

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/165** (2009.01) **A61K 31/381** (2009.01)  
**A61K 31/40** (2009.01) **A61P 25/30** (2009.01)  
**A61P 25/32** (2009.01) **A61P 25/34** (2009.01)  
**A61P 25/36** (2009.01) **A61K 45/06** (2009.01)  
**A61K 31/198** (2009.01)

(22) Data de pedido: **2005.04.19**

(30) Prioridade(s): **2004.04.22 EP 04009532**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.03.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.01.12**  
**047/2011**

(73) Titular(es):

**NEWRON PHARMACEUTICALS S.P.A.**  
**VIA ARIOSTO, 21 20091 BRESSO (MI)**

IT

(72) Inventor(es):

**LUCA BENATTI**  
**RUGGERO FARIELLO**  
**PATRICIA SALVATI**  
**FLORIAN THALER**  
**CLAUDIA BESANA**

IT

IT

IT

IT

IT

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**  
**AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE ALFA-AMINOAMIDA ÚTEIS NO TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES ADITIVAS**

(57) Resumo:

MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE CERTOS DERIVADOS DE ALFAAMINOAMIDA NO TRATAMENTO DE SPI E PERTURBAÇÕES ADITIVAS. OS COMPOSTOS DESTA INVENÇÃO SÃO CAPAZES DE REDUZIR OU MESMO SUSPENDER OS SINTOMAS DE SPI E PERTURBAÇÕES ADITIVAS SUBSTANCIALMENTE SEM EFEITOS SECUNDÁRIOS.

**RESUMO****"DERIVADOS DE ALFA-AMINOAMIDA ÚTEIS NO TRATAMENTO DE  
PERTURBAÇÕES ADITIVAS"**

Métodos de utilização de certos derivados de alfa-aminoamida no tratamento de SPI e perturbações aditivas. Os compostos desta invenção são capazes de reduzir ou mesmo suspender os sintomas de SPI e perturbações aditivas substancialmente sem efeitos secundários.

## DESCRIÇÃO

### **"DERIVADOS DE ALFA-AMINOAMIDA ÚTEIS NO TRATAMENTO DE PERTURBAÇÕES ADITIVAS"**

A invenção relaciona-se com derivados de  $\alpha$ -aminoamida, uma classe de químicos inibidores da monoamina oxidase B (MAOB), bloqueadores do canal de sódio, inibidores da recaptação da dopamina e moduladores dos níveis de glutamato para utilização no tratamento de perturbações aditivas.

## ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Tipicamente diferentes drogas (anfetaminas, cocaína, heroína, nicotina, álcool), mesmo com um alvo molecular primário diferente, têm em comum a acção de aumentar a transmissão de dopamina no sistema mesolímbico. Têm sido utilizadas diferentes abordagens no tratamento das perturbações aditivas e a sua maioria procura modular o sistema dopaminérgico.

Os inibidores da MAOB afectam o metabolismo da dopamina em seres humanos e primatas, conduzindo a um prolongamento do período de tempo da dopamina nos respectivos receptores. A utilização do inibidor da MAOB tem demonstrado ser benéfica no tratamento de patologias em que existe défice dopaminérgico, como é o caso da doença de Parkinson.

Novos dados apoiam a hipótese de os inibidores da MAOB poderem ser benéficos no tratamento de perturbações aditivas. Estudos realizados em ratos e em seres humanos

revelaram que a selegilina (um inibidor específico de MAOB) possui um moderado efeito anti-reforço durante a desintoxicação da cocaína e pode melhorar as deficiências de dopamina durante a privação, as quais, segundo se pensa, contribuem para os episódios de reincidência (Schiffer et al, 2003 Synapse 48:35-8). Houtsmuller et al. revela em *Psychopharmacology*, 172(1), 2004, 31-40 que a selegilina pode ser um composto útil no tratamento do abuso e dependência da cocaína.

Recentemente observou-se que os fumadores possuem uma actividade MAOB reduzida nas plaquetas e cérebro.

Colocou-se a hipótese de uma actividade MAOB reduzida no cérebro estar envolvida no aumento das propriedades aditivas da nicotina. Num estudo de fase II, multicêntrico, a lazabemida, outro inibidor MAOB (20 mg/dia) aparentemente aumenta a percentagem de abandono do hábito de fumar (entre 17 e 30%) (Berlin et al, 2002 *Addiction* 97:1347-1354). Tony et al. revela em *Biological Psychiatry*, 53(2), 2003, 136-143 que a selegilina aumenta as taxas de abandono do hábito de fumar.

Além disso, demonstrou-se também que os bloqueadores do canal de Na podem ser eficazes no tratamento de perturbações aditivas. Efectivamente, um recente estudo clínico demonstrou que o topiramato (um bloqueador do canal de Na) é eficaz no tratamento da dependência do álcool (Johnson et al, 2003, 50 *The Lancet* 361: 1677-1685).

Os actuais tratamentos das perturbações aditivas incluem fármacos antidepressivos, agonistas dos receptores opiáceos e agonistas parciais como naltrexona e buprenorfina, benzodiazepinas e dissulfiram para a

desintoxicação do álcool, As desvantagens destes tratamentos incluem vários efeitos secundários e uma eficácia terapêutica ainda insatisfatória.

Uma vez que existem sinais da potencial eficácia dos compostos com actividade inibidora MAOB e compostos com actividade bloqueante do canal sódio no tratamento de perturbações aditivas, é proposta a utilização de derivados de alfa-aminoamida, uma classe de químicos inibidores da monoamina oxidase B (MAOB), bloqueadores do canal de sódio da presente invenção no tratamento de perturbações aditivas.

Os documentos WO90/14334, WO94/22808, WO97/05102, WO 97/0511 e WO99/35215, divulgam compostos de benzilaminopropionamida substituída activos sobre o sistema nervoso central e úteis como agentes anti-epilépticos, anti-Parkinson, neuro-protectores, antidepressivos e antiespástico hipnótico (ver também Pevarello P. *et al.* (1998), *J. Med. Chemistry*, 41: 579-590). Os documentos WO99/35125 e WO99/35123 divulgam compostos de benzilaminopropanamida substituída activa sobre o sistema nervoso central e útil como agentes analgésicos.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona métodos rápidos e altamente eficazes para tratar perturbações aditivas utilizando, *in vivo*, certos compostos  $\alpha$ -aminoamida numa terapêutica que é uma alternativa superior aos tratamentos existentes.

Numa forma de realização, a invenção inclui a utilização de pelo menos um fármaco que é um composto  $\alpha$ -aminoamida seleccionado de:

2-(4-Benziloxibenzilamino)propanamida;

2-[4-(2-Metoxibenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

(S)-(+)-2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]  
propanamida

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-  
propanamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-N-metil-  
propanamida;

N-{2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]}propionil-  
pirrolidina;

2-[4-(3-Metoxibenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

(S)-(+)-2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]  
propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-  
propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-N-metil-  
propanamida;

N-{2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]}propionil-  
pirrolidina;

2-[4-(4-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-  
propanamida;

2-[4-(2-Clorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;

2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-hidroxi-propanamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-  
propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-  
propanamida;

2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-hidroxi-N-metil-  
propanamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-  
metil-propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;

2-[4-(2-Clorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;

2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;

2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-3-hidroxi-N-metil- propanamida;

2-[4-(3-Clorobenziloxi)-feniletilamino]propanamida;

2-{4-[2-(3-Fluorofenil)-etiloxi]benzilamino} propanamida;

2-{4-[2-(3-Fluorofenil)-etil]benzilamino}propanamida;

2-[N-(4-Benziloxibenzil)-N-metilamino]propanamida;

2-{4-[(3-Clorobenziloxi)-feniletil]-amino} propanamida;

2-[4-Benziltiobenzilamino]propanamida;

2-[4-(2-Fluorobenziltio)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziltio)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(3-Fenilpropiloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(4-Fenilbutiloxi)-benzilamino]propanamida;

2-[4-(5-Fenilpentiloxi)-benzilamino]propanamida;

2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-fenil-N-metil-  
propanamida;

2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-metil-N-metil-  
butanamida;

2-(4-Benziloxibenzilamino)-2-fenil-acetamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-  
acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-  
acetamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzil-N-metilamino]-2-  
fenil-acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzil-N-metilamino]-2-  
fenil-acetamida;

2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-  
acetamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(2-  
fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-(4-(2-Tieniloxi)-benzilamino)propanamida;

ou seus isómeros ópticos, misturas e sais farmacologicamente aceitáveis para a preparação de um medicamento para o tratamento de perturbações aditivas.

Os sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos da invenção incluem, por exemplo, sais de adição de ácido com ácidos inorgânicos, por exemplo, os ácidos nítrico, clorídrico, bromídrico, sulfúrico e fosfórico ou ácidos orgânicos, por exemplo, os ácidos acético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, tartárico, cítrico, succínico, benzóico, cinâmico, mandélico, metanossulfónico, p-toluenossulfónico e salicílico.

Alguns dos compostos da invenção podem ter átomos de carbono assimétricos e, portanto, podem existir tanto como misturas racémicas como isómeros ópticos individuais (enantiómeros). Em concordância, o termo "sais

farmaceuticamente aceitáveis" da  $\alpha$ -aminoamida da invenção também pretende incluir no seu âmbito todos os possíveis isómeros ópticos e suas misturas.

Os compostos preferidos que podem ser utilizados separadamente ou em combinação com outros compostos, numa quantidade eficaz para tratar um ou mais sintomas de SPI num doente são (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida ou (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida.

Numa forma de realização o doente a ser tratado é um mamífero, incluindo seres humanos, em necessidade de alívio, ou inibição dos sintomas de um ou vários sintomas de perturbações aditivas.

Em particular, ao mamífero em necessidade do tratamento acima mencionado deve ser administrada uma dose de uma  $\alpha$ -aminoamida da invenção conforme acima definido que varia de 0,3 a 100 mg/kg de peso corporal por dia. "Tratamento", conforme aqui utilizado, inclui quaisquer cuidados por procedimentos ou aplicações a um mamífero, e em particular, um ser humano, que são destinados a

a) evitar que a doença ou transtorno ocorra num indivíduo que pode estar predisposto à doença/transtorno, mas não foi ainda diagnosticado com a mesma; b) inibir a doença/transtorno ou estado patológico, isto é, deter o seu desenvolvimento; ou c) aliviar a doença/transtorno ou estado patológico, isto é, causando regressão da doença/transtorno ou estado patológico.

Num outro aspecto, a invenção inclui a utilização de uma das  $\alpha$ -aminoamidas listadas acima administradas como o agente activo de uma composição farmacêuticamente aceitável com actividade no tratamento de perturbações aditivas que pode ser preparada por meio de procedimentos convencionais, por exemplo, misturando o agente activo com um veículo ou materiais excipientes orgânicos e/ou inorgânicos, farmacêuticamente aceitáveis, terapeuticamente inertes.

Os compostos preferidos utilizados numa quantidade eficaz para tratar perturbações aditivas num doente são (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida ou (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida. Os compostos e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser obtidos por meio de processos bem conhecidos conforme descrito nos pedidos de patente descritos acima.

"Terapêutica de combinação" (ou "co-terapêutica") inclui a administração de um composto alfa-aminoamida da invenção e pelo menos um segundo agente, por exemplo:

- agonistas de dopamina tais como bromocriptina, cabergolina, lisurida, pergolida, ropinirole, apomorfina, sumanirole, rotigotina, talipexole, di-hidroergocriptina e pramipexole,
- levodopa, levodopa mais carbidopa (SINEMET®), levodopa mais carbidopa de libertação controlada (SINEMET-CR®), levodopa mais benserazida

(MADOPAR®), levodopa mais benserazida (MADOPAR-HBS) de libertação controlada,

- inibidores de COMT tais como tolcapone e entacapone, STALEVO®, Amantadina
- e agentes anticolinérgicos,

como parte de um regime de tratamento específico destinado a proporcionar o efeito benéfico da co-acção destes agentes terapêuticos. Os benefícios de tais combinações incluem a redução da dose de agentes convencionais (isto é, que não são os agentes da presente invenção) com a consequente redução dos efeitos secundários de tais agentes convencionais. O efeito benéfico das combinações incluem a co-acção farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação dos agentes terapêuticos. A administração destes agentes terapêuticos em combinação, tipicamente, é levada a cabo por um período de tempo definido (geralmente minutos, horas, dias ou semanas dependendo da combinação seleccionada). A "terapêutica de combinação" pode ser, mas em geral não é, destinada a abranger a administração de dois ou mais agentes terapêuticos como parte de regimes monoterapêuticos separados que, incidentalmente e arbitrariamente, resultam nas combinações levadas em consideração pela presente invenção. A "terapêutica de combinação" destina-se a adoptar a administração destes agentes terapêuticos numa maneira sequencial, isto é, em que cada agente terapêutico é administrado num tempo diferente, bem como a administração destes agentes terapêuticos, ou pelo menos dois dos agentes terapêuticos, de uma maneira substancialmente simultânea. A administração

substancialmente simultânea pode ser conseguida, por exemplo, administrando ao indivíduo uma cápsula única tendo uma proporção fixa de cada agente terapêutico ou em cápsulas múltiplas, únicas para cada um dos agentes terapêuticos. A administração sequencial ou substancialmente simultânea de cada agente terapêutico pode ser realizada por meio de qualquer via apropriada incluindo as vias orais, vias intravenosas, vias intramusculares e a absorção directa através de tecidos da membrana mucosa. Os agentes terapêuticos podem ser administrados pela mesma via ou por vias diferentes. Por exemplo, um primeiro agente terapêutico da combinação seleccionada pode ser administrado por injeção intravenosa ao passo que os outros agentes terapêuticos da combinação podem ser administrados oralmente.

Alternativamente, por exemplo, todos os agentes terapêuticos podem ser administrados oralmente, ou todos os agentes terapêuticos podem ser administrados por injeção intravenosa. A sequência na qual os agentes terapêuticos são administrados não é estritamente crítica. A "terapêutica de combinação" também abrange a administração dos agentes terapêuticos conforme descrito acima em combinação adicional com outros ingredientes biologicamente activos e terapêuticas não-farmacológicas (por exemplo, cirurgia ou tratamento por radiação). Em que a terapêutica de combinação compreende ainda um tratamento não-farmacológico, o tratamento não-farmacológico pode ser conduzido em qualquer momento adequado, desde que um efeito benéfico da co-acção da combinação de agentes terapêuticos e tratamento não-farmacológico seja

conseguido. Por exemplo, em casos apropriados, o efeito benéfico é ainda alcançado quando o tratamento não-farmacológico é temporariamente removido da administração dos agentes terapêuticos, talvez por dias ou mesmo semanas.

As composições de  $\alpha$ -aminoamidas da invenção podem ser administradas numa variedade de formas farmacêuticas, por exemplo, por via oral na forma de comprimidos, pastilhas, cápsulas, comprimidos revestidos com açúcar ou película, soluções líquidas, emulsões ou suspensões; por via rectal, na forma de supositórios; por via parentérica, por exemplo, por injeção intramuscular ou intravenosa ou perfusão; e por via transdérmica na forma de um sistema dérmico, pomada, emulsão, loção, solução, gel, creme e spray nasal.

Os veículo ou materiais excipientes orgânicos e/ou inorgânicos, farmacêuticamente aceitáveis, terapêuticamente inertes úteis na preparação de tais composições incluem, por exemplo, água, gelatina, goma arábica, lactose, amido, celulose, estearato de magnésio, talco, óleos vegetais, ciclodextrinas e polialquilenoglicóis. As composições de  $\alpha$ -aminoamidas podem ser esterilizadas e podem ainda conter componentes bem conhecidos dos especialistas na técnica, tais como, por exemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humedecedores ou emulsionantes, por exemplo, óleo de parafina, monooleato de manida, sais para ajustar a pressão osmótica e tampões.

Adicionalmente, as formas orais sólidas podem conter, juntamente com o agente activo, diluentes, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou de cálcio, e/ou polietileno glicóis; agentes de ligação, por exemplo, amidos, gomas arábicas, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinil pirrolidona; agentes de desagregação, por exemplo, um amido, ácido algínico, alginatos ou glicolato de amido sódico; misturas efervescentes; corantes; edulcorantes; agentes de humedecimento, tais como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias não-tóxicas e farmacologicamente inactivas utilizadas em formulações farmacêuticas. As preparações farmacêuticas podem ser preparadas de qualquer maneira conhecida, por exemplo, por meio de processos de mistura, granulação, formação de comprimido, revestimento com açúcar ou revestimento com película.

As formulações orais compreendem formulações de libertação sustentada que podem ser preparadas de uma maneira convencional, por exemplo, aplicando um revestimento entérico aos comprimidos e grânulos.

A dispersão líquida para administração oral pode ser, por exemplo, xaropes, emulsões e suspensões. Os xaropes podem ainda conter como veículo, por exemplo, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manitol e/ou sorbitol.

As suspensões e emulsões podem conter como veículo, por exemplo, uma goma natural, ágar, alginato de sódio pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou álcool polivinílico. As suspensões ou soluções para injeções intramusculares podem conter, juntamente com o composto activo, um veículo farmacologicamente aceitável, por exemplo, água esterilizada, azeite, oleato de etilo, glicóis, por exemplo, propileno glicol e, se desejado, uma quantidade adequada de cloridrato de lidocaína. As soluções para injeções intravenosas ou perfusões podem conter como veículo, por exemplo, água esterilizada ou, preferencialmente, podem ser na forma de soluções salinas estéreis, aquosas ou isotónicas.

Os supositórios podem conter, juntamente com o agente activo, um veículo farmacologicamente aceitável, por exemplo, manteiga de cacau, polietileno glicol, um tensoactivo de éster de ácido gordo de polioxietileno sorbitano ou lecitina.

As composições incluindo as  $\alpha$ -aminoamidas da invenção são, em geral, na forma de uma dose unitária contendo, por exemplo, 20 a 7000 mg de ingrediente activo por forma de dosagem unitária. O tratamento adequado é dado 1 ou 2 ou 3 vezes ao dia, dependendo da taxa de eliminação. Em concordância, a dose desejada pode ser apresentada numa dose única ou como doses divididas administradas em intervalos apropriados, por exemplo, de duas a quatro ou mais sub-doses por dia.

As composições farmacêuticas incluindo uma  $\alpha$ -aminoamida da invenção podem conter, por unidade de dosagem, por exemplo, cápsula, comprimido, pó para injeção, colher de chá, supositório de 20 a 7000 mg do agente activo.

As doses óptimas terapeuticamente eficazes a serem administradas podem ser prontamente determinadas pelos especialistas na técnica e variarão, basicamente, com a concentração da preparação, com o modo de administração e com o avanço do estado ou transtorno inflamatório tratado. Além disso, factores associados com o indivíduo em particular sendo tratado, incluindo a idade, peso, dieta e tempo de administração do indivíduo, resultarão na necessidade em ajustar a dose a um nível apropriado terapeuticamente eficaz.

As vantagens das utilizações da invenção conforme definido acima são muitas e incluem a possibilidade de tratar basicamente todos os tipos sintomas de perturbações aditivas.

#### **EXEMPLO 1**

##### Estudo de interacção da cocaína com ratinhos

Tipicamente, as drogas psicoestimulantes aditivas, como as anfetaminas e cocaína, induzem um aumento da actividade locomotora em roedores e primatas. Alguns compostos com potenciais propriedades anti-aditivas podem prevenir o aumento da actividade locomotora induzida pelas drogas psicoestimulantes. (Katz JL, KopajticTA, Myers KA, Mitkus RJ, ChiderM, Behavioral effects of cocaine:

interactions with D1 dopaminergic antagonists and agonists in mice and squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Oct;291 (1):265-79).

O efeito dos compostos de ensaio é avaliado num modelo de ratinho de aumento da locomoção induzido por cocaína.

#### Método

Sujeitos: Ratinhos Swiss-Webster machos Aparelho: câmaras automatizadas com células fotoeléctricas

Fármacos: Cocaína 20 mg/kg administrada ip, compostos de ensaio dissolvidos em veículo administrados ip em doses diferentes (10-100 mg/kg) imediatamente antes da cocaína.

Teste comportamental: Animais (8 por grupo experimental) receberam injeção ip de cocaína (20 mg/kg) ou soro fisiológico e qualquer um dos compostos de ensaio ((10-100 mg/kg ip) ou respectivo veículo e registou-se a actividade locomotora durante 1 hora.

#### Análise dos dados

Tempo: Registou-se em gráfico a actividade média (+ SEM) com veículo, apenas cocaína e cada dose do composto de ensaio isolado + cocaína por períodos de 10 min.

Efeito máximo: O período de 30 min em que a cocaína (20 mg/kg) produz a actividade máxima é utilizado para determinar o efeito do composto de ensaio. Efectua-se uma transformação log10 das contagens médias do período de 30 min para cada sujeito a fim de homogeneizar as variâncias para análises posteriores. Procedeu-se a uma análise estatística ANOVA e compara-se o veículo e cada dose do composto de ensaio + cocaína com apenas cocaína para determinar os efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) da dose. Realizou-se uma regressão linear utilizando o método dos

"quadrados mínimos"; é feita uma regressão das contagens médias do período de 30 min por sujeitos ao longo da porção descendente da curva contra a  $\log_{10}$  da dose do composto de ensaio. A AD50 (dose que atenua a estimulação induzida por cocaína em 50%) é determinada a partir da análise de regressão linear.

## **EXEMPLO 2**

### Análise de discriminação rato droga no rato

As tarefas de discriminação da droga (Drug Discrimination - DD) consistem num procedimento para avaliação da capacidade de um composto para substituir um fármaco psicoativo (tal como uma droga). O rato aprende a utilizar estímulos interoceptivos farmacológicos para indicar de entre dois ou três manipulanda quais irão fornecer comida (aprendizagem dependente do estado). Estas tarefas constituem o melhor modelo animal para examinar efeitos "subjectivos" do fármaco. Além disso, os procedimentos DD podem ter a capacidade para, em determinados casos, medir de modo independente vários efeitos subjectivos diferentes de um fármaco, incluindo alguns que promovem o abuso de drogas (euforigénicos) e outros que detêm o abuso de drogas (nocioceptivos).

Os efeitos potenciadores ou preventivos do abuso de drogas dos compostos de ensaio são avaliados num modelo de discriminação da cocaína em ratos.

(Colpaert FC (1986) Drug discrimination: behavioral, pharmacological and molecular mechanisms of discriminative drug effects, in Behavioral Analysis Of Drug Dependence, Goldberg SR and Stolerman IP eds, pp 161-193, Academic Press, Orlando).

### Métodos

**Sujeitos:** Foram conduzidos estudos em ratos Sprague-Dawley machos. Todos os animais são alojados num viveiro com temperatura e humidade controlada, com um ciclo de 12 horas luz/escurecimento (luzes ligadas às 7 horas da manhã). Todas as experiências são conduzidas durante a fase de luz do ciclo luz/escuro, entre as 8 da manhã e as 3 horas da tarde. Os ratos foram mantidos a aproximadamente 80-85% do peso corporal *ad lib*.

**Discriminação da Cocaína.** Os ratos são alimentados diariamente com cerca de 15 g de ração de laboratório padrão pelo menos 30 min depois do teste, mantendo-os nos respectivos pesos individuais ao longo do estudo. Os sujeitos são diariamente testados em câmaras de condicionamento operante com duas alavancas. Existe ruído branco durante o teste para mascarar sons estranhos. A iluminação ambiente é feita com uma lâmpada em cima, ao centro do painel frontal (luz doméstica). As alavancas estão dispostas com um intervalo de 17 cm, com pares de lâmpadas (díodos emissores de luz, LEDs) sobre cada uma das alavancas, também no painel frontal. As respostas reforçadas dispõem uma bola de 45 mg numa bandeja de alimento centrada entre as alavancas, no painel frontal da câmara. Os sujeitos são inicialmente treinados para carregar em ambas as alavancas num programa de proporção fixa de 10 respostas (FR 10) de reforço com alimento e para discriminar injeções i.p. de 29  $\mu\text{mol/kg}$  de cocaína (10 mg/kg) de injeções i.p. de soro fisiológico. Depois da injeção de cocaína, as respostas em apenas uma das alavancas são reforçadas, depois da injeção com soro fisiológico são reforçadas as respostas na outra alavanca.

A atribuição das alavancas apropriadas para cocaína ou para soro fisiológico são contrabalançadas em todos os ratos. Imediatamente após a injeção, os ratos são colocados dentro de câmaras experimentais. Um período de 5 min de repouso, durante o qual a luz e os LEDs estão apagados e as respostas não comportam consequências programadas precede a iluminação da luz e dos LEDs. Apenas as respostas na alavanca adequada são reforçadas e as respostas na alavanca inadequada reinicia o requisito de resposta FR. Cada apresentação de comida é seguida de um período de repouso de 20 s, durante o qual todas as luzes estão apagadas e as respostas não são seguidas de consequências programadas. As sessões terminam após 20 apresentações de comida ou 20 min, o que ocorrer primeiro. Sessões de treino com injeções de cocaína (C) e soro fisiológico (S) são conduzidas diariamente, durante 5 dias por semana e numa sequência de dupla alternância (por exemplo SCCS).

Os testes foram iniciados quando os desempenhos atingem critérios de pelo menos 85% de resposta adequada global e durante os primeiros FR 10 da sessão durante quatro sessões consecutivas. Doses seleccionadas dos compostos de ensaio foram administradas po em alturas diferentes, até 360 min após a injeção para examinar a evolução no tempo dos efeitos do estímulo de discriminação. Depois de uma sessão de ensaio, espera-se que o sujeito cumpra os critérios de desempenho anteriormente mencionados durante duas sessões de treino consecutivas (cocaína e soro fisiológico) para ser novamente submetido ao teste. São conduzidas sessões de ensaio repetidas com pelo menos duas sessões de treino

entre cada ensaio até estarem determinados os efeitos integrais da dose em cada sujeito. As sessões de teste são idênticas às sessões de treino, com a única exceção de 20 respostas consecutivas em qualquer alavanca são reforçadas.

Para cada um dos ratos estudados no procedimento de discriminação da cocaína, calculam-se a taxa de respostas global e a percentagem de respostas que ocorre na alavanca apropriada da cocaína. Os valores médios são calculados para cada medição em cada dose de fármaco. Se menos de metade dos ratos respondeu a uma dose particular, não se calcula o valor médio para a percentagem de respostas apropriadas à cocaína a essa dose. Adoptou-se como critério de conservação pelo menos 20% de respostas apropriadas à cocaína, para assumir uma diferença significativa do soro fisiológico; 80% ou mais de respostas apropriadas à cocaína é tomado como semelhante à dose de treino da cocaína e níveis intermédios de respostas apropriadas à cocaína são considerados substituição parcial.

Análise dos dados. Os resultados dos estudos de discriminação da cocaína são avaliados com dados recolhidos durante toda a sessão, que duram no máximo 20 min.

Se um sujeito específico não completar um programa a taxa fixa durante os testes, os respectivos dados são incluídos na média da taxa de respostas mas não são incluídos na média da percentagem de respostas na alavanca da cocaína. Calcula-se um valor ED50 utilizando análise de regressão linear para os compostos de ensaio que substituem a cocaína (>80% de respostas apropriadas ao

fármaco). Para os compostos de ensaio que substituem parcialmente a cocaína (>20% e <80% de respostas apropriadas) a menor dose que produz substituição máxima e a percentagem dada. Para os compostos que não substituem a cocaína (<20% resposta apropriada ao fármaco) é calculada a maior dose testada.

### **EXEMPLO 3**

#### Teste de auto-administração no rato

O teste de auto-administração de fármaco é um método muito divulgado para estudar as propriedades de reforço de uma droga (como a cocaína) e os efeitos de vários compostos nestas propriedades de recompensa. Neste teste, o rato é treinado para "trabalhar" a fim de receber uma administração oral ou intravenosa de drogas. Este método comportamental permite avaliar se um composto de ensaio tem algum efeito nas propriedades de reforço de uma droga indutora de dependência. (Caine S.B.; Lintz R; Koob G.F.: Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: Behavioral Neuroscience: A Practical Approach. ed. por A. Sahgal pp 117-143, Oxford University Press, Nova Iorque. 1993; Fischman MW, Behavioral pharmacology of cocaine J.Clin Psychiatry. 1988 Fev; 49 Supl:7-10).

Método

Sujeitos

Ratos Sprague - Dawely machos, com peso entre 350-400 g são alojados em grupos de 3 numa gaiola e é-lhes fornecida acesso *ad libitum* a alimento e água e são mantidos num ciclo de 12 h luz-escuridão.

Auto-Administração

Todos os animais foram cirurgicamente implantados com um cateter jugular silástico sob anestesia com quetamina (60 mg/kg IP) e pentobarbital de sódio (20 mg/kg ip). O cateter passou subcutaneamente para uma porção exposta do crânio onde fica fixo com acrílico dentário a quatro parafusos de aço inoxidável inseridos no crânio. À altura de sessão de auto-administração (normalmente 6 dias por semana) o cateter é ligado a um sistema giratório através de uma mola metálica, que está, por sua vez, ligada a uma bomba de perfusão.

Sete dias após a cirurgia, os animais são deixados aceder durante 2 h por dia a uma alavanca metálica montada na parede lateral de uma gaiola de condicionamento operante normalizada, a 3 cm do chão da gaiola. A força necessária para carregar na alavanca é, em média, de 30 gramas (entre os 25 e os 35 gramas em gaiolas diferentes). As próprias gaiolas são colocadas dentro de salas com amortecimento sonoro. Encontram-se duas alavancas em cada câmara operante, uma alavanca produz uma perfusão de droga, enquanto a outra permanece inactiva ao longo de todas as sessões. A alavanca activa resulta numa injeção intravenosa de 0,1 ml de cloridrato de cocaína (0,50 mg/kg/injeção) dissolvido em 0,9% de soro fisiológico e administrada ao longo de 4s. Um sistema giratório permite que o animal se desloque livremente na gaiola. Coincidindo com o início da injeção, é ligada uma luz de estímulo, localizada 1 cm acima da alavanca na mesma parede lateral da câmara operante durante 20s, durante esse período a alavanca permanece inactiva. Carregar na alavanca enquanto a luz do sinal estava apagada foi reforçado segundo um programa de reforço contínuo (taxa fixa 1, FR-1)- Assim

que os animais revelaram consumo estável da droga ao longo de três dias (um intervalo de menos de 15% do consumo diário ao longo de três dias) o programa de auto-administração é trocado por um FR10 até estabilizar (15-20 dias) e depois dá-se início ao estudo. Num dia de ensaio, os animais são submetidos a um pré-tratamento imediatamente antes do início da sessão com o composto de ensaio. São utilizadas doses diferentes do composto de ensaio. Cada dose é testada apenas uma vez por cada animal utilizando um esquema do quadrado latino. Pelo menos dois dias de auto-administração de referência separam os dias de ensaio da droga.

#### Análise dos dados

O número total de reforços ganhos durante a sessão de 120 min é registado e computa-se a análise estatística dos dados utilizando uma análise de variância factorial de um factor com medições repetidas (ANOVA) ou teste t de Student quando apropriado. Comparações de médias individuais são efectuadas com o teste *a posteriori* de Newman-Keuls.

#### **EXEMPLO 4**

##### Sensibilização comportamental induzida pela cocaína em ratos.

A dependência de drogas é um comportamento patológico caracterizado por uma procura e consumo compulsivo de droga. Um modelo animal destas alterações comportamentais consiste no aumento duradouro da actividade locomotora induzida pela administração repetida de drogas psicoestimulantes em roedores (Robinson et al., 1993) conhecida como sensibilização comportamental induzida por drogas. O efeito dos compostos de ensaio é avaliado num

modelo de sensibilização comportamental induzida por cocaína.

#### Método

**Sujeitos:** São utilizados ratos Wistar machos entre 200-250 g de peso à chegada.

Dispositivo para avaliação da actividade locomotora. A actividade locomotora é medida em dezasseis gaiolas idênticas em arame metálico, pendentes, medindo cada uma 36 cm (L) x 25 cm (L x 20 cm (A). Cada gaiola continha dois conjuntos de células fotoeléctricas emissoras-detectoras de infravermelhos, posicionadas ao longo do eixo longitudinal 1 cm acima da grelha do chão e a 8 cm da parte da frente e parte de trás da gaiola. O ruído de fundo é criado por um gerador de ruído branco. O movimento no interior das gaiolas produziu interrupções das células fotoeléctricas, que ficam automaticamente registadas por um computador IBM compatível.

Procedimento de sensibilização e tratamento. Os animais são habituados às câmaras de actividade locomotora durante 2-3 dias consecutivos antes da experiência. Animais receberam 5 injeções ip diárias de cocaína (15 mg/kg) ou soro fisiológico e qualquer um dos compostos de ensaio (40-100 mg/kg ip) ou respectivo veículo e registou-se a actividade locomotora durante 3 horas. Dez dias depois da última injeção de cocaína ou de soro fisiológico (dia 15), os animais são desafiados com 15 mg/kg de cocaína na ausência do composto de ensaio e controla-se novamente a actividade locomotora durante 3 h.

No quinto dia de tratamento com cocaína, os animais submetidos a pré-tratamento ip com veículo revelaram uma resposta locomotora maior (20% superior ao primeiro dia, p

<0,05). Dez dias depois da última injeção de cocaína ou de soro fisiológico os animais são desafiados com 15 mg/kg de cocaína na ausência do composto de ensaio e controla-se novamente a actividade locomotora durante 3 h. Prevê-se que os ratos submetidos a tratamento prévio com cocaína e que não receberam o composto de ensaio revelem uma maior resposta em termos de actividade locomotora à cocaína (30 % maior do que no primeiro dia,  $p < 0,05$ ). Se os ratos que foram submetidos a pré-tratamento com o composto de ensaio durante os 5 dias de tratamento com cocaína não revelaram um aumento da actividade locomotora, o composto de ensaio é considerado como tendo um efeito na prevenção da toxicod dependência psicoestimulante. (Koob, G.F., Sanna, P.P. & Bloom, F.E. *Neuron* 21,467-476 1998; Robinson T.E. & Berridge K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 247-91, 1993)

Análise dos dados. Os dados (número total de interrupções do feixe em 3 horas) são analisados utilizando ANOVA em dois factores, com medições repetidas em um factor, incluindo os quatro grupos experimentais (isto é soro fisiológico/veículo, soro fisiológico/composto de ensaio, cocaína/veículo e cocaína/composto de ensaio) e dois momentos (dia 1 e dia 5), seguido de análise dos efeitos simples. Utiliza-se uma segunda análise ANOVA em dois factores com medições repetidas em um factor para comparar o dia 1 e o dia do desafio, seguido de um teste *post hoc* de Newman-Keuls.

#### **EXEMPLO 5**

Ensaio de discriminação de drogas em macacos

A discriminação da cocaína é uma análise comportamental amplamente utilizada para avaliar medicações de tratamento candidato. A potência e evolução temporal dos efeitos comportamentais do tipo da cocaína produzidos por uma administração aguda do composto de ensaio são determinadas neste procedimento. Especificamente, o composto de ensaio é administrado seja isoladamente seja como pré-tratamento da cocaína em macacos rhesus treinados para discriminar 0,4 mg/kg de cocaína do soro fisiológico.

#### Método

**Sujeitos:** Os sujeitos são macacos rhesus machos adultos (Macaca mulatta). Os macacos são mantidos com uma dieta de 3-4 biscoitos para macaco (Purina Monkey Chow Jumbo ref<sup>a</sup> 5037) e um pedaço de fruta fresca por dia para além de granulado com sabor a fruta fornecido durante as sessões operantes. A água encontra-se livremente à disposição para todos os macacos a qualquer altura. Os macacos são alojados numa sala com temperatura e humidade controlada, com um ciclo de 12 horas luz/escuridão (luzes ligadas das 7 horas da manhã até às 7 horas da tarde).

**Aparelho.** Cada macaco é alojado individualmente numa câmara em aço inoxidável bem ventilada (56 x 71 x 69 cm). As gaiolas de alojamento de todos os macacos são modificadas para incluir um painel operante (28 x 28 cm) montado na parede da frente. Três teclas de resposta quadradas, translúcidas (6,4 x 6,4 cm) encontram-se dispostas com um intervalo de 2,54 cm, numa linha horizontal de 3,2 cm a contar do topo do painel operante. Cada tecla pode ser iluminada por luzes de estímulo vermelhas ou verdes (LEDs superbrihantes). O painel

operante pode ainda suportar um dispensador de granulado montado exteriormente (Gerbrands, Model G5210) que fornece 1 g de granulado alimentar para um receptáculo de alimento montado na gaiola sob o painel de resposta operante. O funcionamento dos painéis operantes e a recolha dos dados são realizados com um computador localizado numa sala separada.

Treino da discriminação. Os procedimentos de discriminação da droga são semelhantes aos utilizados noutros estudos (Lamas X, Negus SS, Hall E e Mello NK (1995) da relação entre os efeitos do estímulo discriminante e concentrações de cocaína intramuscular no plasma de macacos rhesus. *Psychopharmacology* 121:331-338; Negus SS, Mello NK, Portoghesi PS, Lukas SE and Mendelson JH (1995) Role of delta opioid receptors in the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 1245-1256.; Negus SS, Mello NK, Lamas X and Mendelson JH (1996) Acute and chronic effects of flupenthixol on the discriminative stimulus and reinforcing effects of cocaine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 879-890.

As sessões de discriminação consistem em múltiplos ciclos e são conduzidos 5 dias/semana. Cada ciclo consistiu num período de repouso de 15 min, seguido de um período de resposta de 5 min. Durante o período de repouso, todas as luzes de estímulo encontram-se desligadas e as respostas não tinham qualquer consequência programada. Durante o período de resposta, as teclas de resposta direita e esquerda são iluminadas com cor vermelha ou verde e os macacos podem receber até 10 bolinhas de alimento ao responder sob programa de taxa

fixa (FR) igual a 30 de apresentação de alimento. Para um grupo de macacos, a tecla da esquerda é iluminada com cor verde e a tecla da direita é iluminada com cor vermelha. Para o outro grupo de macacos, as cores das teclas de resposta encontram-se invertidas. A tecla central nunca é iluminada e a resposta na tecla do centro não provoca qualquer consequência programada. Se todo o granulado de alimento disponível for apresentado antes do fim do período de resposta de 5 min, são desligadas as luzes de estímulo que iluminam as teclas de resposta e as respostas seguintes não têm consequências programadas durante o resto do período de resposta. Nos dias de treino, os macacos recebem uma injeção i.m. de soro fisiológico ou 0,40 mg/kg de cocaína, 5 min após o início de cada período de repouso (isto é, 10 min antes do período de resposta). Depois de administrado o soro fisiológico, só as respostas na tecla verde (tecla apropriada para o soro fisiológico) apresentam alimento, enquanto a seguir à administração de 0,40 mg/kg de cocaína só a resposta na tecla vermelha (tecla apropriada para a droga) apresenta alimento. Respostas na tecla errada reiniciam o requisito FR na tecla apropriada. As sessões diárias consistem em um a cinco ciclos e se a dose de treino de cocaína for administrada, é administrada apenas durante o último ciclo. Deste modo, os dias de treino consistem em 0-5 ciclos de soro fisiológico seguidos de 0-1 ciclos da droga.

Durante o período de resposta de cada ciclo, são determinadas três variáveis dependentes: 1) percentagem da resposta apropriada à injeção antes da aplicação do primeiro reforço [(respostas apropriadas à injeção dadas

antes do 1º reforço/total de respostas dadas antes do 1º reforço) x 100]; 2) percentagem de respostas apropriadas à injeção durante todo o período de resposta [(respostas apropriadas à injeção dadas durante o período de resposta/total de respostas dadas durante o período de resposta) x 100] e 3) taxa de respostas (total de respostas dadas durante o período de resposta/total de tempo em que as luzes de estímulo foram acendidas). Considerou-se que os macacos adquiriram discriminação da cocaína quando os seguintes três critérios foram cumpridos por sete de oito sessões de treino consecutivas: 1) a percentagem de respostas apropriadas à injeção antes da aplicação do primeiro reforço é maior ou igual a 80% para todos os ciclos; 2) a percentagem de respostas apropriadas à injeção para todo o ciclo é maior ou igual a 90% para todos os ciclos e 3) pelo menos uma bolinha é ganha durante todos os ciclos de treino.

Treino da discriminação. Assim que os macacos cumprem os critérios de discriminação da cocaína, dá-se início aos testes. As sessões de teste são idênticas às sessões de treino com excepção da resposta a qualquer uma das teclas apresentar alimento e a cocaína ou os compostos de ensaio serem administrados como descrito abaixo. Foram conduzidas duas séries de experiências para caracterizar os efeitos do composto de ensaio administrado isoladamente ou como cocaína em pré-tratamento. Na primeira série de experiências, foi determinado o tempo dos efeitos do composto de ensaio. Uma única dose do composto de ensaio (1 - 100 mg/kg) é administrada no início da sessão de teste e iniciam-se períodos de resposta de 5 min após 10, 30, 100 e 300 min. Na segunda série de experiências, foram

determinados os efeitos do pré-tratamento do composto de ensaio na discriminação da cocaína. Uma única dose do composto de ensaio é administrada numa altura apropriada antes da sessão de ensaio em que se determina a curva dose-efeito cumulativa da cocaína (0,013-1,3 mg/kg). Em geral, a droga do ensaio é avaliada até doses que produzem uma alteração significativa da curva dose-efeito da cocaína ou diminuem as taxas de resposta para menos de 0,1 respostas/seg, média calculada ao longo de toda a sessão.

Análise dos dados. A percentagem de resposta apropriada à cocaína (na totalidade do período de resposta) e as taxas de resposta encontram-se registadas em gráficos em função do tempo após administração do composto de ensaio (para estudos da evolução do tempo) ou a dose cumulativa de cocaína (para os estudos de pré-tratamento do composto de ensaio). A percentagem de resposta apropriada à cocaína para um dado ciclo foi incluída na análise apenas caso o macaco dê pelo menos 30 respostas durante o ciclo (isto é, respostas suficientes para resultar na apresentação de um reforço). São definidos valores ED50 como sendo a dose do composto de ensaio ou cocaína que produz 50% de resposta apropriada à cocaína e são calculados pela interpolação linear a partir de curvas dose-efeito por sujeito individual. Para cada composto de ensaio foram calculados os valores ED50 a partir dos dados obtidos no momento aproximado do pico de efeito.

#### **EXEMPLO 6**

##### Teste de auto-administração no macaco

Os procedimentos de auto-administração em animais de laboratório são frequentemente utilizados para avaliar

medicações candidatas à gestão da dependência da cocaína e drogas estimulantes psicomotoras relacionadas. Normalmente, as experiências são conduzidas para determinar a forma como as drogas alteram as taxas de resposta ou o número de injeções i.v. num único programa, com reforços em consequência de um número fixo e progressivamente crescente de respostas, isto é taxa fixa (FR) ou programas de taxa progressiva (Mello NK and Negus SS (1996) Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self administration procedures. *Neuropsychopharmacology* 14:375-424). Nesta pesquisa, a comparação das alterações entre o comportamento de auto-administração e desempenho mantido por outro reforço, tal como apresentação de alimento, pode proporcionar uma escala de selectividade comportamental nos efeitos de uma medicação candidata (Woolverton WL (1996) Intravenous self-administration of cocaine underconcurrent VI schedules of reinforcement. *Psychopharmacology* 127:195-203.; Negus SS, Brandt MR, and Mello NK (1999) Effects of the long-acting monoamine reuptake inhibitor indatraline on cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 291:60-69; Caine SB, Negus SS, and Mello NK (2000) Effects of dopamine D1-like and D2-like agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology* 148:41-51).

#### Método

**Sujeitos:** Os sujeitos são macacos rhesus machos adultos (*Macaca mulatta*). Os macacos são mantidos com uma dieta de 3-4 biscoitos para macaco (Purina Monkey Chow

Jumbo ref<sup>a</sup> 5037) e um pedaço de fruta fresca por dia para além de granulado com sabor a fruta fornecido durante as sessões operantes. A água encontra-se livremente à disposição para todos os macacos a qualquer altura. Os macacos são alojados numa sala com temperatura e humidade controlada, com um ciclo de 12 horas luz/escurecimento (luzes ligadas das 7 horas da manhã até às 7 horas da tarde).

Procedimentos cirúrgicos. Cateteres em borracha de silicone de duplo lúmen (i.d. 0,7 mm o.d. 2,0 mm) foram implantados na veia jugular ou femoral, saindo na região escapular média. Todos os procedimentos cirúrgicos são executados em condições assépticas. Os macacos são inicialmente sedados com quetamina (5 mg/kg) e é induzida anestesia com tiopental de sódio (10 mg/kg, i.v.). Além disso, os macacos são tratados com 0,05 mg/kg de atropina para reduzir salivação. Na sequência da inserção do tubo traqueal, é mantida a anestesia com isoflurano (1-1,5% em oxigénio). Depois da cirurgia administra-se Aspirina ou acetaminofeno (80-160 mg, p.o.) durante 3 dias. Administra-se um antibiótico procaína penicilina G (300.000 U/dia, i.m.) todos os dias durante 5 dias. O cateter i.v. é protegido por um sistema de fixação que consiste num colete de nylon ajustado à medida ligado a um cabo de aço inoxidável flexível e pivô de fluidos (Lomir Biomedical, Malone, NI). Este sistema de fixação flexível permite liberdade de movimentos aos macacos. A patência do cateter é avaliada periodicamente por administração i.v. de um barbitúrico de curta duração, meto-hexital (3 mg/kg, i.v.) O cateter é considerado patente se a administração i.v. de meto-hexital produz uma perda do tonos muscular no espaço de 10 s.

Aparelho comportamental: Cada macaco é alojado individualmente numa câmara em aço inoxidável bem ventilada (64 x 64 x 79 cm). As gaiolas de alojamento de todos os macacos são modificadas para incluir um painel operante (28 x 28 cm) montado na parede da frente. Três teclas de resposta quadradas, translúcidas (6,4 x 6,4 cm) encontram-se dispostas com um intervalo de 2,54 cm, numa linha horizontal de 3,2 cm a contar do topo do painel operante. Cada tecla pode ser iluminada por luzes de estímulo vermelhas ou verdes (LEDs superbrihantes). O painel operante pode ainda suportar um dispensador de granulado montado exteriormente que fornece 1 g de granulado alimentar com sabor a fruta para um receptáculo de alimento montado na gaiola sob o painel de resposta operante. Além disso, duas bombas de seringa (modelo B5P-IE; Braintree Scientific, Braintree, MA, ou modelo 980210; Harvard Apparatus, South Natick, MA) encontram-se montados em cima de cada gaiola para administração de soro fisiológico ou soluções da droga através dos dois lúmen dos cateteres i.v. O funcionamento dos painéis operantes e a recolha dos dados são realizados com um computador localizado numa sala separada.

Procedimentos de treino iniciais. Os procedimentos para a avaliação das respostas mantidas por cocaína e alimento foram similares aos empregues noutros estudos (Negus SS, Mello NK, Portoghesi PS and Lin CE (1997) Effects of kappa opioids on cocaine self-administration by rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 282:44-55; Negus SS, Mello NK, Portoghesi PS, Lukas SE e Mendelson JH (1995) Role of delta opioid receptors in the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus

monkeys. J Pharmacol Exp Ther 273:1245-1256). Segundo um protocolo básico, o alimento e injeções i.v. encontram-se à disposição durante três componentes alternados. Tanto o alimento como as injeções i.v. encontram-se disponíveis segundo um programa de reforço FR30. Uma luz vermelha é associada à apresentação de alimento e uma luz verde é associada às injeções da droga. O componente de alimento e de droga são separados por um período de repouso de 5 min. A totalidade da sessão alimento-droga-alimento dura 120 min e é executada diariamente entre as 15 e as 17 horas. Durante o treino, a solução disponível para auto-administração durante o componente droga é alternada entre 0,032 mg/kg (inj de cocaína e soro fisiológico). Os macacos são treinados até cumprirem os seguintes critérios de auto-administração estável de cocaína: 1) 3 dias consecutivos durante os quais a taxa de resposta durante o componente droga de cada sessão difere em não mais de 20% da taxa de resposta do componente droga média; 2) extinção rápida do soro fisiológico, segundo a indicação de uma diminuição das taxas de resposta do componente droga no primeiro dia de substituição por soro fisiológico.

Teste de auto-administração. Assim que os macacos atingem os critérios de níveis estáveis elevados de auto-administração de cocaína e alimento, dá-se início aos testes utilizando sessões de substituição, nas quais doses diferentes de cocaína (0,00032-0,1 mg/kg/injeção) são substituídas pelas condições da dose de treino soro fisiológico/cocaína. A dose de manutenção de cocaína foi restabelecida depois de cada teste de substituição, durante um período de pelo menos 4 dias e até o número de

reforços por dia mantido pela cocaína e alimento regressar aos níveis de referência.

Avaliação do composto de ensaio. Os compostos de ensaio são avaliados utilizando um teste do procedimento do tratamento. Uma primeira experiência examina os efeitos de tratamento não-contingente com soro fisiológico ou composto de ensaio em respostas de alimento e de cocaína. Os compostos de ensaio são administrados i.m. (ou i.p. e p.o.) antes da sessão. Os compostos de ensaio serão administrados até doses que produzem ou uma mudança estatisticamente significativa no ramo ascendente da curva dose-efeito da auto-administração de cocaína ou eliminam as respostas durante o primeiro componente de alimento. Numa segunda experiência, pelo menos três doses dos compostos de ensaio são avaliadas como pré-tratamentos para uma dose unitária de cocaína no pico da curva dose-efeito da cocaína. Estes estudos iniciais são utilizados para identificar uma dose do composto de ensaio que seja activa do ponto de vista comportamental no procedimento de auto-administração da droga. Assim que a dose activa do ponto de vista comportamental da droga em ensaio é identificada, essa dose é administrada como pré-tratamento a uma série de diferentes doses unitárias de cocaína. Deste modo, pode ser determinado o efeito de uma dose activa do ponto de vista comportamental da droga de ensaio na totalidade da curva dose-efeito da cocaína. Outras doses dos compostos de ensaio podem ainda ser testadas.

Análise dos dados. O número total de injeções ou bolinhas de alimento apresentadas por dia pode ser determinado como a taxa de resposta. Os dados dos efeitos do composto de ensaio na auto-administração da cocaína são

avaliados utilizando ANOVA em um ou dois factores. Uma análise ANOVA significativa foi seguida de comparação das médias individuais utilizando o ensaio *post hoc* de Duncan. O critério da significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora muito cuidado tenha sido tomado na compilação das referências, erros e omissões não podem ser excluídos e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.*

**Documentos de Patente citados na descrição**

- WO 9014334 A [0009]
- WO 9422808 A [0009]
- WO 9705102 A [0009]
- WO 9705111 A [0009]
- WO 9935125 A [0009]
- WO 9935123 A [0009]

**Literatura não relacionada com patentes citada na descrição**

- Schiffer et al. Synapse, 2003, vol. 48, 35-8 [0004]
- Houtsmuller et al. Psychopharmacology, 2004, vol. 172 (1), 31-40 [0004]
- Berlin et al. Addiction, 2002, vol. 97, 1347-1354 [0006]
- Tony et al. Biological Psychiatry, 2003, vol. 53 (2), 136-143 [0006]
- Johnson et al. The Lancet, 2003, vol. 361, 1677-1685 [0007]
- Pevarello P. et al. J. Med. Chemistry, 1998, vol. 41, 579-590 [0010]
- Katz JL ; Kopajtic TA ; Myers KA ; Mitkus RJ ; Chider M. Behavioral effects of cocaine: interactions with D1

dopaminergic antagonists and agonists in mice and squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.*, October 1999, vol. 291 (1), 265-79 [0033]

- Drug discrimination: behavioral, pharmacological and molecular mechanisms of discriminative drug effects. Colpaert FC. *Behavioral Analysis Of Drug Dependence*. Academic Press, 1986, 161-193 [0041]

- Intravenous drug self-administration techniques in animals. Caine S.B.; Lintz R ; Koob G.F. *Behavioral Neuroscience: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1993, 117-143 [0048]

- Fischman MW. Behavioral pharmacology of cocaine. *J.Clin Psychiatry*, February 1988, vol. 49,7-10 [0048]

- Koob, G.F.; Sanna, P.P.; Bloom, F.E. *Neuron*, 1998, vol. 21,467-476 [0057]

- Robinson T.E.; Berridge K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, 1993, vol. 18, 247-91 [0057]

- Lamas X ; Negus SS ; Hall E ; Mello NK. relationship between the discriminative stimulus effects and plasma concentrations of intramuscular cocaine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology*, 1995, vol. 121,331-338 [0062]

- Negus SS; Mello NK; Portoghese PS; Lukas SE ; Mendelson JH. Role of delta opioid receptors in the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, vol. 273, 1245-1256 [0062] [0071]

- Negus SS ; Mello NK ; Lamas X ; Mendelson JH. Acute and chronic effects of flupenthixol on the discriminative stimulus and reinforcing effects of cocaine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, vol. 278, 879-890

[0062]

- Mello NK ; Negus SS. Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self administration procedures. *Neuropsychopharmacology*, 1996, vol. 14, 375-424 [0067]
- Woolverton WL. Intravenous self-administration of cocaine under concurrent VI schedules of reinforcement. *Psychopharmacology*, 1996, vol. 127,195-203 [0067]
- Negus SS ; Brandt MR ; Mello NK. Effects of the long-acting monoamine reuptake inhibitor indatraline on cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, vol. 291, 60-69 [0067]
- Caine SB; Negus SS; Mello NK. Effects of dopamine D1-like and D2-like agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology*, 2000, vol. 148, 41-51 [0067]
- Negus SS ; Mello NK ; Portoghese PS ; Lin CE. Effects of kappa opioids on cocaine self-administration by rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, vol. 282, 44-55 [0071]

**REIVINDICAÇÕES**

1. Utilização dos compostos seleccionados a partir de:

2-(4-Benziloxibenzilamino)propanamida;  
2-[4-(2-Metoxibenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
(S)-(+)-2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
(S)-(+)-2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-N-metil-propanamida;  
N-{2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]}propionil-  
pirrolidina;  
2-[4-(3-Metoxibenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-N-metil-propanamida;  
N-{2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]}propionil-  
pirrolidina;  
2-[4-(4-Fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-propanamida;  
2-[4-(2-Clorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-hidroxi-propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-propanamida;  
2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-hidroxi-N-metil-propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-  
propanamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;  
2-[4-(2-Clorobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;  
2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;  
2-[4-(3-Cianobenziloxi)-benzilamino]-2-metil-3-hidroxi-N-metil-propanamida;  
2-[4-(3-Clorobenziloxi)-feniletilamino]propanamida;  
2-{4-[2-(3-Fluorofenil)-etiloxi]benzilamino}propanamida;  
2-{4-[2-(3-Fluorofenil)-etil]benzilamino}propanamida;  
2-[N-(4-Benziloxibenzil)-N-metilamino]propanamida;  
2-{4-[(3-Clorobenziloxi)-feniletil]-amino}propanamida;  
2-[4-Benziltiobenzilamino]propanamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziltio)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziltio)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(3-Fenilpropiloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(4-Fenilbutiloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-[4-(5-Fenilpentiloxi)-benzilamino]propanamida;  
2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-fenil-N-metil-propanamida;  
2-(4-Benziloxibenzilamino)-3-metil-N-metil-butanamida;  
2-(4-Benziloxibenzilamino)-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]-2-fenil-acetamida;  
2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(2-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Fluorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-[4-(3-Clorobenziloxi)-benzilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;

2-(4-(2-Tieniloxi)-benzilamino)propanamida;

ou seus isómeros ópticos, misturas e sais farmacologicamente aceitáveis para a preparação de um medicamento para o tratamento das patologias aditivas.

2. Utilização do composto de acordo com o definido na reivindicação 1 que é (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida.

3. Utilização do composto de acordo com o definido na reivindicação 1 que é (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenziloxi)-benzilamino]propanamida.

4. Utilização dos compostos de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em combinação com agonistas da dopamina e/ou com levodopa, carbidopa, benserazida e suas combinações.

5. Utilização dos compostos de acordo com o definido nas reivindicações 1 a 3, em que o referido medicamento é para ser administrado numa dose que varia de 0,3 a 100 mg/kg de peso corporal por dia.