

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
02 de agosto de 2018 (02.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
**WO 2018/138389 A1**

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 31/4458 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070042

(22) Fecha de presentación internacional:

26 de enero de 2017 (26.01.2017)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante: UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA [ES/ES]; Edificio A - Rectorat, Campus universitari s/n, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Valles) (ES).

(72) Inventores: ARMARIO GARCÍA, Antonio; Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Edifici C, Carrer dels Til·lers, s/n, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) (ES). GAGLIANO, Humberto Antonio; Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Edifici C, Carrer dels Til·lers, s/n, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) (ES). NADAL ALEMANY, Roser; Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Edifici C, Carrer dels Til·lers, s/n, 08193 Bellaterra (Cerdanyola) (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: USE OF METHYLPHENIDATE IN THE PREVENTION AND/OR TREATMENT OF STRESS AND/OR ANY DISEASE ASSOCIATED WITH SAME

(54) Título: USO DE METILFENIDATO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DEL ESTRÉS, Y/O DE CUALQUIER PATOLOGÍA ASOCIADA AL MISMO

(57) Abstract: The present invention relates to the use of methylphenidate or any of the salts or derivatives thereof, and to a composition, particularly a pharmaceutical composition containing same, for the production of a drug for the prevention and/or treatment of stress and any disease associated with stress.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso del metilfenidato o cualquiera de sus sales o derivados, así como de una composición, particularmente una composición farmacéutica que lo contenga, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del estrés, como de cualquier patología asociada al estrés.



WO 2018/138389 A1

**Uso de metilfenidato en la prevención y/o tratamiento del estrés, y/o de cualquier patología asociada al mismo.**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso del metilfenidato (MF), o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, así como de cualquier composición que los comprenda, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica dirigida a la prevención y/o tratamiento del estrés, así como de cualquier patología asociada al mismo.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

La respuesta a un estímulo estresante agudo es generalmente adaptativa, es decir beneficiosa para el individuo y potencialmente crítica para su supervivencia. La idea popular de que el estrés es perjudicial deriva de la evidencia de que una respuesta exagerada o duradera parece estar ligada a importantes alteraciones fisiológicas y psicológicas, lo que ha generado un enorme interés por el estudio e investigación del estrés. Las situaciones estresantes pueden influir en la aparición y desarrollo de problemas cardiovasculares, trastornos del sueño, depresión, alteraciones de la conducta alimentaria y predisposición al consumo de drogas, a la esquizofrenia o a desarrollar Alzheimer, entre otras patologías. Se estima que en el año 2020, los trastornos neuropsiquiátricos sustituirán en importancia a las enfermedades infecciosas en los mapas de salud global y que las enfermedades psiquiátricas y neurológicas podrían aumentar su participación en la carga de morbilidad mundial total casi en un 50%, lo que representa un porcentaje de crecimiento superior al de las enfermedades cardiovasculares.

20

25

30

35

No hay consenso en la literatura sobre la definición más adecuada del término estrés. No obstante, una de las definiciones más aceptadas de dicho término es la que indica que el estrés es la situación creada en el organismo por la exposición a agentes (estímulos estresantes) que puedan alterar real (estímulos estresantes físicos) o simbólicamente (estímulos estresantes psicológicos) la integridad del organismo. En el caso de los estímulos físicos, dicha respuesta, desarrollada en el curso de la filogenia, tiene como objetivo mantener el equilibrio homeostático frente a una perturbación que es capaz de poner en peligro su integridad y no puede afrontarse con los mecanismos

homeostáticos normales. La exposición a estímulos psicológicos desencadena una respuesta fisiológica al estrés similar a la de los estímulos físicos porque dichas situaciones pueden ir seguidas en algunas o muchas ocasiones por un daño real (p.ej. la visión de un depredador puede requerir actividad física intensa o representar un riesgo real de ser herido; una situación de confrontación social en humanos puede llevar a una pelea posterior con daño físico). El estrés constituye por tanto una respuesta anticipatoria de un posible daño.

La exposición a situaciones estresantes sistémicas o emocionales implica la activación, en todos los vertebrados, de dos grandes sistemas fisiológicos: (a) El sistema nervioso vegetativo, especialmente la rama simpática, con la consiguiente liberación de adrenalina y noradrenalina (sistema simpático-médulo-adrenal, SMA) y (b) el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), responsable en primer término de la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por la hipófisis, y luego de glucocorticoides por la adrenal. Estos dos sistemas contribuirán tanto a cambios fisiológicos como conductuales/cognitivos considerados indispensables para el afrontamiento de la situación y la supervivencia del individuo.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el efecto de los psicoestimulantes, específicamente anfetamina (AMPH) y cocaína, puede modificarse por el estrés asociado a la exposición a un ambiente nuevo en el cual son administrados. La respuesta motora a la AMPH es mayor cuando ésta es administrada en un ambiente distinto a la caja de estabulación, lo que sugiere una sinergia positiva entre psicoestimulantes y estrés. Pero por otro lado, también se ha demostrado una interacción negativa entre AMPH y estímulos estresantes de naturaleza diferente (IMO, natación forzada e inyección de IL-1 $\beta$ ) cuando ambos se aplican simultáneamente, tanto a nivel del eje HPA como a nivel del eje SMA. Así, la administración aguda de AMPH, simultánea a la exposición a situaciones de estrés, fue capaz de reducir la respuesta de algunos de los marcadores biológicos de estrés más típicos, como las hormonas del eje HPA y la hiperglucemia (Gómez-Román A. *et al.* Psychoneuroendocrinology. 2016, 63: 94). Pero, la exposición repetida a la AMPH también induce sensibilización conductual (aumenta de la actividad motora) a corto y largo plazo. Además, la administración de una sola dosis de AMPH es capaz de inducir sensibilización a largo plazo del eje HPA ante exposiciones posteriores a un estímulo estresante sistémico como la IL-1 $\beta$  (Schmidt ED. *et al.* Eur J Neurosci. 2001; 13: 1923).

Aunque los datos anteriores sugieren un potencial uso terapéutico de la AMPH para reducir el estrés, este compuesto presenta una serie de inconvenientes que impiden su uso seguro en la reducción de dicho estrés: (a) no existe un conocimiento preciso de las interacciones de la AMPH con el estrés; (b) la AMPH tiene un gran potencial adictivo; (c) la acción farmacológica de la AMPH es compleja. Por todo ello, existe en el estado de la técnica la necesidad de disponer de compuestos alternativos a los mencionados aquí, que sean útiles y seguros en la prevención y/o tratamiento del estrés y las posibles patologías asociadas al mismo.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han demostrado que el uso del MF, así como sus composiciones farmacéuticas, son útiles para el tratamiento del estrés, a dosis incluso inferiores a las que son ya utilizadas en clínica para el tratamiento del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), que son típicamente de entre 0.5 a 2 mg/kg. La utilidad reconocida del MF en el tratamiento del TDAH está relacionada con sus efectos sobre atención e impulsividad y no guarda ninguna relación con el estrés (Swanson J *et al* Neuropsychopharmacology.2011, 36:207). El uso del MF, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, así como de cualquier composición que los comprenda, es capaz de reducir la respuesta fisiológica del individuo frente al estrés, tanto a nivel del sistema nervioso central, como a nivel del sistema nervioso periférico, además de reducir también la respuesta conductual, mostrando un mejor afrontamiento de la situación y una mayor capacidad de aprendizaje en situaciones estresantes.

Para demostrar la utilidad del uso de las dosis farmacológicas del MF, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, así como de cualquier composición que lo comprenda en el tratamiento del estrés, los inventores han analizado la respuesta fisiológica de los animales de experimentación cuando son sometidos a dos estímulos predominantemente estresantes psicológicos o emocionales (natación forzada y choque eléctrico), escogiendo como variables de análisis, a nivel periférico, la activación del eje HPA (niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona) junto a otros marcadores de estrés (niveles plasmáticos de glucosa), y a nivel central, la expresión del gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular (PVN), por su implicación directa en la regulación del eje HPA. Como se pone de

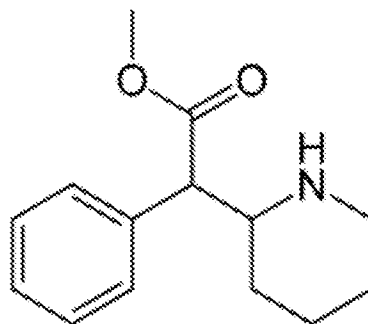
manifiesto en la presente invención, el efecto del MF sobre el eje HPA se ejerce principalmente a niveles centrales, ya que el dicho compuesto es capaz de bloquear la expresión del gen CRH inducida por el estrés en el PVN. Además de reducir la respuesta fisiológica al estrés, el MF mejora el afrontamiento en una tarea de evitación-escape que implica exposición a estrés (choques eléctricos), lo que sugiere también un impacto positivo en el comportamiento en condiciones de estrés.

Los resultados mostrados en la presente invención demuestran que existe una importante reducción de la respuesta fisiológica al estrés a dosis de MF de uso terapéutico, siendo dichas dosis de uso terapéutico las dosis de entre 0.5 a 2 mg/kg. Por otro lado, la exposición a estímulos estresantes emocionales da lugar también a cambios conductuales y cognitivos. En la presente invención se demuestra como algunas de esas respuestas podrían ser más apropiadas cuando el estímulo estresante se presenta conjuntamente con la administración del fármaco, dando lugar a un mejor afrontamiento de la situación y una mayor capacidad de aprendizaje. Como se observa en los ejemplos incluidos en el presente documento, las dosis ensayadas de MF varían de entre 0,5 a 2 mg/kg. Estas dosis ensayadas en ratas se corresponden con dosis en humanos seis veces inferiores por la distinta farmacocinética que existe entre especies (Reagan-Shaw S. *et al.* FSEB J. 2007; 22: 659), es decir las dosis en humanos serían de menos de 0,1 mg/kg en el rango más bajo, muy inferiores a las dosis clínicamente relevantes de MF en el tratamiento del TDAH (0,5 a 2 mg/kg). A las dosis testadas en la presente invención, el MF no altera ni los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona, ni los de glucosa, lo que sugiere que a dichas dosis, la administración de MF no está actuando como un estresante farmacológico, en contraste con otros psicoestimulantes como la anfetamina y la cocaína (Armario A. Trends Pharmacol Sci. 2010; 31(7):318). En cambio, se ha observado que las dos dosis de MF ensayadas en la presente invención redujeron la respuesta de ACTH a la natación forzada, mientras que el efecto de la corticosterona sólo se ha observado con la dosis más alta en el período posterior a la natación. Es importante destacar que el MF también redujo la hiperglucemia inducida por el estrés, un reflejo indirecto de la liberación de adrenalina, lo que sugiere una activación reducida del eje SMA.

Los datos presentados aquí sugieren fuertemente que el tratamiento con MF ejerce efectos beneficiosos cuando los sujetos, jóvenes y adultos, se enfrentan a factores de estrés, y dichos efectos beneficiosos pueden mantenerse tras la administración

crónica de MF, la situación típica en el uso terapéutico del MF. Por lo tanto, además de sus efectos terapéuticos para mejorar la atención y el control de los impulsos, el tratamiento con MF protege de las consecuencias negativas del estrés, lo que es particularmente relevante en los seres humanos tanto durante el período juvenil-  
5 adolescente como en la etapa adulta, periodo en el cual el uso terapéutico del MF, en individuos que padecen TDAH, está aumentando considerablemente en los últimos años.

El MF es un medicamento psicoestimulante aprobado para el tratamiento del TDAH, del síndrome de taquicardia ortostática postural y de la narcolepsia. También podría ser prescrito para casos resistentes a tratamientos de fatiga y depresión. El MF pertenece a la clase de compuestos piperidina e incrementa los niveles de dopamina y norepinefrina en el cerebro a través de la inhibición de la recaptación de los respectivos transportadores de monoaminas. El MF se identifica mediante el número  
10 de CAS 113-45-1, y la siguiente fórmula (I):



Así un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso del MF o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del estrés,  
20 y/o patologías asociadas al mismo en un sujeto, o también alternativamente, la presente invención se refiere al MF, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del estrés y/o patologías asociadas al mismo en un sujeto.

A efectos de la presente invención, el término "sujeto", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier animal, preferentemente mamífero e incluye, pero no se restringe a animales domésticos, de granja, primates y humanos, tal como seres humanos, primates no humanos, vacas, cabras, caballos, cerdos, ovejas, perros, gatos o roedores. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del MF que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos del MF. El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado del MF, por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el MF en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del MF cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del MF en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el MF en el individuo. Derivados o profármacos especialmente preferidos son aquellos que incrementan la biodisponibilidad del compuesto de la invención cuando este es administrado al sujeto (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado oralmente sea absorbido más rápidamente a la sangre), o que mejoran el suministro del compuesto a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro) respecto al compuesto inicial. La preparación de dicho profármaco o derivado puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables del MF proporcionados en el presente documento son sintetizadas a partir del compuesto de la invención, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales son preparadas, por ejemplo, reaccionando las formas ácidas o básicas libres de este compuesto con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de las sales de adición ácidas incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluensulfonato. Ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales alcalinas orgánicas

tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,Ndialquilenetanolamina, glucamina y sales aminoácidas básicas.

5 Puesto que la vida social conlleva una exposición continua a situaciones de estrés de tipo psicológico, la activación reiterada de la respuesta biológica al estrés puede dar lugar a numerosas patologías, tales como por ejemplo, alteraciones cardiovasculares y gastrointestinales, inhibición del sistema inmunitario, depresión, adicción a drogas, déficits cognitivos, etc.), especialmente cuando se combina con una predisposición individual a las mismas por otros motivos. Teniendo en cuenta esto y a efectos de la  
10 presente invención, las patologías asociadas al estrés se seleccionan de la lista que consiste en: ansiedad, depresión, trastorno de estrés post-traumático, neurodegeneración, patologías cardiovasculares, patologías gastrointestinales, enfermedades autoinmunes, síndrome metabólico y envejecimiento, entre otras. A efectos de la presente invención las patologías asociadas con el estrés son  
15 preferentemente aquellas patologías asociadas con el sistema nervioso central, y más preferentemente las que se seleccionan de la lista que consiste en: ansiedad, depresión, trastorno de estrés post-traumático y neurodegeneración, entre otras.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una composición,  
20 preferiblemente una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende MF, o sus sales, profármacos, derivados, análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del estrés y/o de patologías asociadas con el mismo, en un sujeto. Alternativamente, la presente invención también se refiere a una  
25 composición, como se ha indicado anteriormente, preferiblemente una composición farmacéutica que comprende MF, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados, análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del estrés y/o de patologías asociadas con el mismo, en un sujeto.

30 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, además comprende otro principio activo, preferiblemente dicho principio activo se selecciona de la lista que consiste en: antidepresivos o ansiolíticos.

35 El término "medicamento", o "composición farmacéutica" tal y como se usan en este documento, hacen referencia a cualquier sustancia usada para prevención,

diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, el término enfermedad se refiere a todas aquellas patologías asociadas al estrés tal y como se ha mencionado anteriormente.

5

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o

10

prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

15

El término "tratamiento", según se usa en el contexto de esta memoria significa administración del compuesto de la invención, MF, o de una composición farmacéutica según la invención, para aliviar o eliminar la(s) patología(s) mencionada(s) anteriormente o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha(s) patología(s). El término "tratamiento" también abarca aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. El término "prevención", tal como se usa en la presente invención, se refiere a la capacidad del compuesto de la invención, MF o de una composición farmacéutica según la invención, de prevenir, minimizar o dificultar la aparición o el desarrollo de una enfermedad o estado antes de su aparición. A efectos de la presente invención, el término "persona en necesidad de tratamiento" incluye

20

25

aquellos casos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un sujeto, preferiblemente a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo,

30

35

pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las

composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo. Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico. Preferiblemente, la vía de administración es vía oral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, edad, peso, sexo, tolerancia y especie. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de MF, o de sus sales, profármacos, derivados, análogos, o de sus combinaciones, o de las composiciones farmacéuticas que lo comprenden, que se requiere para lograr una mejora apreciable en el estado, por ejemplo, una patología, de la enfermedad o condición objetivo del tratamiento, y, que en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente efectiva de MF, o de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o de sus combinaciones, preferiblemente para su aplicación en humanos, está comprendida entre 0,1 y 2 mg/Kg. En realizaciones preferidas, las cantidades terapéuticamente efectivas de MF se seleccionan de la lista que consiste en: de entre 0,1 a 1,5 mg/Kg; de entre 0,1 a 1 mg/Kg, de entre 0,1 a 0,5 mg/Kg, de entre 0,5 a 1 mg/Kg, de entre 0,5 a 1,5 mg/Kg; de entre 1 a 1,5 mg/Kg, de entre 1 a 2 mg/Kg, de entre 0,5 a 2 mg/Kg, y/o cualquier combinación de los anteriores.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención,

estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

10

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra. Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de composiciones farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica.

25

Opcionalmente, la composición farmacéutica de la invención podrá administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos o principios activos. En el tratamiento del estrés y/o de patologías asociadas al mismo, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta, o hacer la enfermedad más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, tales como por ejemplo, antidepresivos o ansiolíticos. La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos o principios activos, incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

35

Otro aspecto de la invención es el uso del MF, de sus sales, profármacos, derivados, análogos, o de sus combinaciones, o de la composición farmacéutica de la invención

en una cantidad terapéuticamente eficaz para la prevención y/o el tratamiento del estrés y/o de patologías asociadas al mismo en un sujeto, tal y como se describe aquí.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de prevención y/o tratamiento del estrés y/o de patologías asociadas al mismo, en un sujeto tal y como se describe aquí, de ahora en adelante método de prevención y/o tratamiento de la invención, mediante la administración, a un sujeto que lo necesite, de una cantidad terapéuticamente efectiva del MF, o de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o de cualquiera de sus combinaciones, o de la composición que lo comprende, según se describe en  
10 el presente documento.

En una realización preferida, el método de prevención y/o tratamiento de la invención comprende además la administración de un segundo ingrediente activo con la composición de la invención.

15 En otra realización preferida, el método de prevención y/o tratamiento de la invención se caracteriza por que la administración es preferiblemente administración oral. En otra realización preferida, el método de prevención y/o tratamiento de la invención se caracteriza por que la cantidad terapéuticamente efectiva, preferentemente para su uso en humanos, es de entre 0,1 a 2 mg/kg día. En realizaciones preferidas, las  
20 cantidades terapéuticamente efectivas se seleccionan de la lista que consiste en: de entre 0,1 a 1,5 mg/Kg; de entre 0,1 a 1 mg/Kg, de entre 0,1 a 0,5 mg/Kg, de entre 0,5 a 1 mg/Kg, de entre 0,5 a 1,5 mg/Kg; de entre 1 a 1,5 mg/Kg, de entre 1 a 2 mg/Kg, de entre 0,5 a 2 mg/Kg, y/o cualquier combinación de los anteriores.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la  
30 invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1. Respuesta de la ACTH (A), la corticosterona (B) y la glucosa (C) a la administración de 0.5 y 2 mg/kg de MF combinada o no con 30 min de natación**

**forzada.** VEH (n=8) es el grupo administrado con salino; MF0.5E (n=8) y MF2 (n=8) son los grupos tratados con 0.5 y 2 mg/kg de MF respectivamente; VEH-NADO (n=10) es el grupo expuesto a 30 min de natación forzada; MF 0.5-NADO (n=10) y MF 2-NADO (n=10) son los grupos tratados con 0.5 y 2 mg/kg de MF e inmediatamente después expuestos a 30 min de natación forzada. NADO es la muestra inmediatamente posterior a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 las tomadas a 30 y 60 min de finalizado el nado. Se representa la media  $\pm$  SEM. +++p<0.001 respecto a su respectivo grupo no estresado (VEH); \*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01 y \* p<0.05 respecto a VEH-NADO para cada tiempo; &&& p<0.001 vs MF0.5-NADO.

**Figura 2. Respuesta conductual a 30 min de natación forzada tras la administración de vehículo (VEH), 0.5 (MF 0.5-NADO) o 2 mg/kg (MF 2-NADO) de MF.** La respuesta está medida en los cinco primeros min (1-5) (A) y en los 5 minutos finales (25-30). (B). VEH-NADO (n=10) es el grupo tratado con vehículo y expuesto a 30 min de natación forzada; MF0.5-NADO (n=10) y MF2-NADO(n=10) son los grupos tratados con 0.5 y 2 mg/kg de MF respectivamente y expuestos a 30 min de natación forzada. Se representa la media  $\pm$  SEM. \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01 vs. VEH-NADO; &&& p<0.001 vs MF0.5-NADO.

**Figura 3. Cuantificación de los niveles de hnRNA para CRH en la subdivisión medial-parvocelular-dorsal del PVN (PVNmpd).** IntDen (AU): densidad integrada en unidades arbitrarias (*Integrated density-arbitrary units*). Los valores están expresados como la media  $\pm$  SEM. +++ p<0.001 vs VEH-HOME; \*\*\* p<0.001 vs VEH-NADO.

**Figura 4. Respuesta hormonal (ACTH) y conductual en la tarea de evitación-escape tras la administración de vehículo o MF.** Variables: niveles plasmáticos de ACTH (A), número de respuestas condicionadas (evitaciones) (B) y número de cruzamientos entre choque y choque (C). La respuesta conductual está indicada en bloques de 10 ensayos. VEH-TAREA (n=16) es el grupo administrado con salino; MF-TAREA (n=16) es el grupo tratado con 1 mg/kg de MF; ambos expuestos a la tarea en la *Shuttle-box* en el DÍA 1. Se indica también la respuesta de ACTH a la re-exposición a la *shuttle-box* (contexto) durante 15 min sin recibir choques en el DÍA 8. Se representa la media  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01 vs VEH-TAREA, +p<0.05 vs VEH-TAREA o efecto global del MF.

**Figura 5. Respuesta de ACTH (A) y glucosa (B) a la exposición a 30 min de natación forzada con/sin la administración de 1 mg/kg de MF 30 min antes del estrés.** VEH-NADO (n=9) es el grupo administrado con salino 30 min antes de la exposición y MF-NADO (n=9) es el grupo administrado con 1 mg/kg de MF. En el eje de abscisas NADO indica los resultados obtenidos inmediatamente después de la

natación forzada y R30 los resultados obtenidos en la fase de recuperación posterior a la finalización del nado (30 min después). La línea discontinua indica los niveles basales de las variables, estudiados en un día diferente. Se muestra la media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$  vs VEH-NADO.

5 **Figura 6. Respuesta de la ACTH y la glucosa a la administración de MF combinada con 30 min de natación forzada en ratas juveniles y adultas.** VEH-JUVENIL (n=10) es el grupo juvenil tratado con salino; MF-JUVENIL (n=10) es el grupo juvenil tratado con 1 mg/kg de MF; VEH-ADULTO (n=10) es el grupo adulto tratado con salino; MF-ADULTO (n=10) es el grupo adulto tratado con 1 mg/kg de MF.

10 En el eje de abscisas NADO indica los resultados obtenidos inmediatamente después de someter a los animales a los 30 min de natación forzada y R30 y R60 los resultados obtenidos tras los 30 y 60 min de finalizado el nado. Se representa la media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$  vs su respectivo control sin fármaco; +++  $p < 0.001$  y ++  $p < 0.01$  vs MF-JUVENIL; ##  $p < 0.01$  (efecto global MF).

15 **Figura 7. Respuesta de la ACTH y la glucosa a la administración aguda o crónica de MF en ratas.** Las ratas se asignaron a tres grupos (n=10 por grupo): VEHÍCULO, tratadas con salino de la edad de 29 a la de 49 días; MF AGUDO, tratadas con salino de la edad de 29 a la de 48 días y con 1 mg/kg MF a los 49 días de edad; MF CRÓNICO inyectadas con 1 mg/kg de MF desde la edad de 29 días a la de 49 días.

20 Inmediatamente después de la inyección a los 49 días de edad fueron expuestas a 30 min de natación forzada, con toma de muestra inmediatamente tras la natación forzada y a los 30 min de la finalización (R30). La línea discontinua indica los niveles basales de las variables, estudiados en un día diferente. Se representa la media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$  vs VEHÍCULO para el mismo periodo de toma

25 de muestra.

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los

30 inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Animales de experimentación y procedimientos generales.

35 Se utilizaron ratas machos de la cepa *Sprague-Dawley* (SD) procedentes del Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona adultas (con una edad de

entre los 60-70 días al inicio de los experimentos) o juveniles (de 25-30 días al inicio de los experimentos). Durante todas las fases experimentales los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales descritos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona y de la Generalitat de Catalunya en acuerdo con las Directivas de la Comunidad Económica Europea (2010/63/EU) y de España (RD53/2013).

#### **Obtención de muestras de sangre.**

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante el procedimiento de incisión en la cola. Se recolectó por capilaridad un volumen máximo de 300 µl en un tiempo no superior de 2 min. Se utilizaron capilares con EDTA (Sarsdtet Microvette CB300, Granollers). El plasma obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de los análisis pertinentes.

#### **Administración de fármacos**

Se utilizó metilfenidato clorhidrato (MF), C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>HCl (Sigma-Aldrich M289). Las dosis utilizadas fueron 0,5, 1 y 2 mg/kg (base) dependiendo de cada experimento diluido en solución salina al 0,9%. Se utilizó un volumen de inyección de 0,5 ml/kg mediante administración subcutánea (sc). Como control se utilizó solución salina al 0,9%. Es importante tener en cuenta que por las diferencias farmacocinéticas entre especies, las dosis de MF utilizadas para los ensayos en rata son unas seis veces las de humanos (Reagan-Shaw S. *et al.* FSEB J. 2007; 22: 659). Por consiguiente, la equivalencia en humanos de las dosis utilizadas en los ensayos en ratas, serían de < 0.1-0.33 mg/kg, claramente por debajo de las utilizadas de MF actualmente en humanos para el tratamiento del TDAH.

#### **Radioinmunoanálisis (RIA)**

Los niveles de ACTH y corticosterona en plasma se analizaron mediante RIA, tal y como se ha descrito previamente (Muñoz-Abellán C *et al.* Plos One. 2011; 6:e21426). Las concentraciones de las hormonas se calcularon respecto a las curvas patrones respectivas.

#### **Hibridación *in situ* (ISH) para hnRNA de CRH.**

Para el análisis de la expresión del gen de CRH en el PVN, núcleo clave en la regulación del eje HPA, se ha utilizado una sonda intrónica marcada con 35S-UTP y

hemos seguido los procedimientos previamente descritos (Vallès A. *et al.* Eur J Neurosci. 2008, 18: 1353).

### Valoración enzimática de la glucemia

- 5 Los niveles plasmáticos de glucosa fueron medidos mediante un método espectrofotométrico de oxidación de la glucosa, utilizando un kit comercial (Glucose-RTU, Biomerieux). La sensibilidad de la técnica fue de 32 mg/dl y el coeficiente de variación intra-ensayo fue del 2,5%.

### 10 Pruebas y variables de conducta utilizadas

#### Prueba de natación forzada (*Forced swim test* - FST)

- Es una prueba ampliamente utilizada para la validación de fármacos antidepresivos y también para evaluar estrategias de afrontamiento activas/pasivas ante situaciones estresantes (Porsolt RD. *et al.* Nature. 1977; 266: 730; Martí J & Armario A, Eur J Pharmacol. 1993; 236: 295). Además, dicha prueba es considerada un estímulo estresante mixto, predominantemente emocional y de mediana intensidad. El tiempo de duración de la prueba fue de 30 min, al finalizar ésta, se realizó una extracción de sangre por incisión en la cola. La conducta fue grabada, valorándose el tiempo empleado en cada uno de los tres tipos de conducta: la más activa de escape, la actividad intermedia representada por la natación suave y la inmovilidad.

#### Prueba de evitación activa en dos sentidos y condicionamiento del miedo al contexto.

- Esta prueba se realiza en una caja lanzadera o *Shuttle-box*, que ha sido utilizada para el estudio de aprendizaje y memoria de tipo no declarativo. El paradigma incluye aspectos de condicionamiento clásico y condicionamiento operante. El animal se expone a un estímulo incondicionado (*Unconditioned Stimulus-US*) aversivo, un choque eléctrico, asociado a un estímulo condicionado explícito (*Conditioned Stimulus-CS*) constituido por un tono y una luz. Aunque es una tarea de aprendizaje, el rendimiento en la misma viene muy influido por los niveles de ansiedad (Escorihuela RM *et al.* Physiol Behav. 1999; 67: 19). El animal debe aprender que al CS le sigue un US y puede evitarlo cruzando al otro compartimento de la jaula; es decir, realizando una respuesta condicionada de evitación, estableciéndose así un refuerzo negativo. Se utilizaron dos cajas de condicionamiento operante individuales con aislamiento acústico. Los grupos controles fueron expuestos a las jaulas *shuttle-box* 50 min, tiempo similar a la duración de la tarea en los animales expuestos a los choques. Se

consideraron las siguientes variables fundamentales: (a) Respuestas condicionadas o evitaciones: número de veces que el animal cambia de compartimento tras recibir el CS y antes de recibir el US; (b) Cruzamientos inter-ensayos: número de veces que el animal cambia de compartimento entre un ensayo y otro, durante los periodos en los que no se administra ningún estímulo (ni CS, ni US). Todas estas variables se representan en 5 bloques de 10 ensayos consecutivos.

La prueba de evitación activa en dos sentidos ofrece a los animales dos posibilidades de afrontamiento al miedo condicionado, un afrontamiento pasivo o *freezing* (permanecer en el compartimento donde recibe el choque eléctrico) o un afrontamiento activo (esto es, escapes hacia el otro compartimento) representado por las respuestas condicionadas o incondicionadas que el animal realiza. Cuanto mayor número de respuestas condicionadas e incondicionadas haga el animal, será más activo el afrontamiento de la situación estresante a la que está sometido (evitación activa o escape). Cuanto mayor sea el tiempo de *freezing* soportando el choque eléctrico, mayor será el afrontamiento pasivo.

#### Análisis estadístico de datos

Se realizó mediante el programa SPSS (*Statistical Program for Social Science*) versión 15 y 18 para Windows. El criterio de significación estadística en todos los casos se estableció en  $p < 0,05$ .

#### Ejemplo 1. Interacción entre MF y estrés. Dosis-Respuesta.

Para demostrar el efecto del MF sobre el eje HPA y su interacción con la respuesta al estrés, 54 ratas adultas fueron sometidas a un estímulo estresante emocional de moderada intensidad como la natación forzada, que también permite valorar la influencia del MF sobre las estrategias de afrontamiento de los animales. Las dosis de MF utilizadas han sido 0.5 y 2 mg/kg de MF administrado por vía subcutánea.

Los grupos de tratamiento han sido: VEH (n=8), VEH-NADO (n=10), MF0.5 (n=8), MF0.5-NADO (n=10), MF2 (n=8) y MF2-NADO (n=10). Inmediatamente después de las inyecciones, las ratas NADO fueron expuestas a 30 min de natación forzada a 36°C y las otras ratas permanecieron en su caja de estabulación. Se estudió la dinámica temporal de la respuesta con extracciones de sangre al final del estrés

(NADO) y a los 30 y 60 min posteriores (R30 y R60). Entre las muchas variables sensibles al estrés, a efectos de la presente invención, y a modo de ejemplo sin que sea limitante, se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa (índice indirecto de activación del SMA y por lo tanto de la liberación de adrenalina).

Los resultados ponen de manifiesto que la administración aguda de 0,5 o 2 mg/kg de MF en ausencia del estímulo estresante no aumenta por sí misma los niveles de ACTH, por lo que queda demostrado que el MF a las dosis ensayadas no activa el eje HPA. En cambio, la exposición a 30 min de natación forzada en ausencia de MF incrementa considerablemente los niveles de ACTH (VEH-NADO vs VEH) y estos niveles se mantuvieron altos durante todos los tiempos analizados ( $p < 0.001$  para los tres tiempos) (**Figura 1A**). Las dos dosis de MF ensayadas son capaces de atenuar la respuesta de ACTH al finalizar la natación forzada (MF0.5-NADO vs VEH-NADO,  $p < 0.01$ ; MF2-NADO vs VEH-NADO  $p < 0.001$ ). Una menor respuesta también se observa incluso 30 minutos después de la natación forzada (R30) (MF0.5-NADO vs VEH-NADO  $p < 0.05$ ; MF2-NADO vs VEH-NADO  $p < 0.05$ ) y tras 60 minutos de exposición al estímulo (R60), pero en este último caso solo con la dosis mayor (MF2-NADO vs VEH-NADO  $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos dosis de MF ensayadas ni en el momento de exposición al estímulo ni 30 minutos después, aunque sí que se encontraron cuando transcurrieron 60 minutos tras la finalización de la exposición al estímulo en los animales tratados con la dosis mayor de MF (2 mg/kg) (MF2-NADO vs MF0.5-NADO  $p < 0.001$ ).

Respecto a los niveles de corticosterona, los resultados pusieron de manifiesto que la dosis menor de MF atenúa la respuesta a la natación forzada en R30 (MF0.5-NADO vs VEH-NADO,  $p < 0.05$ ), en tanto que la dosis mayor lo hace a R60 (MF2-NADO vs VEH-NADO,  $p < 0.01$ ) (**Figura 1B**).

Respecto a los niveles de glucosa (**Figura 1C**), solo se analizaron los resultados obtenidos al finalizar los 30 min de natación forzada, dado que los niveles de dicho metabolito se recuperan rápidamente en el período post-estrés. Los resultados ponen de manifiesto que ninguna de las dosis de MF por sí mismas, en ausencia del estímulo estresante, aumentan los niveles de glucosa. Por otro lado, el aumento de glucosa que provoca la natación forzada (VEH vs VEH-NADO  $p < 0.001$ ) es atenuado por la dosis menor de MF (MF0.5-NADO vs VEH-NADO  $p < 0.05$ ) y más aún por la

dosis mayor (MF2-NADO vs VHE-NADO  $p<0.001$ ), llegando ésta a bloquear la respuesta al nado. La disminución de la respuesta de glucosa en el grupo MF2-NADO es más intensa que en el grupo MF0.5-NADO ( $p<0.001$ ), lo que significa que cuanto mayor es la dosis de MF, mayor es la sinergia negativa con la natación forzada. Por lo tanto, estos resultados evidencian que el MF está también inhibiendo la activación del eje SMA de forma dosis dependiente.

Además de la respuesta fisiológica y endocrina, se estudió el comportamiento de los animales sometidos a natación forzada. Se fraccionaron las medidas del comportamiento en dos períodos de tiempo, los primeros y los últimos 5 min de exposición (Bloques A y B de la **Figura 2**). En cada uno de esos bloques se evaluó: escape, natación suave e inmovilidad. En los primeros 5 min se observa un mayor nivel de actividad en el grupo de animales MF2-NADO, mostrando diferencias significativas para inmovilidad y natación suave, pero no para escape. Al evaluar los últimos 5 min de la prueba se mostraron diferencias significativas en las variables natación suave e inmovilidad (pero no en la variable escape) en los grupos de animales tratados con MF. Respecto a natación suave, los sujetos con cualquiera de las dos dosis de MF muestran una conducta más activa (MF0.5-NADO y MF2-NADO vs VHE-NADO,  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente) y para la inmovilidad, los animales con MF permanecen menos tiempo inmóviles (MF0.5-NADO y MF2-NADO vs VEH-NADO  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente) mostrando menos conductas pasivas. Tanto para natación suave como para inmovilidad encontramos que los animales del grupo MF2-NADO difieren en forma estadísticamente significativa del grupo MF0.5-NADO ( $p<0.001$ , respectivamente), demostrándonos nuevamente que cuanto mayor es la dosis de MF menor es la conducta pasiva.

Por lo tanto, los resultados de conducta y comportamiento en la prueba de natación forzada indican que la administración de MF, preferiblemente la dosis más alta (2 mg/kg) favorece las conductas activas.

En los ejemplos posteriores no se muestran los niveles de corticosterona dado que no aportan información adicional respecto a los de ACTH.

**Ejemplo 2. Análisis de la interacción entre la administración de MF y estrés a nivel del SNC.**

Una vez demostrada la interacción negativa entre el estrés (natación forzada), y las dosis de 0.5 y 2 mg/kg de MF a nivel periférico, se procedió al estudio la interacción a nivel del SNC. El experimento se llevó a cabo en ratas adultas, utilizando una dosis de 0,5 mg/kg de MF, inmediatamente después del cual se las sometió a 30 min de natación forzada. Transcurrido este tiempo, se extrajeron los encéfalos de los animales y se procesaron para cuantificar la expresión del gen de CRH en el PVN como índice de activación del eje HPA, ya que el CRH es el principal factor hipotalámico de regulación del dicho eje en el PVN.

Los grupos de animales ensayados han sido: CONTROL (n=4); VEH (n=8); VEH-NADO (n=8); MF (n=8) y MF-NADO (n=8). Las ratas NADO fueron expuestas a 30 min de natación forzada y las otras ratas permanecieron en su caja de estabulación, para ser luego perfundidas y obtener los encéfalos. Las ratas CONTROL fueron perfundidas directamente sin ningún tipo de manipulación, sirviendo como control de los efectos estresantes de la administración de vehículo.

Los resultados mostrados en la **Figura 3** indican que la administración de MF no alteró los niveles de hnRNA para el CRH en el PVN. Por consiguiente, el MF no parece activar las neuronas de CRH del PVN, de acuerdo con la ausencia de efectos sobre los niveles circulantes de ACTH y corticosterona. La exposición a la natación forzada en presencia de MF bloqueó completamente el incremento en la expresión del CRH causada por el estímulo estresante, dando apoyo a la posibilidad de que los efectos del MF sobre el eje HPA se sitúan a nivel central.

### **Ejemplo 3. Efecto de la administración de MF en animales sometidos a procedimientos de evitación activa en dos sentidos.**

Aunque la exposición conjunta a MF y un estímulo estresante emocional de moderada intensidad como la natación forzada reducía la respuesta al estrés a nivel de los ejes HPA y SMA y dicha reducción de la respuesta biológica tiene en principio connotaciones positivas para el animal, el favorecimiento de las conductas de afrontamiento activo durante la natación podría ser una mera consecuencia del efecto estimulante del MF. Para desechar dicha posibilidad, se analizaron los efectos del tratamiento con MF sobre otro estímulo estresante emocional como es la exposición al choque eléctrico en una prueba de evitación activa en dos sentidos. Dicha prueba permite evaluar la conducta de afrontamiento, pero también la ansiedad generada por

el estímulo estresante y la capacidad de aprendizaje de los animales. Se estudió también el desarrollo del condicionamiento del miedo al contexto.

Se utilizaron 36 ratas adultas distribuidas en los siguientes grupos: VEH-TAREA (n=18); MF-TAREA (n=18). Inmediatamente después de la administración del vehículo o de MF (1 mg/kg, sc) se expuso a todos los animales a un procedimiento de evitación activa en dos sentidos en una *shuttle-box* (50 ensayos). Se tomaron muestras basales dos días antes de comenzar el experimento (DÍA 2), y dos días después de la exposición al estímulo estresante (DÍA 3). El DÍA 1, todos los animales se expusieron a 50 ensayos en la *Shuttle-box* con posterior toma de muestra.

Respecto a los valores hormonales (**Figura 4A**), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los valores de ACTH inmediatamente después de la exposición a la *Shuttle-box* del DÍA 1, lo que pone de manifiesto una atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante. No se hallaron diferencias entre los dos grupos en los niveles basales del DÍA 3 (no mostrado).

Respecto a las variables de conducta analizadas en la *Shuttle-box*, los resultados del DÍA 1 muestran que existe un efecto significativo del MF para las evitaciones (**Figura 4B**), reflejando que los animales tratados con el fármaco han realizado más respuestas condicionadas y en menos tiempo. Respecto a los cruzamientos entre compartimentos en los periodos inter-ensayos, los sujetos tratados con MF han realizado más cruzamientos entre ensayos (**Figura 4C**).

En conclusión, los animales expuestos a choque eléctrico que además recibieron 1 mg/kg de MF exhiben mayor número de evitaciones y menor tiempo de latencia de evitación, esto es, aprenden más y más rápido a evitar el choque. Es decir, el afrontamiento activo del choque eléctrico de los animales parece mejorar tras la administración de MF.

Se confirma además la reducción de la respuesta de la ACTH y de la glucosa (no mostrado) en los animales que recibieron el fármaco. Los datos demuestran que la mejoría en la ejecución de la tarea de aprendizaje no es consecuencia del efecto estimulante motor del MF. Por consiguiente, los efectos protectores del MF frente al estrés implican aspectos fisiológicos y conductuales.

#### **Ejemplo 4. Efecto de la administración de MF 30 minutos antes de la natación forzada sobre la respuesta fisiológica al estrés.**

El presente ejemplo se planteó con la finalidad de analizar si la administración de MF  
5 previa a la exposición del animal al estímulo estresante (30 minutos antes de someterlo al estímulo) sería capaz de atenuar la respuesta del eje HPA al estímulo.

Se utilizaron 18 ratas adultas distribuidas en los grupos VEH-NADO (n=9) y MF-NADO (n=9). Después del tratamiento previo de habituación a los procedimientos  
10 experimentales, el DÍA 1 se les inyectó a los animales vehículo o MF (1 mg/kg sc). Treinta minutos después se los expuso a natación forzada (durante otros 30 min), extrayéndoles sangre al finalizar el estímulo estresante y tras otros 30 min de recuperación (R30). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa. No incluimos los grupos VEH o MF, teniendo en cuenta, por los  
15 experimentos anteriores, que el MF por si solo no estimula el eje HPA.

Los resultados obtenidos muestran que el grupo MF-NADO tiene valores de ACTH menores que el VEH-NADO al acabar el periodo de estrés ( $p<0.01$ ) y también en R30 ( $p<0.05$ ) (**Figura 5A**). Estos resultados vuelven a mostrar la atenuación de la  
20 respuesta del eje HPA a un estímulo estresante emocional, al igual que sucediera con la administración simultánea de MF a la exposición al estímulo.

Al finalizar la exposición al estímulo estresante, el grupo MF-NADO tiene valores de glucosa menores que el VEH-NADO ( $P<0.001$ ) y algo similar ocurre en R30 ( $p<0.01$ )  
25 (**Figura 5B**). Estos datos confirman que la administración de MF 30 min antes de la natación forzada atenúa la respuesta del eje SMA, al igual que sucediera con la administración simultánea.

Por lo tanto, la administración previa de MF es capaz de reducir la respuesta de la  
30 ACTH y de la glucosa a la natación forzada cuando la exposición al estrés tenía lugar 30 min después de la administración del fármaco. El efecto se notó no solo inmediatamente después del estrés sino también en el período post-estrés. Es por lo tanto evidente que la exposición simultánea no es una condición necesaria para que se presente la interacción, lo que sugiere que los pacientes tratados con MF podrían  
35 mostrar una menor respuesta a situaciones de estrés al menos durante un cierto tiempo después de la toma del fármaco, cuando aún los niveles de MF estén dentro

del nivel terapéutico adecuado, es decir dichos sujetos afrontarían mejor las situaciones cotidianas de estrés a las que se enfrentan.

#### **Ejemplo 5. Influencia de la edad en la interacción entre MF y estrés.**

5

Considerando que el MF se utiliza sobre todo para el tratamiento del TDAH en niños/adolescentes, se realizó un ensayo comparando los efectos de la administración de MF con el estrés en ratas adultas y juveniles. No se incluyeron los grupos VEH-HOME o MF-HOME, ya que tal y como se ha demostrado en los ejemplos previos, el MF por sí solo no estimula el eje HPA.

10

Se utilizaron 20 ratas adultas ( $64 \pm 1$  días) y 20 ratas juveniles ( $29 \pm 1$  días), distribuidas en los siguientes grupos: VEH-JUVENILES ( $n=10$ ); MF-JUVENILES ( $n=10$ ); VEH-ADULTO ( $n=10$ ) y MF-ADULTO ( $n=10$ ). Se administró a los animales 1 mg/kg de MF o vehículo, e inmediatamente después fueron expuestos a 30 min de natación forzada. Se estudió la dinámica temporal de la respuesta con extracciones de sangre al final del estrés y a los 30 y 60 min posteriores (R30 y R60). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa.

15

Los niveles plasmáticos de la ACTH (**Figura 6A**) el grupo MF-JUVENIL inmediatamente después del estímulo estresante (NADO) son menores que VEH-JUVENIL, al igual que MF-ADULTO vs VEH ADULTO ( $p < 0.001$  en ambos casos). Además el grupo MF-ADULTO tiene valores menores que MF-JUVENIL ( $p < 0.001$ ). En R30 los dos grupos con el fármaco muestran valores menores que los grupos con vehículo ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) y los adultos tratados con el fármaco tienen nuevamente valores menores que los jóvenes con el mismo tratamiento ( $p < 0.01$ ). En R60 solamente el grupo MF-ADULTO tiene valores menores que el grupo VEH-ADULTO ( $p < 0.001$ ). Se confirma de esta manera la atenuación de la respuesta del eje HPA por el fármaco tanto en ratas adultas como en juveniles, siendo la atenuación en ratas adultas mayor que en juveniles.

25

30

Los niveles de glucosa se disminuyeron en los grupos de animales tratados con MF respecto al grupo tratado con el vehículo, independientemente de la edad (**Figura 6B**).

Todos estos resultados evidencian que la atenuación de la respuesta del eje HPA a un estímulo estresante emocional como la natación forzada en ratas se da tanto en la

35

edad adulta como en la juvenil y lo mismo sucede con la atenuación de la respuesta del eje SMA, lo que implica su posible aplicación no solo a los niños sino también a los adultos.

## 5 Ejemplo 6. Comparación entre la administración aguda y crónica de MF

Dado que el MF suele administrarse de forma crónica para el tratamiento del TDAH, se ha llevado a cabo un ensayo para determinar si también la administración crónica de MF sería capaz de prevenir y/o tratar el estrés, principalmente para averiguar si el efecto preventivo y/o terapéutico del MF frente al estrés se mantiene con una administración crónica del mismo.

Para demostrarlo, ratas juveniles de 29 días de edad al comienzo de la fase experimental se asignaron a tres grupos (n=10 por grupo): VEHÍCULO, inyectadas con salino desde la edad de 29 a la de 49 días; MF AGUDO, inyectadas con salino de la edad de 29 a la de 48 días y con 1 mg/kg MF el día 49; MF CRÓNICO inyectadas con 1 mg/kg MF desde el día 29 al 49. Inmediatamente después de la inyección del día 49 fueron expuestas a 30 min de natación forzada, con toma de muestra inmediatamente tras la natación forzada y a los 30 min de la finalización (R30). Se determinaron los niveles plasmáticos de ACTH, corticosterona y glucosa.

Tanto la administración aguda como la crónica de MF redujo la respuesta de la ACTH justo después del nado ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  vs VEHÍCULO, respectivamente) y también en el período post-nado (R30), aunque en este caso fue más evidente en el tratamiento agudo ( $p < 0.001$ ) que en el crónico (efecto marginal,  $p = 0.07$ ) (**Figura 7A**). La respuesta de la glucosa al nado se vio reducida tanto por la administración aguda como por la crónica de MF, observándose el efecto tanto después del nado ( $p < 0.001$  en los dos grupos de MF vs VEHÍCULO) como en R30 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) (**Figura 7B**).

Los resultados indican que el efecto protector del MF se mantiene tras la administración crónica del fármaco, aunque ligeramente atenuado en el caso del eje HPA.

## REIVINDICACIONES

1. Uso del metilfenidato y/o cualquiera de sus sales, profármacos, análogos y/o derivados para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés, y/o de cualquier patología asociada al mismo, en un sujeto.
2. Uso de una composición farmacéutica que comprende metilfenidato y/o cualquiera de sus sales y/o derivados, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del estrés, y/o de cualquier patología asociada al mismo, en un sujeto.
3. Uso según la reivindicación 2 donde la composición farmacéutica comprende además al menos un vehículo y/o excipiente farmacológicamente aceptable.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado por que además comprende al menos otro principio activo.
5. Uso según la reivindicación 4 donde el principio activo adicional se selecciona de la lista que consiste en: ansiolíticos y antidepresivos.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por que las vías de administración se seleccionan de la lista que consiste en: intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.
7. Uso según la reivindicación 6 donde la vía de administración es oral.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado por que el sujeto es un mamífero.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el sujeto es un ser humano.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el metilfenidato se usa a una dosis terapéuticamente efectiva comprendida entre 0,1 mg/Kg y 2 mg/Kg.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el metilfenidato se usa a una dosis terapéuticamente efectiva comprendida entre 0,1 mg/Kg y 1,5 mg/Kg.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que el metilfenidato se usa a una dosis terapéuticamente efectiva comprendida entre 0,1 mg/Kg y 1 mg/Kg.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el metilfenidato se usa a una dosis terapéuticamente efectiva comprendida entre 0,1 mg/Kg y 0,5 mg/Kg.
- 5 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el metilfenidato se usa a una dosis terapéuticamente efectiva comprendida entre 0,5 mg/Kg y 1 mg/Kg.
- 10 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde las patologías asociadas al estrés se seleccionan de la lista que consiste en: ansiedad, depresión, trastorno de estrés post-traumático, neurodegeneración, patologías cardiovasculares, patologías gastrointestinales, enfermedades autoinmunes, síndrome metabólico, envejecimiento.

FIGURAS

Figura 1

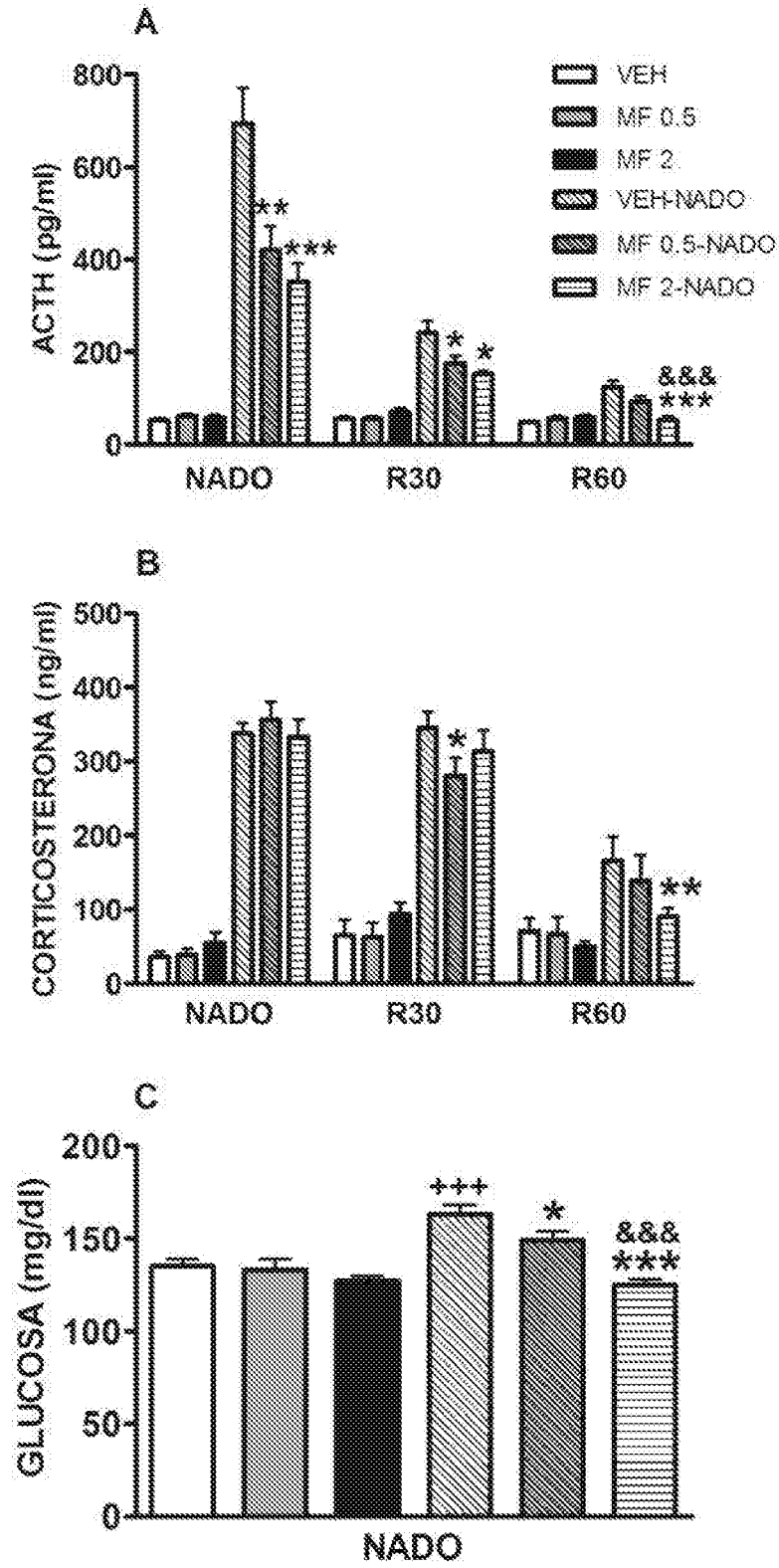


Figura 2

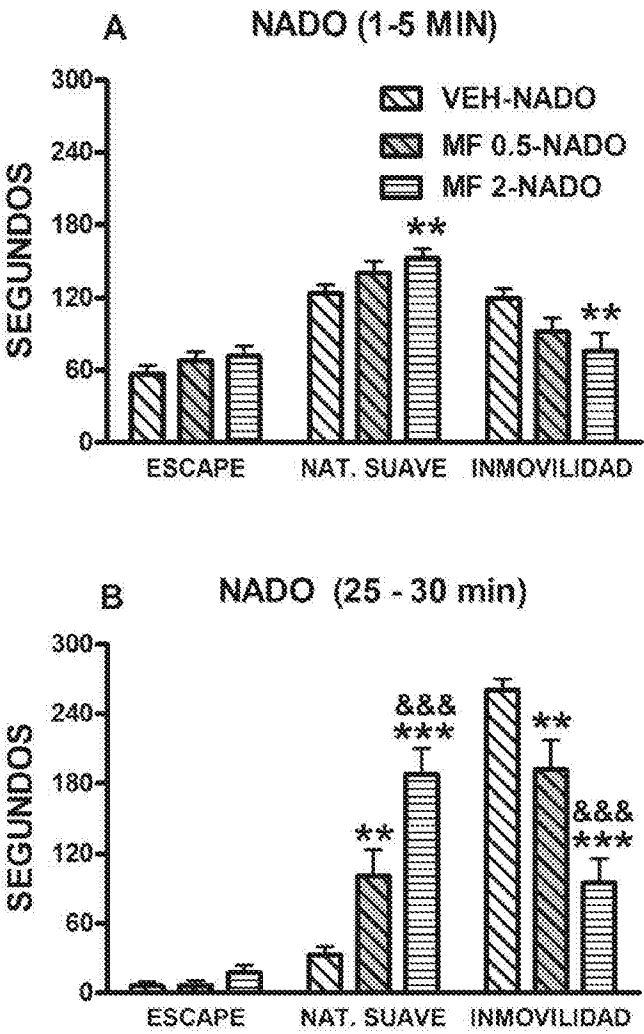


Figura 3

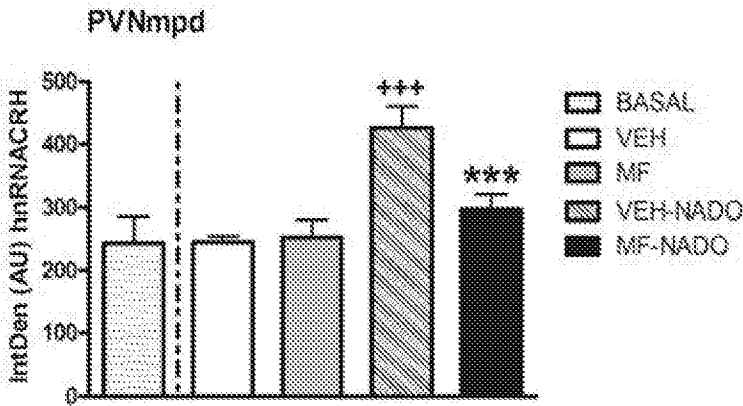


Figura 4

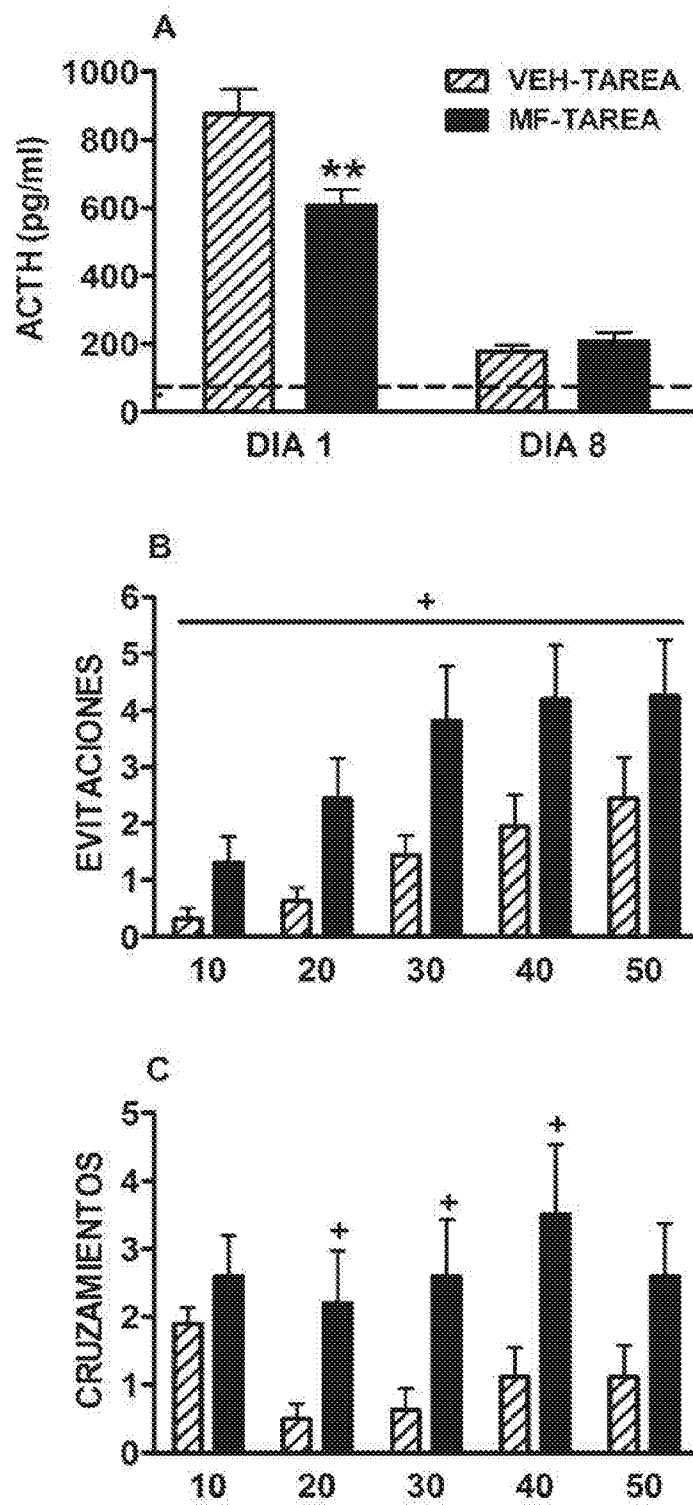


Figura 5

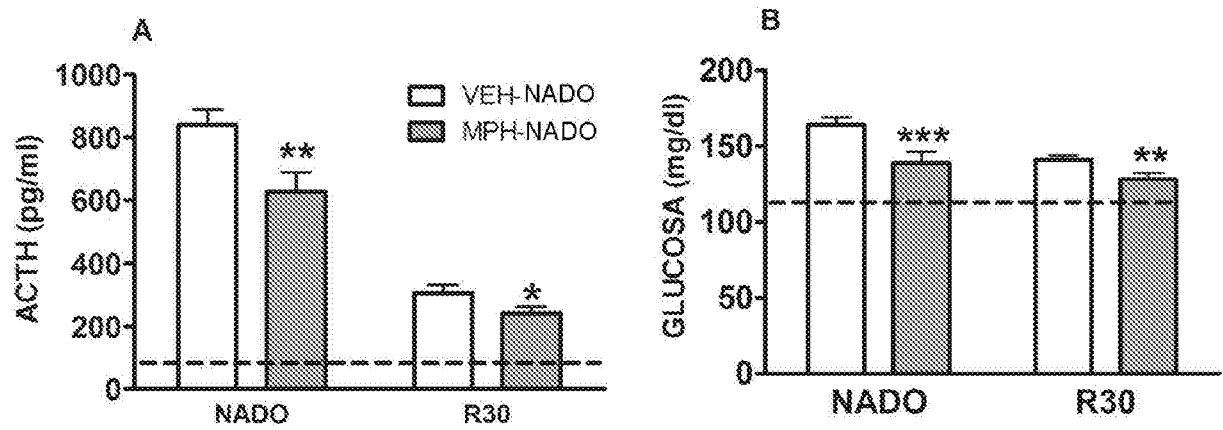


Figura 6

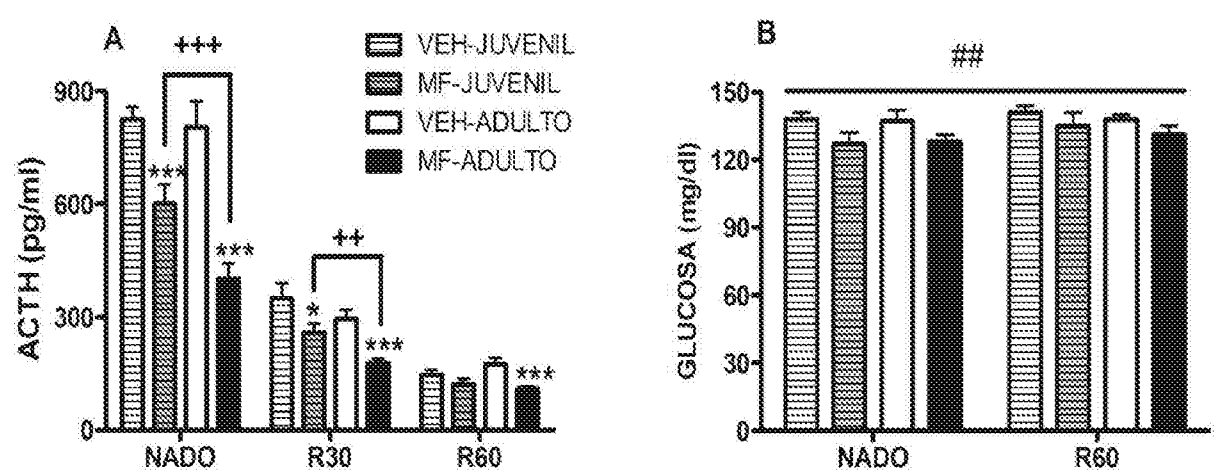
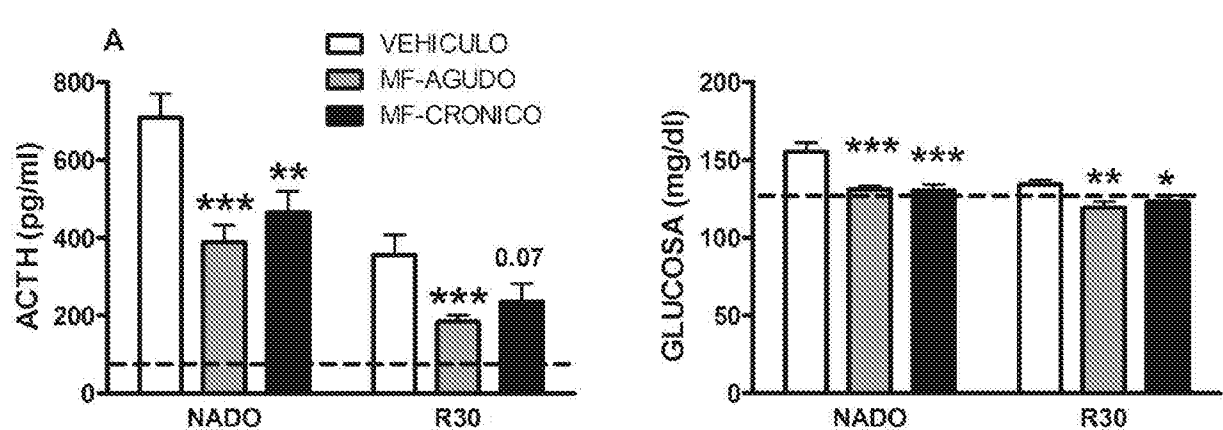


Figura 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070042

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K31/4458** (2006.01)

**A61P25/00** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN, TXPUS, TXPSP, TXPWOEA, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, INTERNET

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | RITOV, G., RICHTER-LEVIN, G. Pre-trauma Methylphenidate in rats reduces PTSD-like reactions one month later. Translational psychiatry (10/01/2017). Vol 7, N° 1. ISSN 2158-3188 (Electronic), Abstract and pages 2-6.                                   | 1-15                  |
| X         | AGA-MIZRACHI, S., CYMERBLIT-SABBA, A. GURMAN, O. et al., Methylphenidate and desipramine combined treatment improves PTSD symptomatology in a rat model. Translational psychiatry (23/09/2014), Vol 4, doi: 10.1038/tp.2014.82, abstract and pages 3-7. | 1-15                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
18/10/2017

Date of mailing of the international search report  
(23/10/2017)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
A. Barrios de la Fuente

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496868

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070042

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
| X                                                     | McALLISTER, T.W., ZAFONTE, R., JAIN, S. et al. Randomized Placebo-Controlled Trial of Methylphenidate or Galantamine for Persistent Emotional and Cognitive Symptoms Associated with PTSD and/or Traumatic Brain Injury. Neuropsychopharmacology (28/10/2015) Vol 41, N° 5., doi: 10.1038/npp.2015.282., pages 1191-1198 . | 1-15                  |
| X                                                     | GAGLIANO, H.A ¿Puede el metilfenidato atenuar el impacto del estrés? un modelo experimental en rata. TDX, Universidad Autónoma of Barcelona. (18/05/2016). <in line>, retrieved of internet URL: < http://hdl.handle.net/10803/382629>                                                                                     | 1-15                  |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070042

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/4458** (2006.01)

**A61P25/00** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN, TXPUS, TXPSP, TXPWEOA, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, INTERNET

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                               | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | RITOV, G., RICHTER-LEVIN, G . Pre-trauma Methylphenidate in rats reduces PTSD-like reactions one month later. Translational psychiatry (10/01/2017). Vol 7, Nº 1. ISSN 2158-3188 (Electronic), resumen y páginas 2-6.                                  | 1-15                                   |
| X          | AGA-MIZRACHI, S., CYMERBLIT-SABBA, A. GURMAN, O. et al., Methylphenidate and desipramine combined treatment improves PTSD symptomatology in a rat model. Translational psychiatry (23/09/2014), Vol 4, doi: 10.1038/tp.2014.82, resumen y páginas 3-7. | 1-15                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
18/10/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**23 de octubre de 2017 (23/10/2017)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
A. Barrios de la Fuente

Nº de teléfono 91 3496868

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070042

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                        |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevante para las reivindicaciones nº |
| X                                                    | McALLISTER, T.W., ZAFONTE, R., JAIN, S. et al.<br>Randomized Placebo-Controlled Trial of Methylphenidate or Galantamine for Persistent Emotional and Cognitive Symptoms Associated with PTSD and/or Traumatic Brain Injury. Neuropsychopharmacology (28/10/2015) Vol 41, Nº 5, doi: 10.1038/npp.2015.282., páginas 1191-1198 | 1-15                                   |
| X                                                    | GAGLIANO, H.A ¿Puede el metilfenidato atenuar el impacto del estrés? un modelo experimental en rata. TDX, Universidad Autónoma de Barcelona. (18/05/2016). <en línea>, recuperado de internet URL: < <a href="http://hdl.handle.net/10803/382629">http://hdl.handle.net/10803/382629</a> >                                   | 1-15                                   |