

(11) Número de Publicação: **PT 1843757 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/00** (2007.10) **A61K 31/5513**  
(2007.10)

**A61K 31/195** (2007.10) **A61K 31/4422**  
(2007.10)

**A61P 25/00** (2007.10) **A61P 27/16** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2006.01.19**

(30) Prioridade(s): **2005.01.25 DE**  
**102005004343**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.10.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.31**  
**128/2010**

(73) Titular(es):

**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TUBINGEN**  
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM, GEISSWEG 3 72076**  
**TÜBINGEN DE**

(72) Inventor(es):

**MARLIES KNIPPER-BREER DE**  
**LUKAS RÜTTIGER DE**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA**  
**RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO DE FENÓMENOS FANTASMA**

(57) Resumo:

## RESUMO

### "TRATAMENTO DE FENÓMENOS FANTASMA"

A presente invenção refere-se a uma substância para o tratamento dos fenómenos fantasma do acufeno agudo e/ou da dor fantasma, a um processo para o diagnóstico, bem como para o tratamento destes fenómenos fantasma.

## **DESCRIÇÃO**

### **"TRATAMENTO DE FENÓMENOS FANTASMA"**

A presente invenção refere-se a uma substância para o tratamento de fenómenos fantasma, nomeadamente do acufeno agudo, e a um processo para o diagnóstico deste fenómeno fantasma.

Substâncias e processos deste género são de um modo geral conhecidos no estado da técnica.

Pelo fenómeno fantasma do acufeno entende-se os ruídos perceptíveis por um doente que são produzidos pelo ouvido e pelo sistema auditivo. Um acufeno que persista apenas desde há poucas semanas até três meses é designado por acufeno agudo. Se o acufeno persistir mais de um ano é designado de crónico. Segundo levantamentos epidemiológicos, cerca de três milhões de adultos, isto é aproximadamente 4% da população na Alemanha está afectada por acufeno crónico. Quando considerado globalmente, em cada ano cerca de dez milhões de pessoas sofre de acufeno, que se converte de uma forma aguda para uma forma crónica em cerca de 340000 dos casos, a assim denominada taxa de incidência.

As múltiplas causas de acufeno incluem danos crónicos de ruído, traumatismos auditivos agudos devidos a estrondos, perda repentina de audição e outros tipos de doenças implicadas com uma perda de audição. De acordo com estudos clínicos, o acufeno está associado, em mais de dois terços dos casos, a contextos de deficiência auditiva do ouvido interno, como forma em

desenvolvimento crónico ou como deficiência auditiva devida a ruído, seguidas da doença de Menière e da perda repentina de audição. Doenças da coluna vertebral cervical, bem como da articulação mandibular e da musculatura mastigatória estão também envolvidas na origem e manutenção do acufeno. O acufeno parece apresentar também um componente psíquico, de modo que se fala, neste contexto, de acufeno psicogénico. Em muito casos, apesar de um diagnóstico intensivo, não é possível contudo reconhecer uma causa segura para o acufeno.

Actualmente a terapia do acufeno é efectuada com tratamento psicossomático, terapia de relaxamento, biofeedback, hipnoterapia, estimulação eléctrica, lidocaína, iontoforese ou mascaramento. Neste caso, trata-se contudo exclusivamente de conceitos terapêuticos sintomáticos.

O documento WO 02/15907 A1 propõe o tratamento de acufeno através da administração do agente de abertura do canal de potássio flupirtina. Este tratamento tem a desvantagem de a flupirtina ser adicionalmente um analgésico relaxante muscular, pelo que uma aplicação estaria associada a efeitos secundários não toleráveis.

Wang *et al.* (2000), Evaluating effects of some medicine on tinnitus with animal behavioral model in rats, *Zhonghua Er. Bi. Yan. Hou. Ke. Za. Zhi.* 35 (5), abstract, propõem a administração de nimodipina para o tratamento de acufeno. A nimodipina é um inibidor do canal de  $Ca^{++}$  Cav1.3. Neste caso verificou-se todavia que o bloqueio do canal Cav1.3 conduziria directamente à surdez no sistema auditivo, de modo que a nimodipina é absolutamente inadequada para o tratamento de acufeno.

No documento WO 2004/022069 A1 são descritos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) aberrantes como uma das possíveis causas de acufeno. Estes, assim denominados, canais de receptores de glutamato alterados que são expressos, entre outros, por células nervosas auditivas conduzem a um influxo aumentado de cálcio para a célula. Neste documento propõe-se empregar antagonistas do receptor de NMDA para o tratamento de acufeno. Fica todavia completamente por esclarecer se é possível tratar uma situação aguda ou crónica de acufeno com estas substâncias. Não se encontram além disso quaisquer indicações sobre o modo como se deve efectuar a aplicação das substâncias.

No documento DE 10124953 A1 é proposto um conceito de tratamento para o acufeno que assenta na estimulação da expressão do factor neurotrófico de origem cerebral (BDNF). Os autores descrevem, com base num modelo animal, que no caso de acufeno crónico predomina uma diminuição da expressão de BDNF na cóclea e no colículo inferior, razão pela qual é proposta a estimulação da expressão de BDNF como princípio terapêutico. Contudo, os autores analisaram muito concretamente e exclusivamente a situação no caso de acufeno crónico. Os ratos utilizados no modelo animal foram assim tratados ao longo de três meses com salicilatos o que, como se sabe, induz o acufeno crónico; ver Penner M. J., e Jastreboff P. J. (1996), Tinnitus: Psycho-physical observations in humans and animal models, em: Van de Water, Popper A. N., Fax, R. R. (Ed.), Clinical aspects of hearing, Springer, New York, Heidelberg, páginas 208 até 304; e Bauer, C. A., et al. (1999), A behavioral model of chronic Tinnitus in rats. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121, páginas 457 até 462.

Contudo, os autores do documento DE 10124953 A1 não reconheceram que tem de haver diferenças significativas entre o tratamento de acufeno crónico e agudo.

Theopold, H.M. (1985), Nimodipin (Bay e 9736) ein neues Therapiekonzept bei Innenohrerkrankungen?, Laryng. Rhinol. Otol. 64, páginas 609 até 613 analisa a administração sistémica do antagonista do canal  $Ca^{++}$  nimodipina em doentes com acufeno crónico e agudo.

Ciocon, J.O. e Ciocon, D.G. (1997), Does oxazepam offer relief of tinnitus or alter it to a non-troublesome functional level in the elderly?, Journal of the American Geriatrics Society 45, N° 9, Poster Abstract na página S41, descrevem que a administração sistémica do agonista do receptor GABA oxazepano em doentes que sofrem de acufeno desde há 6 até 10 meses conduz a uma melhor tolerância desta doença.

Menkes D.B. e Larson, P.M. (1998), Sodium valproate for tinnitus, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 65, página 803, descrevem a administração sistémica do agonista do receptor GABA valpurato de sódio a um doente com acufeno.

Szczepaniak, W.S. e Møller, A. (1995), Effects of L-baclofen and D-baclofen on the auditory system: A study of click-evoked potentials from the inferior colliculus in the rat, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 104, páginas 399-404 descrevem que o agonista do receptor GABA L-baclofeno administrado sistemicamente pode reprimir a estimulação no traçado auditivo crescente.

O documento WO 2005/073237 descreve a síntese do agonista do receptor GABA THIPO, ou seja gaboxadol.

Pode encontrar-se um panorama geral sobre o quadro clínico do acufeno, por exemplo, em Waddell, A., Canter, R. (2004), Tinnitus, Am. Fam. Physician 69, páginas 591 até 592.

Eggermont, J.J. e Roberts L.E. (2004), The neuroscience of tinnitus, vol. 27, N° 11, Trends in Neurosciences fornecem um panorama geral sobre as bases moleculares do acufeno.

Pelo fenómeno fantasma da dor fantasma entende-se a projecção de sensações numa parte corporal, uma extremidade, a mama, o recto, um dente, entre outros, amputada ou que sofreu desnervação, p. ex., por danos do plexo ou por paraplegia. Esta parte corporal é vivida como estando presente e sentida após a amputação de extremidades, por exemplo, como uma mão ou pé inchados assentes directamente no coto de amputação.

As indicações dos números relativos à quantidade de casos em que, após a amputação, ocorre uma dor fantasma são inconsistentes e variam entre 5 e 100%.

As dores fantasma são tratadas, até à data, no âmbito de terapias de dor, por exemplo com anticonvulsivos, baclofeno ou calcitonina. Ocasionalmente utiliza-se como apoio antidepressivos que aliviam a dor. Aplicam-se também métodos cirurgicos, por meio dos quais se bloqueiam ou se estimulam nervos, por exemplo. Não existe contudo, até à data, um método de tratamento causal orientado, em particular pelo facto dos mecanismos moleculares subjacentes não estarem completamente compreendidos.

Weber W.E. (2001), Pharmacotherapy for neuropathic pain caused by injury to the afferent nerve fibers, *Nederlands Tijdschrift Voor Geneseskunde*, vol. 145, nº 17, páginas 813-817 propõe a aplicação do agonista do receptor GABA baclofeno para o tratamento de dores fantasma.

Vichitrananda C. e Pausawasdi S. (2001), Midazolam for the treatment of phantom limb pain exacerbation: preliminary reports, *J. Med. Assoc. Thai.*, vol. 84, nº. 2, páginas 299 até 302, propõem a administração sistémica do agonista do receptor GABA midazolame para o tratamento de dores fantasma.

Encontra-se um panorama geral do quadro clínico da dor fantasma em Middleton, C. (2003), *The causes and treatments of phantom limb pain*, *Nurs. Times* 99, páginas 30 até 33.

É, por conseguinte, objectivo da presente invenção disponibilizar um conceito terapêutico, com o qual sejam evitadas as desvantagens do estado da técnica. Pretende-se, em particular, preparar uma substância com a qual seja possível tratar de modo dirigido o fenómeno fantasma do acufeno agudo.

Este objectivo é solucionado através da utilização de um agonista do receptor GABA para a preparação de um produto farmacêutico para o tratamento do acufeno agudo num ser humano, em que o agonista do receptor GABA é aplicado localmente na zona do ouvido ou no ouvido.

O BDNF (factor neurotrófico de origem cerebral) é uma proteína básica produzida por neurónios do sistema nervoso central que é constituída por 252 aminoácidos. O BDNF é um factor de crescimento que está envolvido no desenvolvimento do

sistema nervoso e desempenha, entre outros, um papel no desenvolvimento da plasticidade das sinapses. O efeito do BDNF é mediado por receptores especiais, por exemplo por via do receptor de BDNF trkB que, por sua vez, regula factores a jusante, tal como a MAP cinase ou Cam cinase, na sua actividade ou no seu modo de acção. O BDNF é, ele próprio, por sua vez, auto-regulado, por exemplo, por via do cálcio.

Todos os factores que afectam ou regulam o BDNF na sua actividade, expressão, modo de acção ou semelhante, ou todos os factores que são afectados ou regulados deste modo pelo BDNF, formam a assim denominada cascata de transdução de sinais do BDNF.

A cascata de transdução de sinais do BDNF pode ser subdividida numa cascata que está a montante do receptor de BDNF trkB, e uma que está a jusante deste. A cascata de transdução de sinais a jusante de trkB é induzida pela ligação de BDNF, bem como de outros membros da família das neurotrofinas ao receptor trk. Isto conduz a uma dimerização de trk e à activação da actividade da tirosina cinase do receptor. Através desta agregação mediada por ligandos dos receptores ocorre uma autofosforilação de domínios intracelulares que provocam uma activação de moléculas de sinal, tal como a fosfolipase C (PLC), a fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3-cinase) e da proteína adaptadora Shc (proteína contendo SH-2). Os sinais adicionais, sobretudo mediados através da MAP cinase dependente de ras influenciam em última instância a transcrição genética celular e a síntese proteica.

A cascata do trkB a montante refere-se à regulação de BDNF. É assim sabido que a expressão de BDNF é regulada em função da

actividade por diferentes estímulos, tal como a estimulação eléctrica ou ferimento, movimento puramente físico ou também pelo ritmo diário. Os estímulos mencionados anteriormente regulam a expressão de vários exões de BDNF não traduzidos que formam depois, por fim, em conjunto com o exão 5' comum, diferentes transcritos de BDNF. Os estímulos actuam aparentemente por via de diferentes cascatas de sinais, induzidas por  $Ca^{++}$ , sobre os promotores dos vários exões de BDNF.

Por cascata de transdução de sinais de BDNF entende-se, de acordo com a invenção, tanto a cascata a jusante de *trkB* como também a cascata a montante de *trkB*. Subentende-se que também o *trkB* é ele próprio um componente da cascata de transdução de sinais de BDNF.

Encontra-se um panorama geral sobre a cascata de transdução de sinais de BDNF em Gabellini, N. (2004), *Transcriptional regulation by cAMP and  $Ca^{++}$  links the  $Na^{+}/Ca^{++}$  exchanger 3 to memory and sensory pathways*, *Mol. Neurobiol.* 30, páginas 91 até 116; West *et al.* (2001), *Calcium Regulation of Neuronal Gene Expression*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, páginas 11024-11031. Os conteúdos destas publicações são incorporados por referência no presente pedido.

O BDNF é conhecido por desempenhar um papel num grande número de doenças, ver Binder, D. K. (2004), *The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system*, *Recent Advances in Epilepsy Research*, páginas 34 até 56.

Uma substância que interactue com a cascata de transdução de sinais de BDNF pode apresentar qualquer configuração, isto é, pode tratar-se de uma substância que seja definida como sendo

tanto química como também bioquímica ou biológica que sendo portanto um composto sintetizado quimicamente de qualquer cariz que representa uma molécula, ião, átomo, uma proteína, péptido, anticorpo, um ácido nucleico, um aptâmero, um vírus, bactéria, etc.

Por interacção entende-se a interacção directa ou indirecta desta substância com um factor da cascata de transdução de sinais de BDNF que resulta numa modificação da transdução de sinais fisiológica no interior desta cascata. As substâncias interactuantes deste género são sobejamente descritas no estado da técnica.

O objectivo da presente invenção é deste modo completamente solucionado. A requerente disponibilizou, em particular, pela primeira vez, um conceito terapêutico comum para os fenómenos fantasma do acufeno agudo e da dor fantasma.

É agora possível, graças à invenção, tratar de forma dirigida a cariz aguda do acufeno e deste modo impedir antecipadamente a cronificação problemática deste fenómeno fantasma. No estado da técnica não se faz frequentemente qualquer diferenciação entre acufeno crónico e agudo e em muitos casos propõem-se somente abordagens para o tratamento de acufeno crónico, tal como também no documento DE 10124953 A1 acima mencionado.

Tal como a requerente verificou adicionalmente, é possível transferir o conceito da interacção com a cascata de transdução de sinais de BDNF também para o tratamento da dor fantasma.

De acordo com a invenção, prevê-se uma substância interactuante tal que provoca um bloqueio ou inibição da cascata de transdução de sinais de BDNF.

Por um bloqueio ou inibição neste sentido, entende-se, de acordo com a invenção, que a transmissão de sinais no interior da cascata de transdução de sinais de BDNF é retardada, piorada, reduzida ou completamente reprimida face à situação fisiológica.

Esta constatação por parte da requerente foi completamente surpreendente e contradiz as constatações descritas no documento DE 10124953 A1 para o acufeno crónico. Assim, nomeadamente no documento mencionado anteriormente, é necessária uma estimulação da expressão de BDNF, enquanto, pelo contrário, de acordo com a invenção, é necessária uma inibição da expressão de BDNF ou da transdução de sinais de BDNF para o tratamento de fenómenos fantasma, tal como o acufeno agudo. A requerente constatou, por conseguinte que, no caso do acufeno agudo, deve efectuar-se uma terapia que está configurada de forma exactamente oposta à proposta para o acufeno crónico de acordo com o documento previamente mencionado. Uma transferência deste conceito conhecido para o estado agudo teria por conseguinte consequências fatais.

A requerente da presente invenção induziu acufeno agudo em ratos através da administração de curta duração de salicilatos e verificaram uma expressão aumentada de BDNF nos gânglios cocleares. A requerente pôde demonstrar que as relações na indução de acufeno crónico são exactamente inversas ocorrendo aí portanto uma diminuição da expressão de BDNF nos gânglios cocleares.

Mostrou-se portanto surpreendentemente que para a selecção do método de tratamento correcto é essencial uma diferenciação entre o acufeno agudo e crónico e que, até à data, não se efectuou ou não se efectuou de forma suficiente, no estado da técnica. O acufeno agudo deve ser, por conseguinte, tratado, de acordo com a invenção, através de uma inibição ou de um bloqueio da cascata de transdução de sinais de BDNF, por exemplo por inibição da expressão de BDNF, enquanto, pelo contrário, de acordo com o documento DE 10124953 A1 no caso do acufeno crónico é necessária uma estimulação da expressão de BDNF.

Um tratamento análogo é proposto pela requerente para a dor fantasma.

A requerente apresenta aqui, pela primeira vez, dados moleculares que revelam os mecanismos da patologia do acufeno e da dor fantasma e enriquecem, deste modo, as bases científicas e a medicina com um melhor entendimento sobre estes fenómenos fantasma e mostram simultaneamente um conceito terapêutico causal.

De acordo com a invenção, prevê-se uma substância tal que provoque um bloqueio ou inibição da cascata de transdução de sinais a montante de trkB.

Segundo este ponto de partida vantajoso, o BDNF não é de todo activado ou expresso ou é activado ou expresso de forma diminuída, e não é capaz de transferir os seus sinais ao trkB. Ou então, factores adicionais situados a montante de trkB são de tal modo afectados na sua actividade que não são capazes de transferir os seus sinais ao trkB.

As substâncias inibidoras a montante de trkB são antagonistas do canal  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L, de um modo preferido seleccionadas do grupo constituído por nicardipina, nifedipina e isradipina, bem como antagonistas da CREP e antagonistas do glutamato.

Tal como foi possível a requerente verificar, as substâncias deste género são adequadas como substâncias activas farmacológicas num produto farmacêutico para o tratamento de acufeno agudo ou de dor fantasma. A proteína de sinal CREP (proteína de ligação ao elemento de resposta CAMP) conduz à estimulação da expressão de BDNF por via da interacção com  $\text{Ca}^{++}$  e cAMP em conjunto com glutamato, por via da activação de regiões distintas de promotores de BDNF. Com uma interrupção desta cascata através de antagonistas do receptor de glutamato ou substâncias, que inibem, p. ex., a fosforilação da CREB mediada por uma cAMP cinase ou uma cinase dependente de  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina (CaMK), e inibem por este meio a expressão de BDNF, é possível tratar eficazmente o acufeno agudo ou a dor fantasma. São antagonistas da CREP adequados para o efeito, por exemplo, H89 como inibidor da cAMP cinase, bem como KN-93 como inibidor do CaMK.

É utilizado, como substância interactuante com a cascata de transdução de sinais de BDNF a montante de trkB, um agonista do receptor de GABA, de um modo preferido uma benzodiazepina ou uma substância aparentada com esta. Estas incluem, de um modo preferido midazolam, diazepam, flurazepam, oxazepam, nitrazepam, flunitrazepam, clonazepam, triazolam, clobazam e brotizolam. São utilizados, como agonistas do receptor de GABA adicionalmente preferidos, o baclofeno, gama-vinil-GABA, gama-acetileno-GABA,

progabida, muscimol, iboteno, valproato de sódio ou tetra-hidroisoxazolpiridina (THIP).

A requerente pôde mostrar que as substâncias anteriormente mencionadas são particularmente adequadas para o tratamento do acufeno agudo e/ou da dor fantasma. Assim, foram administrados diversos agonistas do receptor de GABA, tal como por exemplo a benzodiazepina midazolam, a ratos aos quais foi induzido acufeno agudo e uma expressão aumentada de BDNF nos gânglios cocleares por toma de salicilatos. Mostrou-se neste caso que, através desta aplicação, se reduziu significativamente a expressão de BDNF nos neurónios cocleares e, por este meio, os sintomas do acufeno agudo. As substâncias anteriormente mencionadas actuam, por conseguinte, como antagonistas de BDNF e interactuam, surpreendentemente, com a cascata de transdução de sinais de BDNF.

Segundo um princípio alternativo prevê-se uma substância tal que provoque um bloqueio ou inibição do receptor de BDNF (trkB) ou da cascata de transdução de sinais a jusante deste.

Através desta medida aproveita-se um ponto de ataque adicional adequado para uma intervenção terapêutica. Assim, o trkB pode, ele próprio, ser bloqueado por meio de substâncias adequadas conhecidas no estado da técnica e, deste modo, a cascata de transdução de sinais de BDNF completa que se segue. Podem ser ainda desenvolvidas por meio do design de moléculas de fármacos com base em dados cristalográficos por via do trkB, substâncias interactuantes com este receptor adequadas, que representam substâncias activas vantajosas para um produto farmacêutico para o tratamento de acufeno agudo ou de dor fantasma. São também pontos de ataque adequados os factores, que

estão a jusante de trkB na cascata de transdução de sinais, tal como, por exemplo, PLC, PI3-quinase ou Shc. Um silenciamento ou inibição destes factores conduz igualmente a um bloqueio adequado da cascata de transdução de sinais de BDNF.

Como substância pode ser alternativamente previsto um inibidor da MAP quinase, um da Cam quinase ou um antagonista de trkB. São inibidores da MAP quinase particularmente adequados, de acordo com a invenção, as substâncias U 0126 ou PD 98058.

Tais substâncias são adequadas para o tratamento de acúfeno agudo ou de dor fantasma. U 0126, inibidor de MEK1/2, e PD 98058, um inibidor de MEK1 podem ser adquiridos junto da Cell Signalling Technology, Inc., Beverly, MA, Estados Unidos da América. A selecção da concentração empregue cabe neste caso ao especialista e depende da gravidade da doença, do restante conceito terapêutico, bem como de vários factores individuais do doente a tratar. Perante este cenário, a concentração empregue para cada caso individual é estabelecida pelo especialista utilizando medidas de rotina.

A substância é aplicada localmente na zona do ouvido ou no ouvido.

Esta medida tem a vantagem de a substância ser administrada de forma dirigida no local de acção, de modo que são necessárias apenas quantidades reduzidas de substância activa. Por este meio, o corpo do doente a tratar é, de resto, menos sobrecarregado e os efeitos secundários são extensivamente reduzidos. No caso de um tratamento de acúfeno agudo é apropriado o sistema de microdoseamento que é descrito por Lehner, R. *et al.* (1996), A new implantable drug delivery system

for local therapy of the middle and inner ear, *Ear. Nose Throat* 76, páginas 567 até 570.

A aplicação local da substância pode também efectuar-se alternativamente através da aplicação de hidrogel biodegradável, que serve como matriz de suporte para a substância. Um hidrogel biodegradável deste género foi já empregue com sucesso no modelo animal para a aplicação local de BDNF na janela redonda do ouvido interno; Ito *et al.* (2005), A new method for drug application to the inner ear, *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, páginas 272-275.

A requerente verificou que uma aplicação local da substância interactuante com a cascata de transdução de sinais de BDNF é particularmente vantajosa dado que, nomeadamente como a requerente pôde verificar em experiências adicionais, no caso de acufeno agudo a expressão de BDNF no córtex auditivo está surpreendentemente reduzida ao contrário da situação nos gânglios cocleares. Uma aplicação sistémica de substâncias inibidoras da cascata de transdução de sinais de BDNF iria conduzir, por conseguinte, a uma diminuição ainda maior da expressão de BDNF no córtex e com isso a efeitos nocivos sobre o organismo. No caso do acufeno agudo e dor fantasma uma administração sistémica da substância que inibe a cascata de transdução de sinais de BDNF, seria por conseguinte contra-indicada.

Um objecto adicional da presente publicação refere-se a uma substância para o tratamento terapêutico e/ou profiláctico dos fenómenos fantasma do acufeno agudo e/ou dor fantasma num ser humano ou animal, que é seleccionada do grupo constituído por: inibidor de MAP cinase, em particular U 0126 ou PD 98058,

inibidor da Cam cinase, antagonista do canal de  $Ca^{++}$  do tipo L, em particular nicardipina ou nifedipina ou isradipina, antagonista da CREP, em particular H89 e KN-93, ou antagonista do glutamato e antagonista do trkB.

A requerente constatou e propôs, pela primeira vez, uma aplicação médica concreta das substâncias previamente mencionadas no contexto de fenómenos fantasma, tal como o acufeno agudo ou a dor fantasma.

Um objecto adicional da presente invenção refere-se a um processo para o diagnóstico do acufeno agudo num ser animal ou humano, que apresenta os seguintes passos: (a) preparação de uma amostra biológica do ser vivo, (b) determinação do nível da expressão de BDNF na amostra biológica, (c) comparação do nível do passo (b) com um valor de referência de um ser vivo saudável, e (d) correlação de um nível situado acima do de um ser saudável com um diagnóstico positivo.

De acordo com a invenção, a amostra biológica provém do ouvido, tal como uma amostra de tecido, células, por exemplo gânglios cocleares ou células nervosas. Deve ter-se em atenção, neste caso, que aquando da remoção da amostra de tecido do ouvido não ocorra qualquer lesão da audição, em que não é necessário tomar uma tal medida de precaução quando se trate de um acufeno que se desenvolva centralmente para um ouvido que já não está intacto. Uma remoção de amostra deste tipo para a determinação do nível da expressão de BDNF pode então ser também aproveitada simultaneamente para a medição da funcionalidade da transferência e utilização de nervos situados mais centralmente, para otimizar, p. ex., a eficiência da implantação de um implante de cóclea.

O processo é realizado num sistema biológico adequado, em que podem ser utilizados tampões habituais, tal como o tampão Tris ou HEPES. A determinação do nível de expressão no passo (b) efectua-se por via de métodos moleculares ou de biologia celular habituais, tal como a técnica de ELISA e transferência de Western ao nível proteico, ou transferência de Northern ao nível do ARNm. São descritos métodos de biologia molecular adequados, por exemplo, em Sambrook, J. e Russel, D. W. (2001), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, o conteúdo desta publicação é incorporado por referência na presente descrição.

A requerente conseguiu, deste modo, estabelecer e disponibilizar, pela primeira vez, um diagnóstico biológico-molecular para o acufeno agudo ou da dor fantasma.

A requerente desenvolveu igualmente um processo para o tratamento dos fenómenos fantasma do acufeno agudo e/ou da dor fantasma num ser humano, que apresenta os seguintes passos: (a) preparação de um produto farmacêutico que apresenta uma substância interactuante com a cascata de transdução de sinais de BDNF, bem como um suporte farmacêuticamente aceitável e eventualmente substâncias auxiliares adicionais e/ou substâncias activas, e (b) aplicação, eventualmente local, do produto farmacêutico ao ser vivo e, eventualmente, (c) repetição dos passos (a) e (b).

Os suportes farmacêuticamente aceitáveis e as substâncias auxiliares adicionais são sobejamente conhecidos no estado da técnica, comparar por exemplo Kibbe, A. H. (2000), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd Edition, American Pharmaceutical

Association and Pharmaceutical Press, o conteúdo desta publicação é incorporado por referência na presente descrição.

Como substâncias activas adicionais consideram-se, por exemplo, analgésicos clássicos ou produtos para o acufeno.

Subentende-se que as características anteriormente mencionadas e as que serão ainda explicadas podem ser utilizadas não só na combinação respectivamente indicada, mas também noutras combinações ou isoladamente, sem abandonar o âmbito da presente invenção.

A invenção será agora explicada em maior detalhe com base em formas de realização, que são puramente ilustrativas e a partir das quais resultam características e vantagens adicionais da invenção.

Nas figuras anexas representa-se o seguinte:

Fig. 1: A operação e fornecimento local de salicilato não altera significativamente o nível limiar da audição;

Fig. 2 A aplicação aguda sistémica e local de salicilato conduz, após um determinado período de tempo, a uma expressão de c-fos aumentada na cóclea;

Fig. 3 Análise da hibridação *in situ* de c-fos e as variantes de *splicing* BDNF-exão III e BDNF-exão IV na cóclea de ratos adultos após aplicação local e sistémica de salicilato;

- Fig. 4 Uma análise por RT-PCR mostra uma alteração diferencial dependente da dose da expressão de c-fos e do BDNF-exão III e do BDNF-exão IV na cóclea após aplicação sistêmica e local de salicilato;
- Fig. 5 A aplicação local de salicilato reduz a expressão de c-fos, de BDNF-exão III e de BDNF-exão IV de no córtex auditivo;
- Fig. 6 A regulação positiva da expressão de BDNF devida ao salicilato em neurónios cocleares é inibida pelo antagonista do canal de Ca<sup>++</sup> de tipo L, a nifedipina; e
- Fig. 7 A regulação positiva da expressão de BDNF devida ao salicilato em neurónios cocleares é inibida pela benzodiazepina midazolam.

Forma de realização

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Para as experiências utilizou-se ratos fêmea adultos Wistar que pesavam entre 280 e 300 gramas. O tratamento e o manuseamento com estes animais efectuou-se em conformidade com as orientações do instituto da Universidade de Tübingen, Tierforschungsanstalt.

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal de acordo com o processo de Guitton, M. J. et al. (2003), Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors, J. Neurosci. 23, páginas 3944 até 3952, de modo a colocar um, assim denominado, *Gelfoam* (Gelita Tampon; B. Braun Medical, Melsungen, Alemanha) sobre a janela redonda de ambos os ouvidos. O *Gelfoam* foi embebido, tal como indicado, com salicilato, que havia sido diluído em solução artificial de perilinfa (70 mg/mL), ou com o volume correspondente de perilinfa artificial isoladamente. O *Gelfoam* foi colocado, tal como descrito, no nicho da janela redonda; Guitton J. et al. (loc. cit.). O salicilato foi assim aplicado localmente durante 20 horas. Após este período de tempo, os animais foram sacrificados e a cóclea e o córtex auditivo foram removidos.

#### Preparação dos tecidos

Os animais foram profundamente anestesiados com dióxido de carbono e subsequentemente decapitados. As cócleas foram isoladas e preparadas tal como descrito anteriormente; ver Knipper, M. et al. (2000), Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems, J. Neurophysiol. 83, páginas 3101 até 3112. Resumidamente, as cócleas foram fixas durante duas horas por imersão em paraformaldeído a 2%, sacarose 125 mM em tampão fosfato salino (PBS) 100 mM, pH 7,4, após a fixação foram descalcificadas durante 45 minutos em "Rapid bone decalcifier" (#904687, Eurobio, Fisher-Scientific, 61130 Nidderau, Alemanha), seguindo-se subsequentemente uma incubação durante a noite em sacarose a 25%, inibidor da protease 1 mM (Pefabloc, Roche) em solução salina tamponada de Hanks. Depois da incubação durante a

noite, incorporou-se as cócleas em composto O.C.T. (Miles Laboratories, Elkhart, Ind., EUA). Os tecidos foram depois criossecionados a uma espessura de 10 µm para a hibridação *in situ*, armazenados sobre lâminas SuperFrost\*/plus e armazenados antes da utilização a -20 °C.

Os córtices auditivos foram identificados de acordo com as descrições que são dadas em Paxinos, G. & Watson, C. (1998), *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Inc. Para as preparações de ARN, os tecidos foram imediatamente congelados em azoto líquido e armazenados a -70 °C antes da utilização.

#### Síntese de ribossondas e hibridação *in situ*

Isolou-se o ADN genómico de tecido hepático de rato por meio do kit Easy-DNA de Invitrogen de acordo com as indicações do fabricante. Realizou-se uma reacção em cadeia da polimerase, de modo a amplificar todos os quatro exões 5' não codificantes do gene de BDNF.

Para amplificar a sonda específica para o exão-3, utilizou-se um iniciador de sentido (sense) (5' acc cac ttt ccc att cac cg 3') e um iniciador anti-sentido (antisense) (5' cct ttt tca gtc act act tg 3') correspondendo, respectivamente, às posições nucleotídicas 536 até 555 e 957 até 976 do fragmento genómico B (Timmusk, T. *et al.* (1995), Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice, *J. Cell. Biol.* 128, páginas 185 até 199. Para a sonda específica para o exão-4 utilizou-se um iniciador de sentido (5' cca atc gaa gct caa ccg aa 3') e um iniciador anti-sentido

(5' tca ggg tcc aca caa agc tc 3') correspondendo às posições nucleotídicas 1732 até 1751 e 2059 até 2078 do fragmento genómico B (Timmusk, T. *et al.*, loc. cit.). Para amplificar a ribossonda comum codificadora para o exão-5, utilizou-se um iniciador de sentido (5' gag gac cag aag gtt cg 3') e um iniciador anti-sentido (5' ttt atc tgc cgc tgt gac 3') correspondendo às posições nucleotídicas 309 até 325 e 534 até 551 (nº de acesso M61175). Para sintetizar a sonda c-fos, utilizou-se um iniciador sentido (5' gac ttt tgc gca gat ctg tc 3') e um iniciador anti-sentido (5' ctg ctc tac ttt gcc cct tc 3') correspondendo às respectivas posições nucleotídicas 276 até 295 e 508 até 527 do ADNc (nº de acesso X06769).

Na reacção de PCR, o ADN genómico foi primeiro submetido a desnaturação durante quatro minutos a 94 °C, seguindo-se 30 ciclos de um minuto a 94 °C, um minuto a 55 °C e um minuto a 72 °C. A reacção de extensão realizou-se a 72 °C durante dez minutos. Os fragmentos amplificados foram separados num gel de agarose a 1% em 1 x tampão TAE. Os fragmentos que correspondem aos comprimentos esperados das sondas específicas para os genes foram extraídos utilizando-se o kit de extracção QIAquick-Gel da Qiagen. Os comprimentos esperados dos fragmentos amplificados eram de 351 nucleótidos (exão-III), 347 nucleótidos (exão-IV), 243 nucleótidos (exão-V) e 252 nucleótidos (c-fos). Estes fragmentos foram clonados num pCR II Topo-Vektor (Invitrogen) e as suas sequências nucleotídicas foram verificadas por meio de um sequenciador automático.

Os plasmídeos foram isolados utilizando-se um kit QIAprep Spin Miniprep da Qiagen. Para se sintetizar plasmídeos linearizados para a síntese de ribossondas sentido, os plasmídeos foram primeiro linearizados com enzimas de restrição

adequadas. As ribossondas foram sintetizadas utilizando-se Sp6, T3 ou T7 ARN polimerases e marcaram-se utilizando-se de rNTP-Mix que contém trifosfatos de uridina marcados com digoxigenina. Todas as enzimas de restrição, ARN polimerases e rNTPs marcados com digoxigenina foram adquiridos junto da Roche Diagnostics. A hibridação *in situ* realizou-se, tal como anteriormente descrito (Wiechers, B. *et al.* (1999), A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlea development of rats and mice, J. Neurosci. 19, páginas 3033 até 3042. As secções foram cobertas com Moviol (Sigma) e observadas utilizando-se um microscópio Olympus AX70.

#### Transcrição reversa, PCR semi-quantitativa

O ARN total foi isolado tanto a partir da cóclea como também de tecido cerebral utilizando-se o kit Total-Rneasy da Qiagen e tratou-se com ADNase (Ambion) para eliminar contaminante. O ARN foi subseqüentemente purificado e as concentrações foram determinadas por meio de medições espectrométricas. A transcrição reversa do tecido cerebral realizou-se num volume reaccional de 20 µL utilizando-se 1 µg de ARN total como molde e SUPERSCRIPT II Rnase transcriptase reverse H<sup>-</sup> de acordo com o protocolo da Invitrogen. Devido à quantidade limitada de ARN nos tecidos cocleares utilizou-se transcriptase reversa Qiagen Senscript, tal como descrito no protocolo de Qiagen, utilizando-se 50 ng de ARN total como molde. Para a PCR optimizou-se o número de ciclos e a temperatura de emparelhamento, de modo que os sinais, que foram obtidos para BDNF, c-fos e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) não estavam saturados.

As sequências de iniciador da PCR para arc eram 5' caa tgt gat cct gca gat tg 3' e 5' tgt tgg cat agg ggc taa ca 3'; para BDNF estas eram 5' ttc gac ccc gcc cgc cgt gg3' e 5' ccc ctt tta atg gtc agt gt 3'; para c-fos estas eram 5' gac ttt tgc gca gat ctg tc 3' e 5' att cct ttc cct tcg gat tc 3'; para GAPDH estas eram 5' tct act gc gtc ttc ac acc a 3' e 5' agg aga caa cct ggt cct cag t 3'. A PCR foi realizada num volume final de reacção de 25 µL, em que foram utilizados simultaneamente ambos os iniciadores para GAPDH e os genes dependentes da actividade. Nesta reacção de PCR duplex, um gene constitutivo na mesma reacção de PCR representa um controlo interno, de modo que a intensidade do gene dependente da actividade pode ser comparado inequivocamente com o controlo e com as amostras tratadas. Foram utilizadas PCR-readyto-go-Beads da Amershan Pharmacia para garantir um nível padrão das condições da PCR e para reduzir contaminações aquando da pipetagem. Por fim, os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose a 2%, que foi visualizado por meio de uma coloração de brometo de etídio e análise densitométrica utilizando-se um Alpha-Imager 2200 da Biometra. A intensidade do gene dependente da actividade amplificado foi normalizada para cada reacção ao nível do GAPDH coamplificado. As condições de amplificação para arc, BDNF, c-fos e GAPDH eram, para a fase de desnaturação inicial, de 94 °C durante três minutos, 30 ciclos de respectivamente um minuto de desnaturação (94 °C), um minuto para emparelhamento (54 °C), 1,5 minutos para extensão (72 °C) e uma fase final de extensão de dez minutos a 72 °C. Os fragmentos da PCR foram clonados e sequenciados, tal como descrito anteriormente.

### Rastreo ABR (ABR = "resposta auditiva do tronco cerebral")

A anestesia dos animais, bem como o rastreo ABR foram realizados, tal como descrito anteriormente; ver Knipper, M. et al. (2000), loc. cit.; Schimmang, T. et al. (2003), Lack of BDNF and trkB signalling in the post-natal cochlea leads to a spatial reshaping of innervations along the tonotopic axis and hearing loss, *Development* 130, páginas 4741 até 4750.

### RESULTADOS

Tal como descrito acima, aplicou-se localmente salicilato no nicho da janela redonda a ratos fêmea com aproximadamente o mesmo peso. De modo a excluir quaisquer efeitos pós-traumáticos sobre a expressão dos genes dependentes da actividade nos neurónios cocleares, foram utilizados exclusivamente indivíduos que não mostravam qualquer alteração da capacidade de audição após aplicação de *Gelfoam*. Tal como mostra a Fig. 1, não se verificaram quaisquer alterações significativas no rastreo ABR em resposta ao clique antes ou 20 horas após a operação.

Os limiares no rastreo ABR eram extensivamente idênticos antes e após a operação (OP) e não revelaram quaisquer diferenças consideráveis nem na aplicação de salicilato (n = 13; 5 µL; 70 mg/kg; salicilato) nem de perilinfa artificial (n = 9; 5 µL; controlo); ver. Fig. 1 (A). Um rastreo ABR específico em termos de frequência antes e 20 horas após a aplicação local de salicilato (n = 5; 5 µL; 70 mg/kg; salicilato) ou de perilinfa artificial (n = 6; 5 µL; controlo) no nicho da janela oval mostra que não ocorre qualquer perda de audição; ver Fig. 1(B).

Numa primeira abordagem para detectar o momento adequado no qual o salicilato aplicado, quer localmente quer sistemicamente, alcança a cóclea e modifica a excitabilidade neuronal, analisou-se a expressão de c-fos no tecido coclear, em vários momentos após a aplicação de salicilato, através de análise RT-PCR. Verificou-se, neste caso, que a aplicação de salicilato por *Gelfoam* (5  $\mu$ L, 70 mg/mL) não influencia a expressão de c-fos antes de aproximadamente 20 horas, possivelmente devido a uma segregação retardada do líquido a partir da *Gelfoam*. Verificou-se uma regulação positiva significativa de c-fos 20 horas após a aplicação, não contudo após três horas (Fig. 2A). Pelo contrário, através da administração sistémica de salicilato (350 mg/kg de peso corporal) por via de injeção intraperitoneal observou-se logo após três horas uma regulação positiva de c-fos sem alterações significativas em períodos de tempo mais longos até 20 horas. A expressão de GAPDH é igual tanto na abordagem de controlo como também na abordagem tratada com salicilato, o que permite demonstrar que foram utilizadas as quantidades iguais de ARN (50 ng) nestas experiências (Fig. 2B). Para comparar os respectivos efeitos agudos foram analisados em seguida os efeitos de salicilato aplicado localmente 20 horas após a aplicação e salicilato injectado sistemicamente três horas após a aplicação.

Num passo adicional analisou-se o efeito de salicilato aplicado localmente e sistemicamente sobre a expressão de determinadas variantes de *splicing* do BDNF nos gânglios espirais (SG) cocleares do rato por meio de hibridação *in situ*. Para comparação observou-se a expressão de c-fos. Tal como mostra a Fig. 3, a título de exemplo, para três experiências individuais em duplicado, os sinais de hibridação para c-fos (Fig. 3A), BDNF-exão III (Fig. 3B) e BDNF-exão IV (Fig. 3C) na torção basal

média estavam significativamente aumentados em comparação com a aplicação do mesmo volume de perilinfa artificial (Fig. 3, controlo) tanto após administração local de salicilato (à esquerda, 5  $\mu$ L; 70 mg/mL; aplicação local) como também após administração sistémica (à direita, 350 mg/kg de peso corporal; aplicação sistémica) (coloração escura). Quando se utilizou amostras sense não se observaram quaisquer sinais de hibridação (dados não mostrados). Ao longo do eixo tonotópico a expressão de BDNF mostrou um decréscimo característico das torções basais/médio-basais para as torções mais apicais cocleares (Schimmang, T. *et al.* (2003) loc. cit.) e a subida induzida por salicilato no padrão de expressão influenciou primariamente as torções cocleares localizadas mais basalmente.

De modo a estudar possíveis diferenças nos padrões de activação de determinados transcritos de BDNF em diferentes níveis de excitação, analisou-se o efeito de vários doseamentos de salicilato que poderiam influenciar de forma diferente a excitabilidade neuronal; ver Kumagai (1992), *Effect of intravenous injection of aspirin on the cochlea*, Hokkaido Igaku Tasshi 67 (2), páginas 216 até 233; Stypulkowski (1990), *Mechanisms of salicylate ototoxicity*, Hear Res. 46 (1-2), páginas 113 até 145. Para isto estudou-se o efeito de *Gelfoams* aplicados localmente, embebidos com diferentes volumes (5, 10, 20  $\mu$ L) de 70 mg/mL de salicilato e paralelamente o efeito de diferentes concentrações de salicilato aplicado sistemicamente (250 mg/kg, 350 mg/kg, 500 mg/kg de peso corporal). Os transcritos de c-fos, BDNF-exão III e BDNF-exão IV nos tecidos cocleares foram estudados utilizando-se a análise por RT-PCR semi-quantitativo dos ARNs totais (Fig. 4).

Verificou-se, de forma interessante, um efeito de salicilato dependente da dose para ambos os métodos de aplicação que, em comparação com o GAPDH, conduziu a leves alterações da regulação positiva da expressão de c-fos. Os maiores efeitos verificaram-se na aplicação de 5  $\mu$ L ou 10  $\mu$ L de salicilato na janela redonda ou numa injeção de 250 mg/kg ou 350 mg/kg de salicilato, enquanto para concentrações mais elevadas, em ambos os métodos de aplicação, se verificaram efeitos menos nítidos (Fig. 4A).

A utilização do mesmo molde de modo a amplificar o BDNF-exão III ou BDNF-exão IV revelou uma diferença nítida no padrão de activação dos diferentes genes dependentes da actividade.

Independentemente do método de aplicação, o BDNF-exão III foi activado com algum atraso após o BDNF-exão IV, o que resulta, para concentrações de salicilato mais elevadas, num pico da expressão do BDNF-exão III (Fig. 4B), enquanto tanto o c-fos (Fig. 4A) como também o BDNF-exão IV (Fig. 4C) reagem logo a doses mais reduzidas de salicilato. Obtiveram-se resultados comparáveis em três experiências, em duplicado, que confirmam a análise densitométrica que é mostrada na Fig. 4B, de acordo com a qual ocorre um aumento significativo da expressão do BDNF-exão IV ( $49^{\pm} 12\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ) e de c-fos ( $69^{\pm} 11\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ).

No córtex auditivo amplificou-se as variantes de *splicing* BDNF-exão III e BDNF-exão IV, o BDNF-exão V comum e transcritos de c-fos (dados não mostrados). Estudaram-se córtices auditivos que haviam sido obtidos de animais nos quais havia sido estudada a cóclea relativamente ao efeito dependente da dose do

salicilato, o ARNm foi isolado e foi realizada uma RT-PCR, tal como descrito em material e métodos.

Enquanto o salicilato aplicado localmente ou sistemicamente conduz ao aumento da expressão dos genes dependentes da actividade estudados na cóclea (Fig. 4), verificou-se, em três experiências independentes, em duplicado, que ambos os métodos conduzem a efeitos contrários sobre os genes dependente da actividade no córtex auditivo. Ao contrário do efeito sobre os neurónios cocleares, a aplicação local de todos os doseamentos de salicilato conduziu à redução da expressão de c-fos (Fig. 5A, à esquerda), de BDNF-exão III (Fig. 5B, à esquerda) e BDNF-exão IV (Fig. 5C, à esquerda).

Enquanto na cóclea se verificou um padrão de activação diferente para diferentes doseamentos e diferentes transcritos de BDNF, o efeito decrescente nas concentrações mais elevadas no córtex auditivo não foi tão inequívoco (Fig. 5A-C). Por meio de análise densitométrica confirmou-se que ocorre um decréscimo significativo da expressão de BDNF-exão IV ( $49 \pm 12\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ) e c-fos ( $69 \pm 11\%$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ).

Numa experiência adicional, a requerente estudou se o fenómeno da expressão aumentada de BDNF verificado, pela primeira vez, no caso de acufeno agudo pode ser anulado utilizando-se isradipina, um antagonista do canal  $Ca^{++}$  do tipo L e ser, deste modo, adequada uma substância correspondente para o tratamento de acufeno agudo, de um modo preferido na aplicação local, ou da dor fantasma.

Para o efeito, 22 horas antes da remoção de tecidos, foram aplicados localmente 10  $\mu$ L de solução a 0,9% de cloreto de sódio

(Fig. 6A, sol. salina) e 10  $\mu$ L de uma solução 10 mM de isradipina (Fig. 6B, isradipina) no nicho da janela redonda, isto é, antes da membrana da janela redonda. 3 horas antes da remoção de tecidos na cóclea injectou-se sistemicamente volumes idênticos de solução de cloreto de sódio (C) ou 350 mg/kg de peso corporal de salicilato (Scy). Após a remoção dos tecidos analisou-se a expressão de BDNF em ambas as abordagens.

Na Fig. 6 está representada a expressão do BDNF-exão IV sob as condições anteriormente mencionadas. Tal como esperado, o salicilato provoca uma regulação positiva de BDNF nos neurónios cocleares (Fig. 6A, faixa direita), enquanto na abordagem realizada de forma idêntica no grupo animal no qual havia sido aplicada isradipina em vez de solução de cloreto de sódio, é inibida a regulação positiva de BDNF.

A experiência anteriormente descrita e representada na Fig. 6 foi realizada sob condições idênticas também para um antagonista adicional do canal  $Ca^{++}$  do tipo L, a nifedipina. Neste caso, demonstrou-se igualmente um efeito inibitório sobre a expressão de BDNF aumentada após a indução de acufeno agudo nos neurónios cocleares, se bem que menos forte do que com a isradipina (dados não mostrados).

A requerente estudou ainda se a expressão aumentada de BDNF implicada com o acufeno agudo pode ser inibida pela administração de agonistas do receptor GABA, tal como as benzodiazepinas. Tal como já descrito anteriormente, foram aplicadas localmente, no nicho da janela redonda, quantidades crescentes de salicilato (Scy) a ratos fêmea. Verificou-se, neste caso, tal como esperado com base nas experiências anteriormente discutidas, um acréscimo da expressão do

transcrito de BDNF-exão-IV nos neurónios cocleares, e um decréscimo da expressão da proteína do citoesqueleto Arc dependente da actividade no córtex auditivo. A Fig. 7A mostra o resultado de uma RT-PCR representativa para  $n = 3$  com resultado comparável.

Numa abordagem experimental adicional aplicou-se sistemicamente 350 mg/kg de salicilato aos ratos. Tal como mostra a Fig. 7A para a aplicação local na janela redonda, a administração sistémica de salicilato conduz também a uma expressão aumentada de BDNF-exão IV (Fig. 7B, em cima) e, como esperado, de c-fos (Fig. 7C, em cima) em neurónios cocleares, enquanto no córtex auditivo primário é detectável um decréscimo da expressão de Arc (Fig. 7B, em baixo) e BDNF-exão-IV (não mostrado) e ocasionalmente de c-fos (Fig. 7C, em baixo).

Duas horas e meia depois da indução de acufeno agudo por injeção de 350 mg/kg de salicilato foi administrado sistemicamente aos animais midazolam (Dormicum, Roche, Grenzach-Wyhlen, Alemanha) (0,5 mg/kg de peso corporal) e estudou-se a expressão génica após remoção dos órgãos com auxílio de RT-PCR. Verificou-se, neste caso, que o midazolam (MDZ) conduz a uma redução significativa do efeito do salicilato sobre a expressão de BDNF-exão IV ( $n = 7$ ) nos neurónios cocleares e de Arc no córtex auditivo (Fig. 7B, barra direita,  $n = 12$ ), a expressão de c-fos não é contudo influenciada (Fig. 7C, barra direita,  $n = 7$  até 12). A avaliação estatística realizou-se com o teste T de Student; \* =  $p < 0,05$ .

Numa experiência adicional correspondente à anterior foi aplicado não sistemicamente, mas sim localmente no nicho da janela redonda, um agonista do receptor GABA sob condições de

resto idênticas. Verificou-se, neste caso, que a expressão aumentada de BDNF-exão IV nos neurónios cocleares associada ao acufeno agudo foi ainda mais fortemente inibida e os efeitos sobre a expressão de BDNF-exão-IV no córtex auditivo estavam nitidamente reduzidos.

A aplicação local de um antagonista de BDNF anula consequentemente a regulação errática patológica da expressão de BDNF observada no caso do acufeno agudo e da dor fantasma. A requerente pôde demonstrar, por conseguinte, que os antagonistas de BDNF são substâncias que são fundamentalmente adequadas para o tratamento de acufeno agudo.

A requerente pôde mostrar, pela primeira vez, que por meio de substâncias, que interagem com a cascata de transdução de sinais de BDNF, ou que inibem a mesma, é possível tratar eficazmente acufeno agudo e dor fantasma.

Lisboa, 28 de Junho de 2010

## REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um agonista do receptor GABA para a preparação de um produto farmacêutico para o tratamento local do acufeno agudo na zona do ouvido ou no ouvido num ser humano ou animal.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser previsto, como agonista do receptor GABA, uma benzodiazepina ou substâncias aparentadas com esta, que são seleccionadas, de um modo preferido, do grupo constituído por: midazolam, diazepam, flurazepam, oxazepam, nitrazepam, flunitrazepam, clonazepam, triazolam, clobazam e brotizolam.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por ser previsto, como agonista do receptor GABA, uma substância que é seleccionada do grupo constituído por: baclofeno, gama-vinil-GABA, gama-acetileno-GABA, progabida, muscimol, iboteno, valproato de sódio e tetra-hidroisoxazolopiridina (THIP).
4. Processo para o diagnóstico do acufeno agudo num ser animal ou humano, que apresenta os seguintes passos:
  - (a) preparação de uma amostra biológica proveniente do ouvido,
  - (b) determinação do nível da expressão de BDNF na amostra biológica,
  - (c) comparação do nível do passo (b) com um valor de referência de um ser vivo saudável, e

(d) correlação de um nível situado acima do de um ser saudável com um diagnóstico positivo.

Lisboa, 28 de Junho de 2010

Figura 1

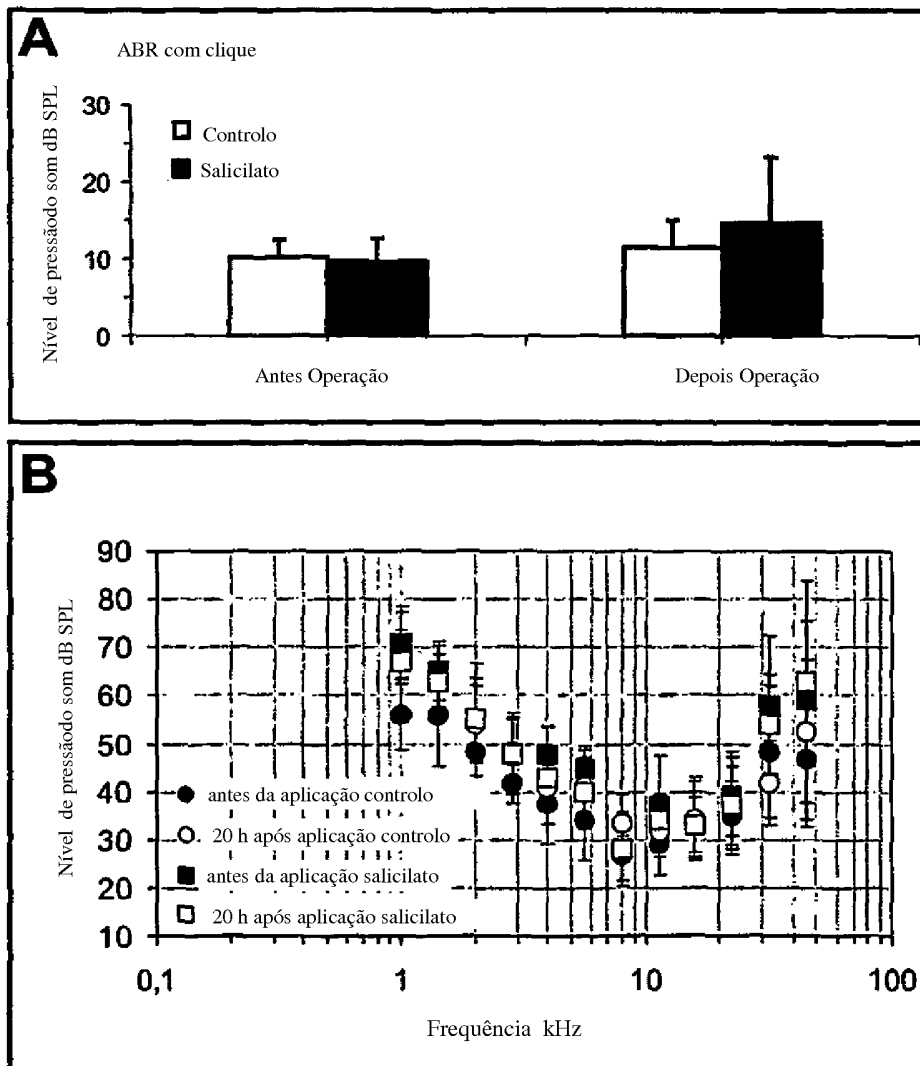


Figura 2

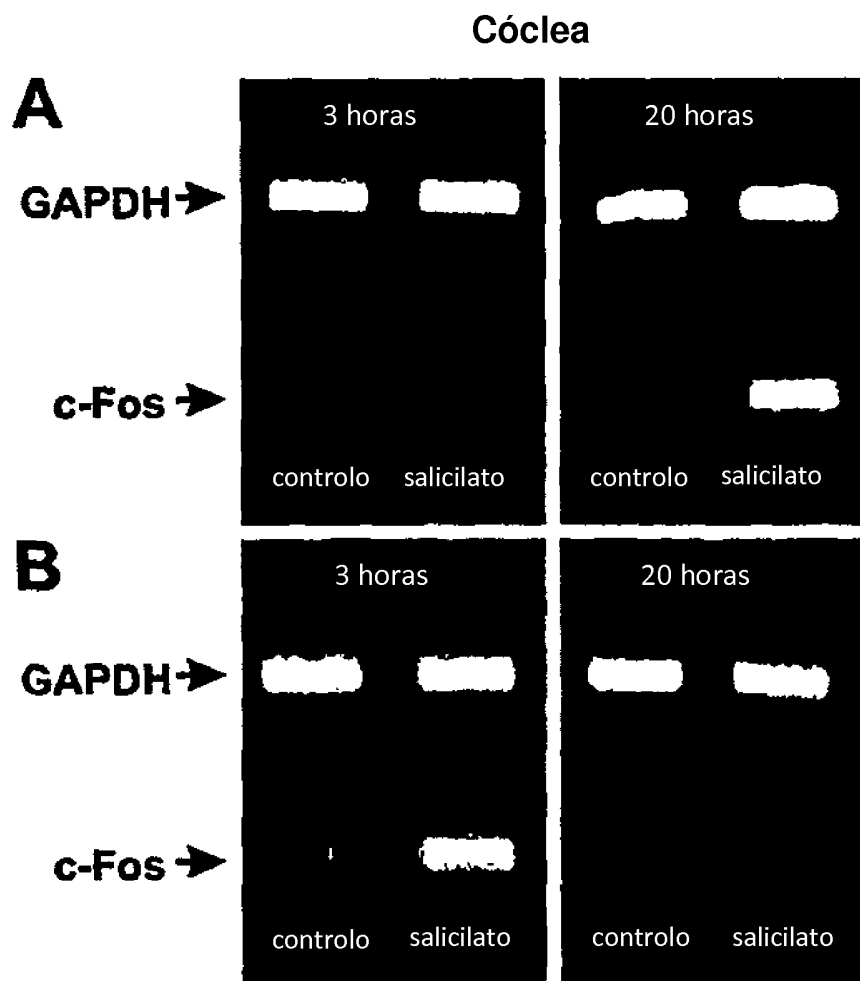


Figura 3

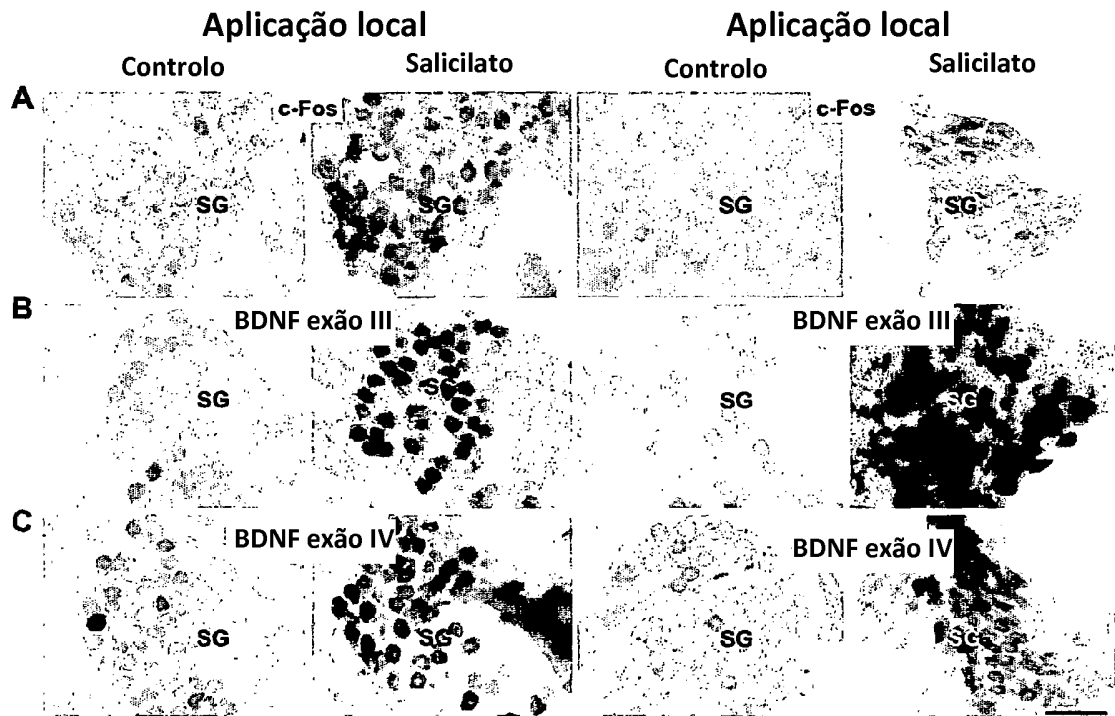


Figura 4

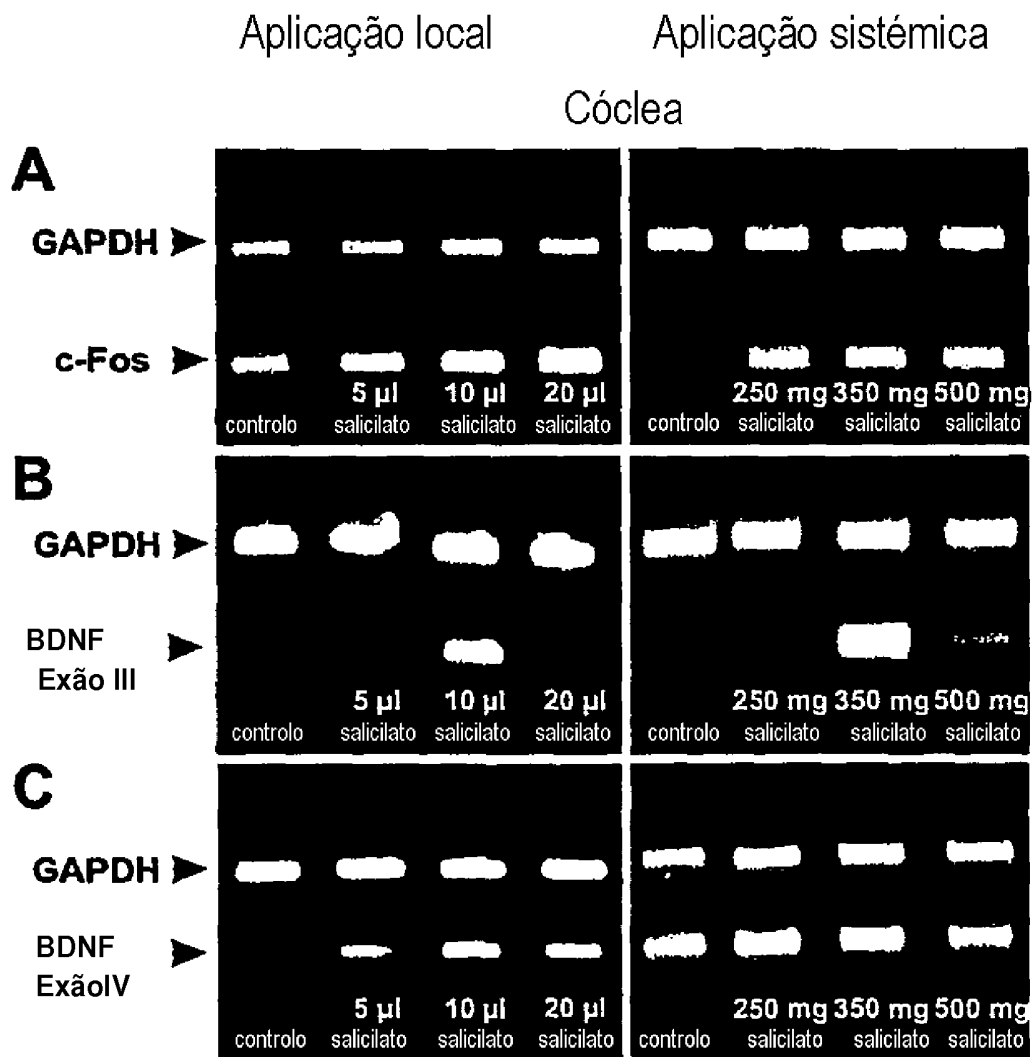


Figura 5

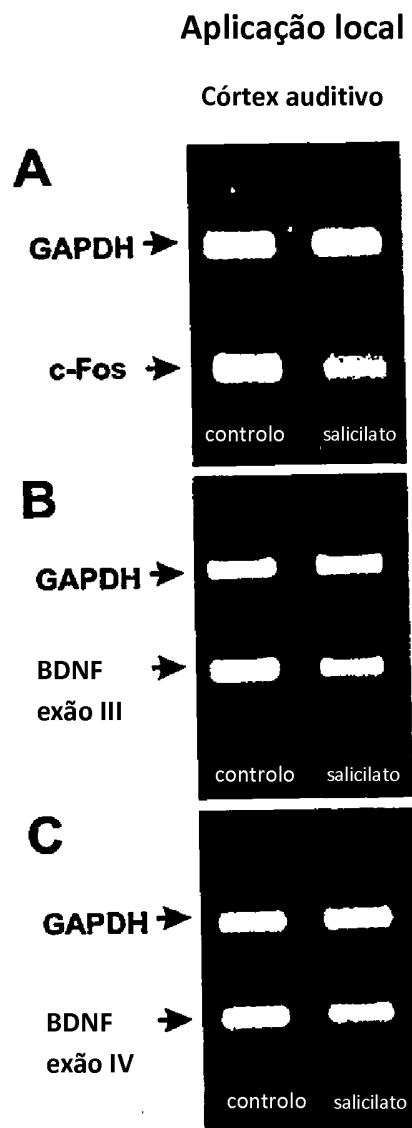


Figura 6

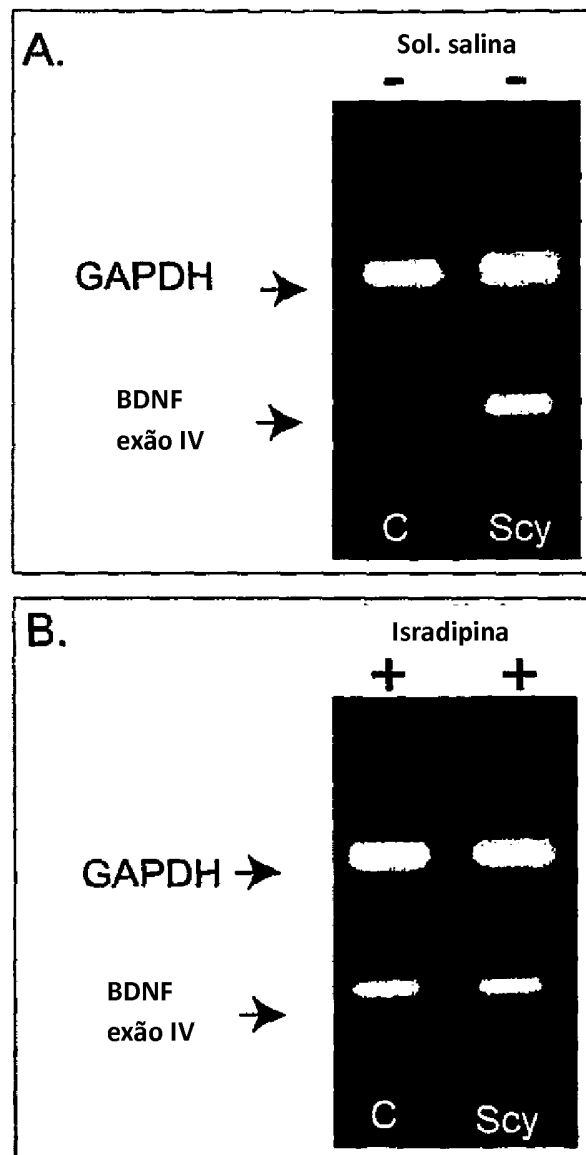


Figura 7

