR é atenuada por drogas que possuam atividade serotoninérgica, especialmente por antagonistas $5HT_{2A}$ como os antipsicóticos atípicos. Agonistas de receptores $5HT_{1A}$ e $5HT_{2C}$ também são capazes de prevenir a hiperlocomoção induzida por antagonista NMDAR e são apontados como novos alvos para o desenvolvimento de antipsicóticos (Meltzer et al. 2011). Sendo o efeito de alstonina consistentemente prevenido pela administração de antagonistas de receptores $5HT_{2A}$ e $5HT_{2C}$ esta poderia atuar como agonista ou agonista inverso desses receptores. Como agonistas $5HT_{2A}$ são frequentemente alucinógenos e os

antipsicóticos em clínica são em geral antagonistas ou agonistas inversos de 5HT_{2A}, sugere-se que alstonina atue como agonista inverso de receptores 5HT_{2A}.

Sabe-se que agonistas inversos 5HT_{2A} podem aumentar a liberação de dopamina nas vias mesocortical e nigroestriatal, já que nessas vias os receptores 5HT_{2A} possuem uma atividade inibitória basal sobre a atividade dopaminérgica. Já os receptores 5HT_{2C}, quando estimulados levam a diminuição da transmissão em todas as vias dopaminérgicas (Stahl 2008; Kim and Stahl 2010). Pelos resultados obtidos com alstonina e os possíveis efeitos sobre os receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C}, pode-se especular que ela possa: diminuir a dopamina em áreas mesolímbicas (estimulação 5HT_{2C}), e pouco alterar dopamina nas áreas estriatais e corticais já que as consequências de um agonista inverso de 5HT_{2A} seriam contrabalançadas pela atuação como estimulador 5HT_{2C} nestas áreas. Cabe notar que apesar de especulativo, a sugestão é compatível com o resultado de modelos animais de sintomas positivo e negativo. Os efeitos da administração aguda de alstonina sobre o sistema serotoninérgico são ilustrados na figura 4.

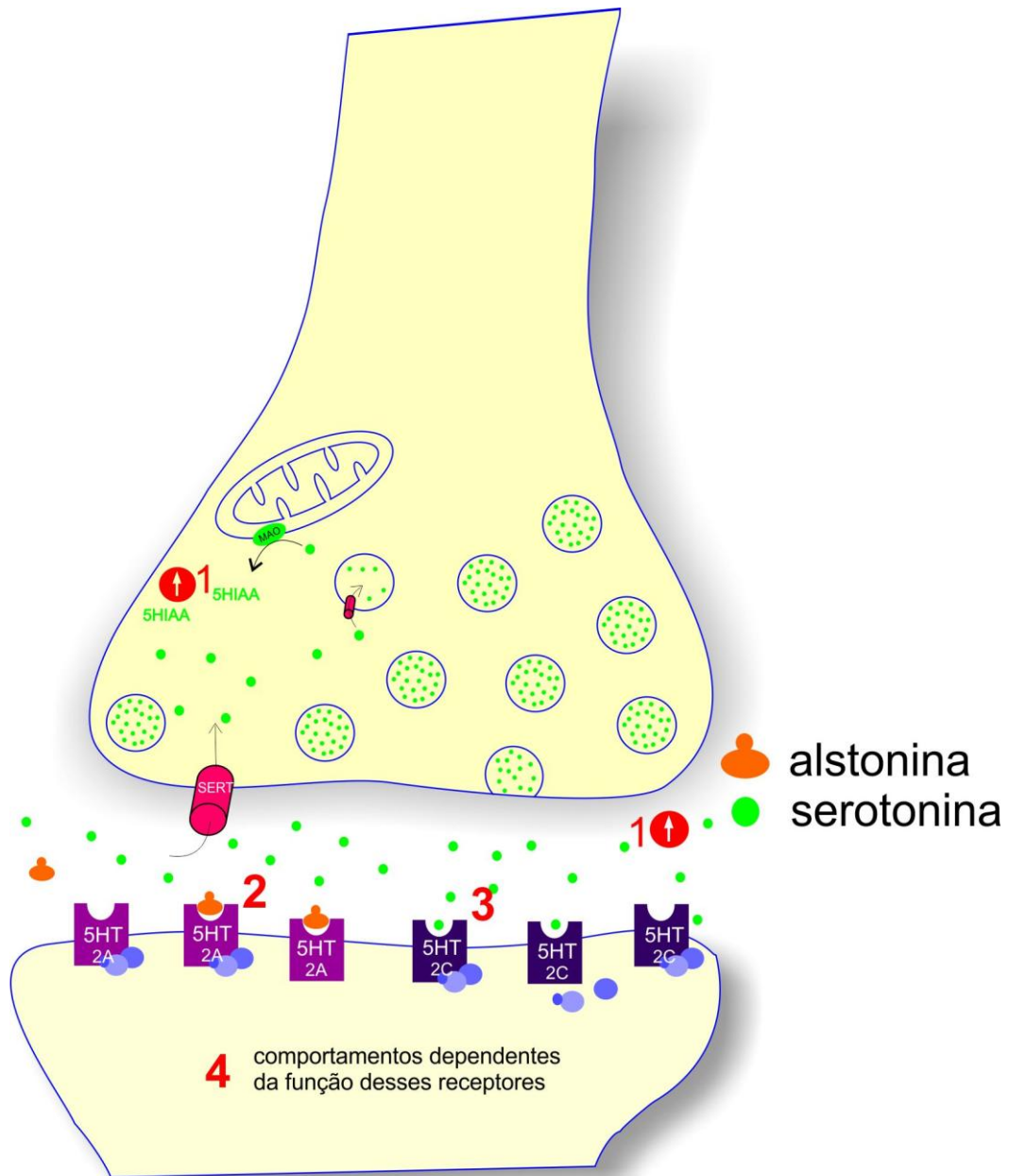


Figura 4: Ações do tratamento agudo com alstonina sobre a transmissão serotonérgica de camundongos. 1) Alstonina aumenta os níveis de serotonina e de 5HIAA; **2)** Alstonina liga em receptores 5HT_{2A}; **3)** Alstonina modula indiretamente os receptores 5HT_{2C}; **4)** Os comportamentos mediados por alstonina são dependentes dos receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C}

Investigar o efeito de alstonina no sistema dopaminérgico foi objetivo do capítulo 3. Demonstramos anteriormente que o tratamento agudo com alstonina produz um aumento nos níveis do metabólito intraneuronal de dopamina, DOPAC, sem alterar o metabólito extraneuronal HVA, em córtex frontal e estriado de camundongo (Linck et al. 2011). Explicações possíveis para estes resultados incluem aumento na captação de dopamina, estimulação de DAT ou ainda aumento da função da MAO, ainda que se trate de um mecanismo de ação compatível com a noção de droga protótipo. Por essa razão, avaliamos o efeito de alstonina sobre a captação sinaptossomal de dopamina bem como seus efeitos sobre a densidade do DAT.

A incubação *in vitro* de sinaptossomas (estriado, camundongos) com alstonina na concentração de 100 μ M inibiu a captação de [3 H]dopamina, assim como clozapina. No entanto, quando alstonina foi administrada agudamente a captação (*ex vivo*) de [3 H]dopamina foi aumentada em 109%; no mesmo ensaio a clozapina produziu um pequeno aumento não significativo. Após sete dias de tratamento a captação de dopamina não foi afetada por nenhuma das drogas, provavelmente por dessensibilização do sistema já que a transmissão dopaminérgica basal dos camundongos utilizados é normal e o sistema tende a voltar à homeostase (Shannon et al. 1991). O fato de alstonina inibir a captação *in vitro* e estimulá-la *ex vivo* pode ser explicado por vários fatores. A principal variável é que no modelo *in vitro* avalia-se o efeito direto de alstonina no sinaptossoma/transportador, enquanto que no modelo *ex vivo* estão atuantes as modulações por outros sistemas (ex. serotonina e glutamato). Sabe-se que a densidade de DAT na membrana pré-sináptica pode ser rapidamente alterada, sendo modulada por diversos receptores e neuromediadores (Schmitt e Reith 2010).

O importante, no entanto, é que o mecanismo tipo antipsicótico de alstonina bem como os efeitos observados sobre os níveis de DOPAC são obtidos após administração aguda e na mesma dose onde o aumento da captação foi observado. Dessa forma é possível alegar que a captação de dopamina esteja aumentada após administração aguda de alstonina e que este aumento seja possivelmente o responsável pelo aumento do metabólito intraneuronal de dopamina (DOPAC). A facilitação da retirada de dopamina da fenda sináptica pode também ter relevância para os efeitos comportamentais de alstonina observados 30 minutos após administração aguda.

Quanto ao DAT, a incubação *in vitro* com alstonina não modificou a ligação do inibidor seletivo [³H]GBR12935 sugerindo que alstonina não liga-se diretamente em DAT (pelo menos no mesmo sítio que o inibidor). Curiosamente, clozapina *in vitro* na mesma concentração em que inibiu a captação de [³H]dopamina inibiu a ligação de [³H]GBR12935 demonstrando afinidade pelo mesmo sítio de ligação. Em relação aos dados obtidos *ex vivo*, enquanto o alstonina agudamente não produziu nenhuma modificação na densidade dos DAT, o tratamento sub-crônico diminuiu a densidade de DAT o que corrobora a sugestão que o sistema sofra adaptações e seja consistente com o retorno aos níveis do controle na captação de [³H]dopamina após sete dias de tratamento.

Neste trabalho investigamos ainda se alstonina liga-se a receptores D2 ou modula sua densidade. A incubação *in vitro* com alstonina não modificou a ligação do antagonista específico [3H]nemonapride indicando que alstonina não bloqueia diretamente receptores D2. Validando o nosso ensaio clozapina inibiu a ligação de [3H]nemonapride em todas as regiões cerebrais analisadas. O tratamento agudo com alstonina não alterou a densidade de receptores D2, e apenas o tratamento

sub-crônico na dose de 1.0 mg/kg diminuiu a quantidade de receptores no CPu lateral e medial. Trabalhos anteriores sugeriram que alstonina de fato não atuasse como antagonista de receptores D2 (Costa-Campos et al. 1998). Os resultados do capítulo 3 definem esta questão, o que é relevante já que todos os antipsicóticos disponíveis na clínica bloqueiam os receptores D2 de alguma maneira (Ellenbroek 2012), e estão relacionados com os conhecidos efeitos colaterais produzidos por esse bloqueio. A ausência de afinidade por receptores D2 reveste de maior importância o papel fundamental dos receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} no mecanismo de ação de alstonina. É, no entanto, evidente que outros mecanismos também contribuem para o efeito tipo antipsicótico de alstonina, como o aumento da captação de dopamina, aumento dos níveis de serotonina (Linck et al. 2011) e inibição da captação de glutamato (Herrmann et al. 2012). Os efeitos da administração aguda de alstonina sobre o sistema dopaminérgico são ilustrados na figura 5.

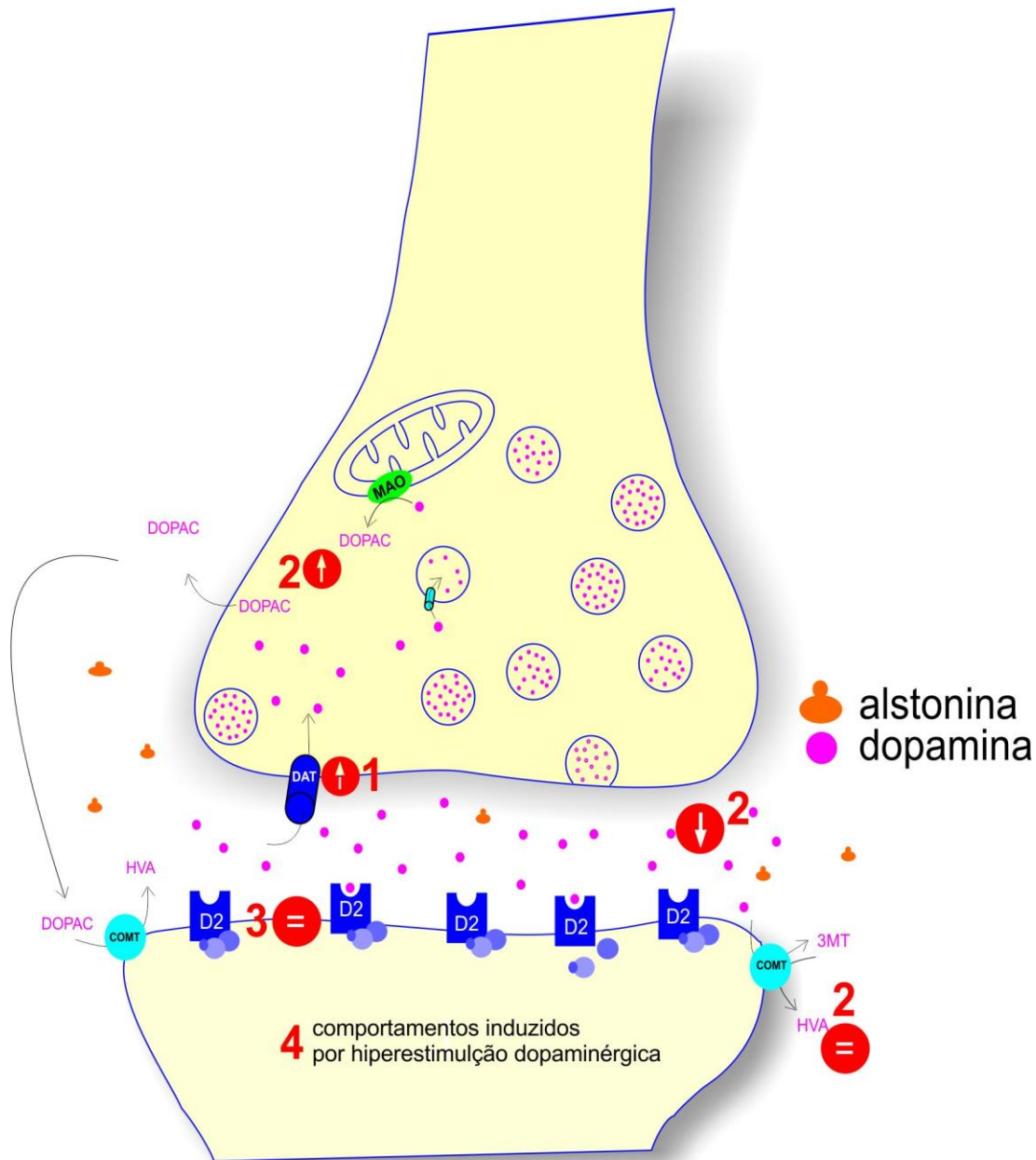


Figura 5: Ações do tratamento agudo com alstonina sobre a transmissão dopaminérgica de camundongos. 1) Alstonina aumenta a captação de dopamina; **2)** Alstonina aumenta os níveis de DOPAC, diminui os níveis de DA e não altera os níveis de HVA; **3)** Alstonina não liga em receptores D2; **4)** Alstonina modifica comportamentos relacionados a ativação dopaminérgica.

A edição da revista Nature de 11 de novembro de 2010 foi dedicada à esquizofrenia. Em um dos artigos Thomas R. Insel faz a seguinte pergunta: “Como veremos a esquizofrenia em 2030?” A resposta, claro, ainda não sabe, mas o que vemos hoje é que após um século de pesquisas o que sabemos sobre a esquizofrenia é muito pouco. A etnofarmacologia é uma ferramenta útil na obtenção de novos fármacos principalmente em doenças cuja patofisiologia não estão totalmente esclarecidas, como a esquizofrenia, já que nesses casos o desenho racional de fármacos fica impossibilitado sem a definição de um alvo específico (Elisabetsky 2002). Além disso, 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 efetividade (eficácia/toxicidade) das substâncias ativas presentes.

4. Conclusão

Ao contrário de todos os antipsicóticos disponíveis na clínica, os nossos resultados mostram que alstonina não possui afinidade por receptores dopaminérgicos D2. Ainda que preliminares, os nossos dados mostram que alstonina aumenta a captação de dopamina, constituindo um importante mecanismo de controle da concentração de dopamina na fenda sináptica. Já os receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} e 5HT_{2C} estão claramente envolvidos no mecanismo de ação de alstonina e estão de acordo com seus efeitos comportamentais.

Ainda que haja lacunas no conhecimento do mecanismo de ação de alstonina, que precisa, portanto ainda ser melhor avaliado, este parece tratar-se de um mecanismo inovador. Estudos como este abrem novas possibilidades para o tratamento da esquizofrenia já que ainda que esse alcalóide não seja eventualmente

utilizado na clínica como tal, seu mecanismo de ação pode servir de protótipo para novas drogas.

5. Perspectivas

São relevantes para a continuidade deste trabalho as seguintes possibilidades:

1. Avaliar a natureza da ligação de alstonina a receptores 5HT_{2A} através de técnicas de *binding* funcional (GTPgamaS) e avaliação dos intermediários da cascata de sinalização desses receptores;
2. Determinação da afinidade de alstonina pelos receptores 5HT_{2A} utilizando ensaios de deslocamento de ligante radioativo;
3. Dosagens dos níveis de serotonina e metabólitos e dopamina e metabólitos após administração de alstonina *in vivo* por técnica de microdiálise;
4. Estudo da cinética envolvida no efeito de alstonina sobre o transportador de dopamina;
5. Avaliar se alstonina afeta o imunoconteúdo do transportador de dopamina, bem como as possíveis vias de modulação desse transportador;
6. Realizar a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de alstonina;
7. Realizar a avaliação toxicológica aguda e crônica de alstonina;
8. Buscar alternativas para obtenção desse alcalóide, como a síntese total ou parcial, possibilitando assim a investigação clínica e a busca de derivados.

Referências

- Abi-Dargham A (2004) Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1: S1-5.
- Abi-Dargham A (2007) Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78: 133-64.
- Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M, van Dyck CH, Charney DS, Innis RB, Laruelle M (1998) Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry* 155: 761-7.
- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8104-9.
- Adityanjee, Aderibigbe YA, Theodoridis D, Vieweg VR (1999) Dementia praecox to schizophrenia: the first 100 years. *Psychiatry Clin Neurosci* 53: 437-48.
- Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113: 296-320.
- Allen JA, Roth BL (2011) Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 117-44.
- Andreasen NC (1994) The mechanisms of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 4: 245-51.
- Andreasen NC (2000) Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 106-12.
- Association AP (2002) Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – DSM-IV-TR., 4ªED. edn. Artmed, Porto Alegre
- Baldessarini RJ, Tarazi FI (1996) Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry* 3: 301-25.
- Ban TA (2007) Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3: 495-500.
- Barch DM (2005) The cognitive neuroscience of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 1: 321-53.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63: 182-217.
- Benvenga MJ, Leander JD (1995) Olanzapine, an atypical antipsychotic, increases rates of punished responding in pigeons. *Psychopharmacology (Berl)* 119: 133-8.
- Berkowitz RL, Patel U, Ni Q, Parks JJ, Docherty JP (2011) The impact of the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) on prescribing practices: an analysis of data from a large midwestern state. *J Clin Psychiatry*.
- Bhanji NH, Margolese HC, Chouinard G, Turnier L (2003) Late-onset agranulocytosis in a patient with schizophrenia after 17 months of clozapine treatment. *J Clin Psychopharmacol* 23: 522-3.

- Borges CF, Baptista TW (2008) [The mental health care model in Brazil: a history of policy development from 1990 to 2004]. *Cad Saude Publica* 24: 456-68.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D (1997) Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2569-74.
- Brown A, Patterson PH (2011) Maternal Infection and Schizophrenia: Implications for Prevention. *Schizophrenia Bulletin* 37(2): 284–290.
- Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ (1996) 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 15: 442-55.
- Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ (1997) [³H]WAY-100635 for 5-HT_{1A} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [³H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem Int* 30: 565-74.
- Cao BJ, Rodgers RJ (1997) Dopamine D₄ receptor and anxiety: behavioural profiles of clozapine, L-745,870 and L-741,742 in the mouse plus-maze. *Eur J Pharmacol* 335: 117-25.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990) Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* 55: 1067-70.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 237-60.
- Costa-Campos L, Dassoler S, Rigo A, Iwu M, Elisabetsky E (2004) Anxiolytic properties of the antipsychotic alkaloid alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 481-9.
- Costa-Campos L, Elisabetsky E, Lara D, Carlson T, King S, Ubillas R, Nunes D, Iwu M, Nkemjika C, Ozioko A, Agwu C (1999) Antipsychotic profile of alstonine: ethnopharmacology of a traditional Nigerian botanical remedy. *An Acad Bras Cienc* 71: 189-201.
- Costa-Campos L, Lara D, Nunes D, Elisabetsky E (1998) Antipsychotic-like profile of alstonine. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 133-41.
- Cragg SJ, Rice ME (2004) DAncing past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27: 270-7.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192: 481-3.
- Crilly J (2007) The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. *Hist Psychiatry* 18: 39-60.
- Curzon G (1990) How reserpine and chlorpromazine act: the impact of key discoveries on the history of psychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 11: 61-3.

- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148: 1474-86.
- de Moura Linck V, Herrmann A, Goerck G, Iwu M, Okunji C, Leal M, Elisabetsky E (2008) The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32.
- Devlin MG, Smith NJ, Ryan OM, Guida E, Sexton PM, Christopoulos A (2004) Regulation of serotonin 5-HT_{2C} receptors by chronic ligand exposure. *Eur J Pharmacol* 498: 59-69.
- Di Forti M, Lappin JM, Murray RM (2007) Risk factors for schizophrenia--all roads lead to dopamine. *Eur Neuropsychopharmacol* 17 Suppl 2: S101-7.
- Duval AM, Goldman D (2000) The new drugs (chlorpromazine & reserpine): administrative aspects. 1956. *Psychiatr Serv* 51: 327-31.
- Ebdrup BH, Rasmussen H, Arnt J, Glenthøj B (2011) Serotonin 2A receptor antagonists for treatment of schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs* 20: 1211-23.
- Elisabetsky E (2002) Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. In: Iwu M, Wooton J (eds) *Ethnomedicine and Drug Development Advances in Phytomedicine Series Elsevier Science, Amsterdam*, pp 133-144
- Elisabetsky E, Costa-Campos L (2006) The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 3: 39-48.
- Ellenbroek BA (2012) Psychopharmacological treatment of schizophrenia: What do we have, and what could we get? *Neuropharmacology* 62: 1371-80.
- Erlenmeyer-Kimling L (2000) Neurobehavioral deficits in offspring of schizophrenic parents: liability indicators and predictors of illness. *Am J Med Genet* 97: 65-71.
- Ferreira ABdH (2009) *Novo dicionário Aurélio da Língua Portuguesa* Editora Positivo
- Fink KB, Göthert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 59: 360-417.
- Folsom DP, Hawthorne W, Lindamer L, Gilmer T, Bailey A, Golshan S, Garcia P, Unützer J, Hough R, Jeste DV (2005) Prevalence and risk factors for homelessness and utilization of mental health services among 10,340 patients with serious mental illness in a large public mental health system. *Am J Psychiatry* 162: 370-6.
- Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 261-84.
- Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P (2005) Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ* 172: 1703-11.
- Geyer MA, Vollenweider FX (2008) Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends Pharmacol Sci* 29: 445-53.
- Goff DC, Hill M, Barch D (2011) The treatment of cognitive impairment in schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 245-53.
- Grauer SM, Graf R, Navarra R, Sung A, Logue SF, Stack G, Huselton C, Liu Z, Comery TA, Marquis KL, Rosenzweig-Lipson S (2009) WAY-163909, a 5-

- HT2C agonist, enhances the preclinical potency of current antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 204: 37-48.
- Gray JA, Roth BL (2001) Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56: 441-51.
- Gray JA, Roth BL (2007) Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 33: 1100-19.
- Gurevich EV, Joyce JN (1997) Alterations in the cortical serotonergic system in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry* 42: 529-45.
- Hashimoto K (2011) Glycine transporter-1: a new potential therapeutic target for schizophrenia. *Curr Pharm Des* 17: 112-20.
- Hayashi-Takagi A, Sawa A (2010) Disturbed synaptic connectivity in schizophrenia: convergence of genetic risk factors during neurodevelopment. *Brain Res Bull* 83: 140-6.
- Heckert U, Andrade L, Alves MJ, Martins C (1999) Lifetime prevalence of mental disorders among homeless people in a southeast city in Brazil. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249: 150-5.
- Herrmann AP, Lunardi P, Pilz LK, Linck VM, Okunji CO, Gonçalves CA, Elisabetsky E (2012) Effects of haloperidol, clozapine and the putative antipsychotic alstonine on glutamate uptake in acute hippocampal slices *Neurochem Int* submetido.
- Hietala J, Syvälahti E, Vilkmann H, Vuorio K, Rääköläinen V, Bergman J, Haaparanta M, Solin O, Kuoppamäki M, Eronen E, Ruotsalainen U, Salokangas RK (1999) Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. *Schizophr Res* 35: 41-50.
- Howes OD, Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull* 35: 549-62.
- Huttunen J, Heinimaa M, Svirskis T, Nyman M, Kajander J, Forsback S, Solin O, Ilonen T, Korkeila J, Ristkari T, McGlashan T, Salokangas RK, Hietala J (2008) Striatal dopamine synthesis in first-degree relatives of patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 63: 114-7.
- Insel TR (2010) Rethinking schizophrenia. *Nature* 468: 187-93.
- Joyce JN (2001) Dopamine D3 receptor as a therapeutic target for antipsychotic and antiparkinsonian drugs. *Pharmacol Ther* 90: 231-59.
- Joyce JN, Millan MJ (2005) Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today* 10: 917-25.
- Joyce JN, Shane A, Lexow N, Winokur A, Casanova MF, Kleinman JE (1993) Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 8: 315-36.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2003) *Princípios da neurociência*. Manole Ltda., São Paulo
- Kane JM, Correll CU (2010) Past and present progress in the pharmacologic treatment of schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 71: 1115-24.

- Kapur S, Mamo D (2003) Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1081-90.
- Keefe R, Bilder R, Davis S, Harvey P, Palmer B, Gold J, Meltzer H, Green M, Capuano G, Stroup T, McEvoy J, Swartz M, Rosenheck R, Perkins D, Davis C, Hsiao J, Lieberman J, Investigators C, Group NW (2007) Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch Gen Psychiatry* 64: 633-47.
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Frankle WG, Gil R, Cooper TB, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Haber SN, Laruelle M (2010) Increased synaptic dopamine function in associative regions of the striatum in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67: 231-9.
- Kim DH, Stahl SM (2010) Antipsychotic drug development. *Curr Top Behav Neurosci* 4: 123-39.
- King LJ (1999a) A brief history of psychiatry: millennia past and present--part II. *Ann Clin Psychiatry* 11: 47-54.
- King LJ (1999b) A brief history of psychiatry: millennia past and present--part III. *Ann Clin Psychiatry* 11: 99-107.
- King LJ (1999c) A brief history of psychiatry: millennia past and present. *Ann Clin Psychiatry* 11: 3-12.
- Kivircik Akdede BB, Alptekin K, Kitiş A, Arkar H, Akvardar Y (2005) Effects of quetiapine on cognitive functions in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 233-8.
- Kristiansen L, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff J (2007) NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 7: 48-55.
- Labrie V, Roder JC (2010) The involvement of the NMDA receptor D-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 351-72.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toti R, Weinberger DR, Kleinman JE (1993) Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry* 50: 810-8.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9235-40.
- Leviel V (2011) Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences. *J Neurochem* 118: 475-89.
- Lieberman J, Stroup T, McEvoy J, Swartz M, Rosenheck R, Perkins D, Keefe R, Davis S, Davis C, Lebowitz B, Severe J, Hsiao J, Investigators CATIE (2005) Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353: 1209-23.
- Linck VM, Herrmann AP, Piato AL, Detanico BC, Figueiró M, Flório J, Iwu MM, Okunji CO, Leal MB, Elisabetsky E (2011) Alstonine as an Antipsychotic: Effects on

- Brain Amines and Metabolic Changes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 1-7.
- Mari JJ, Leitão RJ (2000) A epidemiologia da esquizofrenia. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 22: 15-17.
- Marquis KL, Sabb AL, Logue SF, Brennan JA, Piesla MJ, Comery TA, Grauer SM, Ashby CR, Nguyen HQ, Dawson LA, Barrett JE, Stack G, Meltzer HY, Harrison BL, Rosenzweig-Lipson S (2007) WAY-163909 [(7bR,10aR)-1,2,3,4,8,9,10,10a-octahydro-7bH-cyclopenta-[b][1,4]diazepino[6,7,1hi]indole]: A novel 5-hydroxytryptamine 2C receptor-selective agonist with preclinical antipsychotic-like activity. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 486-96.
- McGlashan TH (2011) Eugen Bleuler: centennial anniversary of his 1911 publication of *Dementia Praecox* or the group of schizophrenias. *Schizophr Bull* 37: 1101-3.
- Meltzer H, Massey B (2011) The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol* 11: 59-67.
- Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW (2011) The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology (Berl)* 213: 289-305.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1159-72.
- Meyer-Lindenberg A (2010) From maps to mechanisms through neuroimaging of schizophrenia. *Nature* 468: 194-202.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, Weinberger DR, Berman KF (2002) Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* 5: 267-71.
- Millan MJ, Buccafusco JJ, Loiseau F, Watson DJ, Decamp E, Fone KC, Thomasson-Perret N, Hill M, Mocaer E, Schneider JS (2010) The dopamine D3 receptor antagonist, S33138, counters cognitive impairment in a range of rodent and primate procedures. *Int J Neuropsychopharmacol* 13: 1035-51.
- Millan MJ, Dekeyne A, Gobert A (1998) Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology* 37: 953-5.
- Miller DD, Ellingrod VL, Holman TL, Buckley PF, Arndt S (2005) Clozapine-induced weight gain associated with the 5HT_{2C} receptor -759C/T polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B: 97-100.
- Miranda-Sá Jr L (2007) Breve histórico da psiquiatria no Brasil: do período colonial à atualidade. *Revista Psiquiatria do Rio Grande do Sul* 29: 156-158.
- Miyake N, Thompson J, Skinbjerg M, Abi-Dargham A (2011) Presynaptic dopamine in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther* 17: 104-9.
- Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the

- dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22: 389-95.
- Murphy BP, Chung YC, Park TW, McGorry PD (2006) Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review. *Schizophr Res* 88: 5-25.
- Niendam TA, Bearden CE, Rosso IM, Sanchez LE, Hadley T, Nuechterlein KH, Cannon TD (2003) A prospective study of childhood neurocognitive functioning in schizophrenic patients and their siblings. *Am J Psychiatry* 160: 2060-2.
- Nozaki S, Kato M, Takano H, Ito H, Takahashi H, Arakawa R, Okumura M, Fujimura Y, Matsumoto R, Ota M, Takano A, Otsuka A, Yasuno F, Okubo Y, Kashima H, Suhara T (2009) Regional dopamine synthesis in patients with schizophrenia using L-[beta-11C]DOPA PET. *Schizophr Res* 108: 78-84.
- Ohuoha DC, Hyde TM, Kleinman JE (1993) The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. *Psychopharmacology (Berl)* 112: S5-15.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB (1999) NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33: 523-33.
- Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lönqvist J (2007) Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry* 64: 19-28.
- Porter R (2002) *Madness: A brief History*. Oxford University Press
- Redden L, Rendenbach-Mueller B, Abi-Saab WM, Katz DA, Goenjian A, Robieson WZ, Wang Y, Goss SL, Greco N, Saltarelli MD (2011) A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the dopamine D₃ receptor antagonist ABT-925 in patients with acute schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 31: 221-5.
- Reichenberg A (2010) The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 12: 383-92.
- Reith J, Benkelfat C, Sherwin A, Yasuhara Y, Kuwabara H, Andermann F, Bachneff S, Cumming P, Diksic M, Dyve SE, Etienne P, Evans AC, Lal S, Shevell M, Savard G, Wong DF, Chouinard G, Gjedde A (1994) Elevated dopa decarboxylase activity in living brain of patients with psychosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11651-4.
- Remington G, Agid O, Foussias G (2011) Schizophrenia as a disorder of too little dopamine: implications for symptoms and treatment. *Expert Rev Neurother* 11: 589-607.
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3: 353-9.
- Rund BR (2009) Is there a degenerative process going on in the brain of people with Schizophrenia? *Front Hum Neurosci* 3: 36.

- Schaub D, Brüne M, Jaspen E, Pajonk FG, Bierhoff HW, Juckel G (2011) The illness and everyday living: close interplay of psychopathological syndromes and psychosocial functioning in chronic schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261: 85-93.
- Schmidt CJ, Fadayel GM (1996) Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT_{2A} receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1541-9.
- Schmitt KC, Reith ME (2010) Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1187: 316-40.
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261: 717-9.
- Shannon HE, Bemis KG, Peters SC (1991) Potency and efficacy of dopamine agonists in mouse strains differing in dopamine cell and receptor number. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 103-7.
- Simpson MD, Lubman DI, Slater P, Deakin JF (1996) Autoradiography with [³H]8-OH-DPAT reveals increases in 5-HT(1A) receptors in ventral prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 39: 919-28.
- Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL (1970) The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* 127: 199-207.
- Stahl SM (2007) Novel therapeutics for schizophrenia: targeting glycine modulation of NMDA glutamate receptors. *CNS Spectr* 12: 423-7.
- Stahl SM (2008) *Antipsychotics and Mood Stabilizers*. Cambridge University Press, New York, USA
- Sumiyoshi T, Stockmeier CA, Overholser JC, Dilley GE, Meltzer HY (1996) Serotonin_{1A} receptors are increased in postmortem prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res* 708: 209-14.
- van Os J, Kenis G, Rutten BP (2010) The environment and schizophrenia. *Nature* 468: 203-12.
- Volz TJ, Schenk JO (2005) A comprehensive atlas of the topography of functional groups of the dopamine transporter. *Synapse* 58: 72-94.
- Weinberger DR, McClure RK (2002) Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry* 59: 553-8.
- Wong EH, Tarazi FI, Shahid M (2010) The effectiveness of multi-target agents in schizophrenia and mood disorders: Relevance of receptor signature to clinical action. *Pharmacol Ther* 126: 173-85.
- Zapata A, Shippenberg TS (2002) D(3) receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 81: 1035-42.