

MEMORIA DESCRIPTIVA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos depresivos afectan a más de 20 millones de adultos en los Estados Unidos. Los trastornos depresivos se caracterizan por una tristeza lo suficientemente grave o persistente como para interferir con el funcionamiento y, a menudo, por una disminución del interés o el placer en las actividades. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, quinta edición (DSM-5) clasifica algunos trastornos depresivos por síntomas específicos, como el trastorno depresivo mayor (a menudo llamado depresión mayor) o el trastorno depresivo persistente (distimia), y otros por etiología, como trastorno disfórico premenstrual, trastorno depresivo debido a otra condición médica o trastorno depresivo inducido por sustancias/medicamentos. Otro tipo de trastorno depresivo incluye el trastorno bipolar (enfermedad maníaco-depresiva). Se desconocen las causas exactas de los trastornos depresivos, pero se sabe que contribuyen factores genéticos y ambientales.

Los tratamientos de primera línea de los trastornos depresivos generalmente incluyen uno o más de apoyo, psicoterapia y medicamentos antidepresivos. Se pueden usar varias clases de fármacos y medicamentos para tratar los trastornos depresivos, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRs, por su sigla en inglés), moduladores de la serotonina (bloqueadores 5-HT₂), inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (SNRIs, por su sigla en inglés), inhibidores de la recaptación de norepinefrina y dopamina, antidepresivos atípicos, tricíclicos antidepresivos, inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOIs, por su sigla en inglés), antidepresivos melatonérgicos y fármacos similares a la ketamina, donde los ISRS son a menudo el fármaco de elección inicial. Sin embargo, para muchos, encontrar el tratamiento antidepresivo adecuado para los trastornos depresivos puede requerir un enfoque de prueba y error, dado que algunos antidepresivos son solo parcialmente efectivos y están asociados con limitaciones adicionales, que incluyen un inicio lento de la acción terapéutica y efectos secundarios indeseables. La mayoría de los antidepresivos aprobados comparten las mismas vías serotoninérgicas y noradrenérgicas que limitan la diversidad de mecanismos y dejan pocas oportunidades para mejorar los resultados de los pacientes o enfoques de tratamiento personalizados.

Debido al número de adultos afectados, el número y la complejidad de las clases de trastornos y la ineficacia frecuente y la homogeneidad mecánica de los antidepresivos de primera línea, aún existe la necesidad en la técnica de tratamientos novedosos y eficaces de los trastornos depresivos, incluida la depresión mayor. La presente descripción aborda esta

necesidad al proporcionar composiciones y métodos y usos para tratar los trastornos depresivos y ofrece otras ventajas relacionadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción describe ciertos métodos y usos para la molécula pequeña *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida (denominado "Compuesto A" en el presente documento).

En una modalidad, la presente descripción se refiere a un método para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A al ser humano. En ciertos casos, el trastorno depresivo tratado por la administración del Compuesto A es el trastorno depresivo mayor (MDD, por su sigla en inglés), el trastorno de desregulación disruptiva del estado de ánimo, el trastorno depresivo persistente, el trastorno del espectro bipolar, la depresión posparto, el trastorno disfórico premenstrual (PMDD, por su sigla en inglés), el trastorno afectivo estacional (SAD, por su sigla en inglés), depresión atípica, depresión resistente al tratamiento (TRD, por su sigla en inglés), depresión asociada con agitación o ansiedad, trastorno de adaptación con estado de ánimo deprimido, reacción depresiva prolongada o una combinación de los mismos. En determinadas modalidades, el trastorno depresivo tratado por medio de la administración del Compuesto A es un trastorno depresivo mayor (MDD).

En una modalidad adicional, el método para tratar un trastorno depresivo comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A comprende además mejorar la apertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

En otra modalidad, la presente descripción está dirigida a un método para abrir o mejorar la apertura de un canal de potasio Kv7 en un ser humano, que comprende administrar una cantidad eficaz del Compuesto A al ser humano, en donde el ser humano tiene un trastorno depresivo, como los descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, el canal de potasio Kv7 es uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5. En ciertos casos, la apertura o apertura mejorada de uno o más de los canales de potasio Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5 es selectiva sobre Kv7.1. En otros casos, el método comprende la apertura o apertura mejorada del canal de potasio Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

En una modalidad, la presente descripción proporciona un método para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, en donde el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano. En ciertos casos, la administración oral al ser humano comprende una dosis de 2 a 200 mg del Compuesto A por administración. En otros casos, la administración oral al ser humano comprende una dosis de 5-1000 mg por día.

El Compuesto A es una molécula pequeña que se encuentra en desarrollo actualmente para el tratamiento de trastornos convulsivos, y su uso como modulador de los canales de potasio se describe en la Patente US números 8.293.911 y 8.993.593, así como la solicitud US números 16/409,684 y 16/410,851, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Estos y otros aspectos de esta descripción serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada. Con este fin, se establecen varias referencias en el presente documento que describen con más detalle cierta información y procedimientos de antecedentes y cada uno de ellos se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra los resultados de la prueba de nado forzado en ratones, incluida una representación gráfica del tiempo promedio de latencia (segundos, eje y) hasta la inmovilidad para el vehículo, 1 mg/kg de Compuesto A, 3 mg/kg de Compuesto A y dosificación de imipramina (eje x).

La FIGURA 2 muestra los resultados de la prueba de nado forzado en ratones, incluida una representación gráfica del tiempo promedio inmóvil (2-6 min) (seg, eje y) para la dosificación de vehículo, 1 mg/kg de compuesto A, 3 mg/kg de compuesto A e imipramina (eje x).

La FIGURA 3 muestra los resultados de la prueba de nado forzado en ratones, incluida una representación gráfica del tiempo promedio inmóvil (0-6 min) (seg, eje y) para la dosificación de vehículo, 1 mg/kg de compuesto A, 3 mg/kg de compuesto A e imipramina (eje x).

La FIGURA 4 incluye representaciones gráficas de la concentración del Compuesto A en plasma y cerebro (μM , ejes y) para dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg (ejes x).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a métodos y usos novedosos y mejorados para el Compuesto A, particularmente para el tratamiento de trastornos depresivos por medio de la administración del Compuesto A a un paciente humano que lo necesite, incluso por administración oral.

En la siguiente descripción, se exponen ciertos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de varias modalidades. Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que los métodos y usos descritos en el presente documento se pueden practicar sin estos detalles. En otros casos, las estructuras bien conocidas no se han mostrado ni

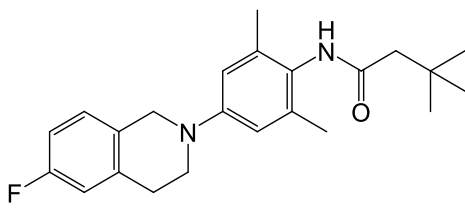
descrito en detalle para evitar oscurecer innecesariamente las descripciones de las modalidades. A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, la palabra “comprende” y sus variaciones, como “comprenden” y “que comprende” se deben interpretar en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como “que incluye, pero no limitado a”. Además, los encabezados proporcionados en el presente documento son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de la invención reivindicada.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “una modalidad” significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en al menos una modalidad. Por lo tanto, las apariciones de las frases “en una modalidad” en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refieren todas a la misma modalidad. Además, las propiedades, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más modalidades. Además, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También se debe tener en cuenta que el término “o” generalmente se emplea en su sentido que incluye “y/o” a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

DEFINICIONES

Tal como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y abreviaturas tienen el significado que se indica:

“Compuesto A” se refiere al compuesto que tiene la siguiente fórmula:



y tiene un nombre químico de *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida. La preparación del Compuesto A y su uso como abridor Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) se describe en la Patente US números 8.293.911 y 8.993.593, así como la solicitud US Nos. 16/409.684 y 16/410.851. El compuesto A es diferente de la mayoría de los AED conocidos en que potencia y mejora la apertura de los canales de potasio controlados por

voltaje Kv7.2 y Kv7.3 (Kv7.2/Kv7.3), que son importantes para controlar la excitabilidad neuronal. El Compuesto A se usa en los métodos y usos descritos en el presente documento.

“Cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de Compuesto A que es suficiente para tratar la enfermedad, el trastorno o la condición indicados o tener el efecto declarado deseado sobre la enfermedad, el trastorno o la condición o uno o más mecanismos subyacentes a la enfermedad, trastorno o condición en un sujeto humano. En ciertas modalidades, cuando el Compuesto A se administra para el tratamiento de un trastorno depresivo, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de Compuesto A que, tras la administración a un ser humano, trata o mejora un trastorno depresivo en el ser humano, o muestra un efecto terapéutico detectable en el ser humano que tiene un trastorno depresivo. El efecto se puede detectar, por ejemplo, por una reducción en el número de episodios depresivos o por la reducción de la gravedad de los episodios depresivos.

“Tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a las aplicaciones terapéuticas asociadas con la administración del Compuesto A que mejoran la enfermedad, el trastorno o la condición indicados o uno o más mecanismos subyacentes de dicha enfermedad, trastorno o condición, incluida la desaceleración o la detención de la progresión de la enfermedad, el trastorno o condición o uno o más de los mecanismos subyacentes en un sujeto humano. En ciertas modalidades, cuando el Compuesto A se administra para el tratamiento de un trastorno depresivo, el tratamiento se refiere a aplicaciones terapéuticas para retrasar o detener la progresión de un trastorno depresivo y/o revertir un trastorno depresivo. La reversión de un trastorno depresivo difiere de una aplicación terapéutica que retarda o detiene un trastorno depresivo en que con un método de reversión, no solo se detiene la progresión de un trastorno depresivo, sino que el comportamiento celular se mueve hasta cierto punto hacia un estado normal que se observaría en ausencia del trastorno depresivo. En algunas modalidades, el tratamiento de un trastorno depresivo que comprende la administración del Compuesto A va acompañado de una alteración de la actividad celular de uno o más canales de potasio Kv7 (por ejemplo, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 y/o Kv7.5, particularmente Kv7.2 y/o Kv7.3, opcionalmente sobre Kv7.1) hacia un nivel normal que se observaría en la ausencia del trastorno depresivo.

“Bajo condiciones de alimentación” se refiere a la condición de haber consumido alimentos durante el período de tiempo entre aproximadamente 4 horas antes de la administración oral de una cantidad efectiva (por ejemplo, dentro del rango de dosis terapéuticamente efectiva) del Compuesto A hasta aproximadamente 4 horas después de la administración del Compuesto A. El alimento puede ser un alimento sólido, líquido o una

mezcla de alimentos sólidos y líquidos con suficiente volumen y contenido de grasa para que no se disuelva y absorba rápidamente en el estómago. En algunos casos, el alimento es una comida, como el desayuno, el almuerzo, la cena o, alternativamente, alimentos para bebés (por ejemplo, fórmula o leche materna). La cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A se puede administrar por vía oral al sujeto, por ejemplo, entre aproximadamente 30 minutos antes y aproximadamente 2 horas después de comer, lo más ventajoso es que la unidad de dosificación del Compuesto A se administre por vía oral durante una comida o dentro de los 15 minutos después de comer una comida.

“En ayunas” se refiere a la condición de no haber consumido alimentos durante el período de tiempo entre al menos 4 horas antes de la administración oral de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A hasta aproximadamente 4 horas después de la administración del Compuesto A.

Modalidades

En algunas modalidades, la presente descripción se refiere a un método para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, que comprende administrar (por ejemplo, por vía oral) una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A al ser humano. En ciertos casos, el trastorno depresivo tratado que comprende la administración del Compuesto A es el trastorno depresivo mayor (MDD), el trastorno de desregulación disruptiva del estado de ánimo, el trastorno depresivo persistente, el trastorno del espectro bipolar, la depresión posparto, el trastorno disfórico premenstrual (PMDD), el trastorno afectivo estacional (SAD), depresión atípica, depresión resistente al tratamiento (TRD), depresión asociada con agitación o ansiedad, o una combinación de las mismas. En determinadas modalidades, la cantidad de Compuesto A administrado es suficiente para reducir la gravedad del trastorno depresivo, la frecuencia del trastorno depresivo o ambos.

En ciertas modalidades, el trastorno depresivo tratado que comprende la administración del Compuesto A es un trastorno depresivo mayor (MDD).

En algunas modalidades, el método para tratar un trastorno depresivo por medio de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A comprende mejorar la apertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

En modalidades adicionales, la presente descripción está dirigida a un método para tratar el trastorno obsesivo-compulsivo (OCD por su sigla en inglés), trastorno de pánico, trastorno de ansiedad social, fobia social, agorafobia, agorafobia con trastorno de pánico, hipocondriasis, trastorno de estrés postraumático (PTSD por su sigla en inglés), trastorno bipolar resistente al tratamiento, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno por déficit de

atención/hiperactividad (ADHD), trastorno bipolar I, trastorno bipolar II, trastorno maníaco, trastorno ciclotímico y trastorno bipolar no especificado, trastorno distímico, trastorno depresivo no especificado, depresión menor, trastorno depresivo breve recurrente, psicosis de tipo depresivo, trastornos del control de los impulsos, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, enfermedad de Parkinson, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, agresión y uso y/o abuso de sustancias, o una combinación de los mismos, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A a un ser humano que lo necesite.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método o uso que comprende abrir o mejorar la apertura de un canal de potasio Kv7, como el canal de potasio Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 y/o Kv7.5, particularmente el canal de potasio Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) en un ser humano que lo necesite por medio de la administración de una cantidad eficaz del Compuesto A. En algunas de tales modalidades, el ser humano tiene un trastorno depresivo, como los descritos en el presente documento.

En ciertos casos, el método o uso descrito en el presente documento comprende abrir o mejorar selectivamente la apertura de un canal de potasio Kv7, como uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5 sobre Kv7.1. En algunas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2, sobre Kv7.1. En otras modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.3, sobre Kv7.1. En otras modalidades más, el método o uso es selectivo para Kv7.4, sobre Kv7.1. En otras modalidades adicionales, el método o uso es selectivo para Kv7.5, sobre Kv7.1. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3, sobre Kv7.1. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3 sobre otros canales de potasio Kv7. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3 sobre Kv7.4 y Kv7.5.

En una modalidad, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, se logran por medio de la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, como de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2,0 mg/kg. Las cantidades representativas más específicas incluyen 0,05 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,20 mg/kg, 0,30 mg/kg, 0,40 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,90 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg y 2,0 mg/kg, o cualquier rango de cantidades creado por medio del uso de dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de

0,1 a 1,0 mg/kg del Compuesto A. En algunos aspectos, el método incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de 0,2 a 0,5 mg/kg del Compuesto A.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, se logra por medio de la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, como 2 a 200 mg del Compuesto A en dosis únicas o divididas. Por ejemplo, el método puede incluir la administración (por ejemplo, por vía oral), en dosis únicas o divididas, de aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 26 mg, aproximadamente 27 mg, aproximadamente 29 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 31 mg, aproximadamente 32 mg, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg, aproximadamente 39 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 41 mg, aproximadamente 42 mg, aproximadamente 43 mg, aproximadamente 44 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 46 mg, aproximadamente 47 mg , aproximadamente 48 mg, aproximadamente 49 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 51 mg, aproximadamente 52 mg, aproximadamente 53 mg, aproximadamente 54 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 56 mg, aproximadamente 57 mg, aproximadamente 58 mg, aproximadamente 59 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 61 mg, aproximadamente 62 mg, aproximadamente 63 mg, aproximadamente 64 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 66 mg, aproximadamente 67 mg, aproximadamente 68 mg, aproximadamente 69 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 71 mg, aproximadamente 72 mg , ab 73 mg, aproximadamente 74 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 76 mg, aproximadamente 77 mg, aproximadamente 78 mg, aproximadamente 79 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 81 mg, aproximadamente 82 mg, aproximadamente 83 mg, aproximadamente 84 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 86 mg, aproximadamente 87 mg,

aproximadamente 88 mg,	aproximadamente 89 mg,	aproximadamente 90 mg,
aproximadamente 91 mg,	aproximadamente 92 mg,	aproximadamente 93 mg,
aproximadamente 94 mg,	aproximadamente 95 mg,	aproximadamente 96 mg,
aproximadamente 97 mg,	aproximadamente 98 mg,	aproximadamente 99 mg,
aproximadamente 100 mg,	aproximadamente 101 mg,	aproximadamente 102 mg,
aproximadamente 103 mg,	aproximadamente 104 mg,	aproximadamente 105 mg,
aproximadamente 106 mg,	aproximadamente 107 mg,	aproximadamente 108 mg,
aproximadamente 109 mg,	aproximadamente 110 mg,	aproximadamente 111 mg,
aproximadamente 112 mg,	aproximadamente 113 mg,	aproximadamente 114 mg,
aproximadamente 115 mg,	aproximadamente 116 mg,	aproximadamente 117 mg,
aproximadamente 118 mg,	aproximadamente 119 mg,	aproximadamente 120 mg,
aproximadamente 121 mg,	aproximadamente 122 mg,	aproximadamente 123 mg,
aproximadamente 124 mg,	aproximadamente 125 mg,	aproximadamente 126 mg,
aproximadamente 127 mg,	aproximadamente 129 mg,	aproximadamente 130 mg,
aproximadamente 131 mg,	aproximadamente 132 mg,	aproximadamente 133 mg,
aproximadamente 134 mg,	aproximadamente 135 mg,	aproximadamente 136 mg,
aproximadamente 137 mg,	aproximadamente 138 mg,	aproximadamente 139 mg,
aproximadamente 140 mg,	aproximadamente 141 mg,	aproximadamente 142 mg,
aproximadamente 143 mg,	aproximadamente 144 mg,	aproximadamente 145 mg,
aproximadamente 146 mg,	aproximadamente 147 mg,	aproximadamente 148 mg,
aproximadamente 149 mg,	aproximadamente 150 mg,	aproximadamente 151 mg,
aproximadamente 152 mg,	aproximadamente 153 mg,	aproximadamente 154 mg,
aproximadamente 155 mg,	aproximadamente 156 mg,	aproximadamente 157 mg,
aproximadamente 158 mg,	aproximadamente 159 mg ,	aproximadamente 160 mg,
aproximadamente 161 mg,	aproximadamente 162 mg,	aproximadamente 163 mg,
aproximadamente 164 mg,	aproximadamente 165 mg,	aproximadamente 166 mg,
aproximadamente 167 mg,	aproximadamente 168 mg,	aproximadamente 169 mg,
aproximadamente 170 mg,	aproximadamente 171 mg,	aproximadamente 172 mg,
aproximadamente 173 mg,	aproximadamente 174 mg,	aproximadamente 175 mg,
aproximadamente 176 mg,	aproximadamente 177 mg,	aproximadamente 178 mg,
aproximadamente 179 mg,	aproximadamente 180 mg,	aproximadamente 181 mg,
aproximadamente 182 mg,	aproximadamente 183 mg,	aproximadamente 184 mg ,
aproximadamente 185 mg,	aproximadamente 186 mg,	aproximadamente 187 mg,
aproximadamente 188 mg,	aproximadamente 189 mg,	aproximadamente 190 mg,
aproximadamente 191 mg,	aproximadamente 192 mg,	aproximadamente 193 mg,

aproximadamente 194 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 196 mg, aproximadamente 197 mg, aproximadamente 198 mg, aproximadamente 199 mg o aproximadamente 200 mg o administrar (por ejemplo, por vía oral) cualquier rango de cantidades creado al usar dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales.

En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de 5 a 50 mg del Compuesto A en dosis únicas o divididas. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 10, 20 o 25 mg del Compuesto A. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 20 mg de compuesto A.

En algunos aspectos, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, se logran por medio de la administración (por ejemplo, por vía oral) de al menos 20 mg del Compuesto A, como al menos 25, 30, 35, 50, 75 o 100 mg del Compuesto A. En algunas modalidades, se logran los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite administrando (por ejemplo, por vía oral) al menos 50 mg de Compuesto A por día, como al menos 60, 75, 85, 100, 125, 150, 175 o 200 mg de Compuesto A por día.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso para tratar un trastorno depresivo en un ser humano que lo necesite, se logra por medio de la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A por día, como como de 5 a 1000 mg de Compuesto A por día, tal como de 5 a 500 mg o de 5 a 250 mg de Compuesto A por día. Por ejemplo, el método o uso puede incluir la administración (por ejemplo, por vía oral) de aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 105 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 185 mg,

aproximadamente 190 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 205 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 215 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 225 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 235 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 245 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 255 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 265 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 275 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 285 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 295 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 305 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 315 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 325 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 335 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 345 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 355 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 365 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 375 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 385 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 395 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 405 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 415 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 425 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 435 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 445 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 455 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 465 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 475 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 485 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 495 mg, aproximadamente 500 mg o aproximadamente 1000 mg del Compuesto A por día, o al administrar por día (por ejemplo, por vía oral) un rango de cantidades creadas por medio del uso de dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de 10 a 200 mg del Compuesto A por día, como 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg a 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg de Compuesto A por día, incluidos 20 a 150 mg por día. En algunos aspectos, la administración oral incluye 50, 75, 100 o 125 mg del Compuesto A por día, como 100 mg por día.

En ciertos casos, las dosis diarias anteriores del Compuesto A se administran (por ejemplo, por vía oral) como dosis múltiples por día, como en dos, tres, cuatro o cinco dosis por día. Por ejemplo, una dosis diaria de 100 mg, se puede administrar en cinco dosis de 20 mg, cuatro de 25 mg, tres de 33,3 mg o dos de 50 mg a lo largo del día.

En algunas modalidades, las dosis diarias anteriores del Compuesto A se administran (por ejemplo, por vía oral) como una dosis única. Por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mg a aproximadamente 50, 65, 75, 100, 125 o 150 mg de Compuesto A por día

se pueden administrar por vía oral como una sola dosis, incluyendo 10-25 mg, 10-30 mg y 10-40 mg por día como dosis única, como 10-25 mg por día como dosis única. De manera relacionada, cualquiera de las dosis del Compuesto A discutidas en los párrafos anteriores se puede incluir en una forma de dosificación unitaria.

En ciertas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, cuando se usa la dosificación diaria descrita en el presente documento, logran un estado estacionario para el Compuesto A dentro de 6 a 9 días, como en aproximadamente 1 semana.

En modalidades adicionales, los métodos o usos discutidos anteriormente para tratar un trastorno depresivo por medio de la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A comprende la administración del Compuesto A al ser humano bajo condiciones de alimentación. En algunas modalidades, la administración oral del Compuesto A a un ser humano bajo condiciones de alimentación (es decir, con alimentos o en proximidad temporal a la ingestión de alimentos) mejora significativamente la biodisponibilidad y exposición del Compuesto A en comparación con la administración oral del Compuesto A al ser humano en ayunas (es decir, sin alimentos o no en proximidad temporal a la ingestión de alimentos). En algunas modalidades, la administración oral del Compuesto A a un ser humano bajo condiciones de alimentación aumenta uno o más parámetros farmacocinéticos para el Compuesto A (por ejemplo, C_{max} , AUC_{inf} , T_{max} , $t_{1/2\lambda_z}$, etc.) en comparación con cuando se administra la misma cantidad de Compuesto A administrado por vía oral al ser humano en ayunas.

En ciertas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento administran el Compuesto A en forma de una composición oral farmacéuticamente aceptable que comprende el Compuesto A y uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. La cantidad de Compuesto A incluida en estas composiciones puede corresponder a una o más de las cantidades descritas en el presente documento. En algunas modalidades, las composiciones son una dosis unitaria.

Los ejemplos de composiciones orales farmacéuticamente aceptables que comprenden el Compuesto A incluyen formulaciones sólidas (tales como tabletas, cápsulas, pastillas para chupar, grageas, gránulos, polvos, obleas, multipartículas y películas), formulaciones líquidas (tales como soluciones acuosas, elixires, tinturas, pulpas, suspensiones y dispersiones) y formulaciones en aerosol (como nebulizaciones y aerosoles). En una modalidad, una composición oral farmacéuticamente aceptable del Compuesto A incluye una suspensión o granulado pediátrico. Todas las cantidades mencionadas anteriormente del Compuesto A se pueden incluir en tales formulaciones, por ejemplo, una cápsula que comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35 mg del Compuesto A.

En otra modalidad, se proporcionan kits para la administración oral del Compuesto A para el tratamiento de un trastorno depresivo después de la administración oral. Dichos kits comprenden una pluralidad de formas unitarias de dosificación oral del Compuesto A en combinación con instrucciones para la administración oral del Compuesto A.

En el presente documento se describen modalidades y ejemplos adicionales de la presente descripción. Estas modalidades y ejemplos son ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención reivindicada.

EJEMPLOS

Se realizaron estudios para determinar el efecto del Compuesto A en un modelo de roedor de desesperación conductual (es decir, prueba de nado forzado en ratón). Un análisis adicional determinó la proporción total de cerebro a plasma del Compuesto A en la prueba de nado forzado. Se llevan a cabo estudios adicionales para determinar el efecto, si lo hay, del Compuesto A en modelos aceptados de depresión.

5.1. Ejemplo 1. Prueba de nado forzado en ratones

Objetivo: Se realizó un estudio para evaluar la eficacia potencial del Compuesto A utilizando la prueba de nado forzado en ratones. La prueba de nado forzado es un modelo de desesperación conductual y es sensible a la detección de varias clases de fármacos antidepresivos (Can et al., The Mouse Forced Swim Test. J. Vis. Exp. 2012 (59), e3638, DOI:10.3791/3638).

Diseño del estudio: Cuarenta (40) ratones CD-1 macho recibieron un período de aclimatación de 1 semana a las instalaciones de prueba antes del comienzo de la prueba (eventos resumidos en la **Tabla 1**). Se alojaron 5 animales por jaula con acceso irrestricto a alimento para roedores y agua (SOP ROD.03.01, SOP ROD.04.01, SOP ROD.18) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h con toda la actividad experimental ocurriendo durante el ciclo de luz de los animales. Todos los procedimientos de uso de animales se realizaron de acuerdo con los principios del Canadian Council on Animal Care (CCAC).

TABLA 1. Resumen de los eventos del estudio

Día de estudio	Evento clave	Procedimiento
-3	Llegada de los animales	Aclimatación de animales a la instalación
0	Prueba de nado forzado	Observaciones generales de salud y pesos corporales Prueba de nado forzado Recolección de sangre y cerebro (N = 20 animales dosificados con el compuesto A)

Formulación del Compuesto A: Se pesó el Compuesto A (99,4% puro) (sin corrección por pureza) y se disolvió en DMSO a 20x la concentración final deseada. La solución madre 20x DMSO del Compuesto A se diluyó 20 veces con metilcelulosa al 0,5% en agua para lograr la concentración final deseada. Cuando el Compuesto A precipitó como una suspensión fina, la agitación o mezcla vorticial produjo una suspensión homogénea. La formulación anterior se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó de manera continua o se mezcló en vórtex antes de la administración de cada dosis. Los artículos de prueba se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2. Artículos de prueba

Artículo de prueba	BEW	Dosis	Ruta	Ppt ¹	Volumen de la dosis	Vehículo
Compuesto A	1	1 y 3 mg/kg	IP	30 min	10 mL/kg	5% DMSO, 0,5% metilcelulosa ² en agua de ósmosis inversa; viscosidad 400 cP
Imipramina ³	1,13	30 mg/kg	IP	30 min	10 mL/kg	Solución salina

¹tiempo de pretratamiento. ²Catálogo Sigma-Aldrich #M0430 (cumple con las especificaciones de prueba de la USP). ³La imipramina es un antidepresivo tricíclico conocido que también puede reducir los síntomas de agitación y ansiedad.

Prueba de nado forzado: Cuarenta (40) ratones CD-1 macho recibieron la dosis apropiada del vehículo, artículo de prueba o control positivo (tratamientos resumidos en la **Tabla 3**). Después de un tiempo de pretratamiento predeterminado (Can et al., 2012), los animales se colocaron suavemente en cilindros de vidrio altos llenos de agua (20-25°C). Después de un período de actividad vigorosa, el ratón adoptó una postura inmóvil

característica y fácilmente identificable. La prueba de natación consistía en puntuar la duración de la inmovilidad. Durante una sesión de prueba de 6 minutos, se registró la latencia hasta la primera inmovilidad (en segundos). También se midió la duración de la inmovilidad (en segundos) durante los últimos 4 minutos de la prueba. No se registró actividad o inactividad de 0 a 2 minutos.

TABLA 3. Resumen de los grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Ruta	Ptt	volumen de la dosis	Tamaño del grupo
A	Vehículo	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
B	Compuesto A (1 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
C	Compuesto A (3 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10
D	Imipramina (30 mg/kg)	IP	30 min	10 mL/kg	N = 10

Resultados: Los resultados de la prueba de nado forzado se muestran en la **Tabla 4** y FIGURAS 1-3.

TABLA 4. Resultados de la Prueba de Nado Forzado

Grupo	ID del animal	Tratamiento	Latencia hasta la inmovilidad (seg)	Tiempo de inmovilidad (seg)		
				0 - 2 min	2 - 6 min	0 - 6 min
A	A1	Vehículo	80	39	222	261
	A2		106	13	226	239
	A3		200	0	188	188
	A4		79	38	209	247
	A5		91	22	119	141
	A6		90	20	148	168
	A7		99	20	190	210
	A8		91	5	199	204
	A9		79	15	121	136
	A10		93	24	192	216
Promedio			100,8	19,6	181,4	201,0
Desviación estándar			11,4	3,9	12,3	13,6
B	B1	Compuesto A (1 mg/kg)	77	32	142	174
	B2		84	28	170	198
	B3		206	0	33	33
	B4		100	16	109	125

Grupo	ID del animal	Tratamiento	Latencia hasta la inmovilidad (seg)	Tiempo de inmovilidad (seg)		
				0 - 2 min	2 - 6 min	0 - 6 min
	B5		70	20	149	169
	B6		109	4	192	196
	B7		144	0	134	134
	B8		105	7	189	196
	B9		130	0	141	141
	B10		80	20	150	170
	Promedio			110,5	12,7	140,9
Desviación estándar			13,0	3,8	14,4	15,8
C	C1	Compuesto A (3 mg/kg)	135	0	166	166
	C2		165	0	144	144
	C3		155	0	122	122
	C4		86	23	184	207
	C5		150	0	82	82
	C6		127	0	146	146
	C7		192	0	101	101
	C8		162	0	90	90
	C9		83	21	163	184
	C10		105	15	166	181
Promedio			136,0	5,9	136,4	142,3
Desviación estándar			11,3	3,1	11,3	13,5
D	D1	Imipramina (30 mg/kg)	224	0	32	32
	D2		213	0	45	45
	D3		180	0	63	63
	D4		169	0	133	133
	D5		215	0	84	84
	D6		350	0	10	10
	D7		163	0	126	126
	D8		244	0	42	42
	D9		360	0	0	0
	D10		126	0	102	102
Promedio			224,4	0,0	63,7	63,7
Desviación estándar			24,3	0,0	14,7	14,7

Análisis estadístico: Los resultados de la **Tabla 4** se probaron para determinar su significación por medio del uso de las pruebas T-, univariadas y de Dunnett, como se muestra en las **Tablas 5-14**.

TABLA 5. Pruebas T para resultados de latencia hasta inmovilidad

	Vehículo	1 mg/kg	3 mg/kg	Imipramina
	80	77	135	224
	106	84	165	213
	200	206	155	180
	79	100	86	169
	91	70	150	215
	90	109	127	350
	99	144	192	163
	91	105	162	244
	79	130	83	360
	93	80	105	126
Prueba-T (cola 1)		0,290	0,021	0,000
Prueba-T (cola 2)		0,581	0,042	0,000

TABLA 6. Pruebas univariadas de significancia para resultados de latencia hasta la inmovilidad (Guadalupe)

Efecto	Parametrización restringida por sigma Descomposición efectiva de la hipótesis; error estándar de estimación 50,44372				
	SS	Degr. de libertad	MS	F	P
Intercepción	817102,2	1	817102,2	321,1161	0,000000
Tratamiento	95120,3	3	31706,8	12,4606	0,000010
Error	91604,5	36	2544,6		

TABLA 7. Resultados de la prueba de Dunnett para la latencia hasta la inmovilidad (Guadalupe)

Nº de célula	Probabilidades de las pruebas post hoc (de dos caras) Error: Entre MSE = 2544,6, df = 36,000	
	Tratamiento	{1} 100,80
1	Vehículo	
2	1 mg	0,949581
3	3 mg	0,290085
4	Imipramina 30 mg	0,000018

TABLA 8. Pruebas T para Resultados de 2-6 min

Vehículo	1 mg/kg	3 mg/kg	Imipramina
222	142	166	32
226	170	144	45

	188	33	122	63
	209	109	184	133
	119	149	82	84
	148	192	146	10
	190	134	101	126
	199	189	90	42
	121	141	163	0
	192	150	166	102
Prueba-T (cola 1)		0,023	0,007	0,000
Prueba-T (cola 2)		0,046	0,015	0,000

TABLA 9. Pruebas Univariadas de Significancia para Resultados de 2-6 min (Guadalupe)

Efecto	Parametrización restringida por sigma Descomposición efectiva de la hipótesis; error de estimación 41,83426				
	SS	Degr. de libertad	MS	F	P
intercepción	682254,4	1	682254,5	389,8361	0,000000
Tratamiento	71959,8	3	23986,6	13,7058	0,000004
Error	63003,8	36	1750,1		

TABLA 10. Prueba de Dunnett para resultados de 2-6 min (Guadalupe)

Nº de célula	Probabilidades de las pruebas post hoc (de dos caras) Error: Entre MSE = 1750.1, df = 36,000	
	Tratamiento	{1} 181,40
1	Vehículo	
2	1 mg	0,093513
3	3 mg	0,055570
4	Imipramina 30 mg	0,000008

TABLA 11. Pruebas T para Resultados de 0-6 min

Vehículo	1 mg/kg	3 mg/kg	Imipramina
261	174	166	32
239	198	144	45
188	33	122	63
247	125	207	133
141	169	82	84
168	196	146	10
210	134	101	126
204	196	90	42

	136	141	184	0
	216	170	181	102
Prueba-T (cola 1)		0,018	0,003	0,000
Prueba-T (cola 2)		0,035	0,007	0,000

TABLA 12. Pruebas Univariadas de Significancia para Resultados de 0-6 min (Guadalupe)

Efecto	Parametrización restringida por sigma Descomposición efectiva de la hipótesis; error de estimación 45,57429				
	SS	Degr. de libertad	MS	F	P
intercepción	785680,9	1	785680,9	378,2738	0,000000
Tratamiento	97328,5	3	32442,8	15,6199	0,000001
Error	74772,6	36	2077,0		

TABLA 13. Prueba de Dunnett para resultados de 0-6 min (Guadalupe)

Nº de célula	Probabilidades de las pruebas post hoc (de dos caras) Error: Entre MSE = 2077,0, df = 36,000	
	Tratamiento	{1} 201,00
1	Vehículo	
2	1 mg	0,066283
3	3 mg	0,018039
4	Imipramina 30 mg	0,000008

La Tabla 5-13 muestra que el Compuesto A muestra efectos estadísticamente significativos en el modelo de prueba de nado forzado en ratones. Por ejemplo, la dosis de 3 mg/kg dio una puntuación de prueba T de 2 colas de 0,042, 0,015 y 0,007 (por ejemplo, <0,05) para los resultados de latencia hasta la inmovilidad, 2-6 min y 0-6 min respectivamente.

Recolección de sangre y cerebro: Inmediatamente después de la prueba de nado forzado, todos los animales que recibieron la dosis del artículo de prueba se anestesiaron con inhalante de isoflurano y se realizó una recolección de sangre terminal (~1 ml) por medio de punción cardíaca en tubos de recolección de sangre con EDTA de potasio (SOP ROD.14.02). El plasma se aisló de la sangre completa por centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Una vez aislado, el plasma se colocó en crioviales y se congeló a -80°C hasta su envío para bioanálisis. Después de la extracción de sangre, los animales se decapitaron y se extrajo el cerebro completo según el procedimiento operativo estándar (SOP ROD.59). Los cerebros se pesaron, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80°C hasta el envío. Las concentraciones en sangre y cerebro del Compuesto A se muestran en la FIGURA

4. La relación cerebro-plasma total (relación *B/P*) de 2,2 para las dosis de 1 y 3 mg/kg sugiere una buena penetración en el SNC *in vivo*.

Ejemplo 2. Prueba de suspensión de cola

La prueba de suspensión de la cola (TST por su sigla en inglés) se ha convertido en uno de los modelos más utilizados para evaluar la actividad similar a la de los antidepresivos en ratones. La prueba se basa en el hecho de que los animales sometidos al estrés ineludible a corto plazo de estar suspendidos por la cola, desarrollarán una postura inmóvil. El protocolo se describe en Cryan, J.F. et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005, 29:571-625.

Descripción: El aparato consiste en dos unidades de suspensión de tres jaulas cada una y permite probar seis ratones simultáneamente. Cada ratón está suspendido por la cola con cinta adhesiva a un gancho conectado a una galga extensométrica. La galga extensométrica recoge todos los movimientos del ratón y los transmite a una unidad central, que digitaliza las señales. Las señales se muestran visualmente por medio de LEDs, que permiten verificar en línea el buen funcionamiento de cada unidad. Incluido en la unidad central hay un dispositivo de filtrado de nivel (del 1 al 9), que se puede ajustar a la sensibilidad deseada para proporcionar la máxima discriminación de los movimientos corporales gruesos de otros micromovimientos de los animales o de sus órganos internos.

Parámetros: La “duración de la inmovilidad” es el principal parámetro medido. Se calcula a partir del tiempo acumulado durante el cual los movimientos de los animales no superan el umbral determinado por el dispositivo de filtrado de nivel. La “energía” gastada por el animal durante la prueba se mide por amplitudes acumuladas de movimientos individuales en unidades arbitrarias. La “potencia de los movimientos” se calcula a partir de la energía total gastada por el animal durante la prueba, dividida por el tiempo total que el animal está activo (unidades arbitrarias). Para los tres parámetros, una computadora proporciona la recopilación de datos, la generación de un esquema experimental (aleatorización) y agrupaciones de resultados (medias, medianas y SEM se calculan de manera automática para cada grupo de tratamiento).

Procedimiento: el día de la prueba, los ratones se trasladan de la sala de la colonia de alojamiento al laboratorio de pruebas (las jaulas se cubren con un filtro durante el transporte), donde la cubierta del filtro se retira inmediatamente y los ratones permanecen tranquilos durante al menos 1 h antes de la prueba. A continuación, los ratones se tratan con el fármaco y, después de 1 h (PO) o 30 min (IP) de tratamiento, los ratones son suspendidos por la cola (por ejemplo, con cinta adhesiva) en el aparato TST de acuerdo con un esquema de aleatorización. La prueba dura 6 min para obtener las medidas de los tres parámetros. Los

experimentos se llevan a cabo entre las 08:00 y las 12:30. Normalmente, se utilizan 12 ratones por grupo de tratamiento.

Tratamiento farmacológico: el Compuesto A y la imipramina se formulan y administran a las concentraciones descritas en la **Tabla 2** del Ejemplo 1 anterior y se dosifican 30 min antes de la TST. Para cada experimento, al menos un grupo de control se incluye, manipula y prueba en paralelo bajo condiciones experimentales estrictamente idénticas.

Estadísticas: para cada experimento, la significación estadística del parámetro “tiempo de inmovilidad” se evalúa utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido, cuando corresponda, de un análisis post-hoc utilizando la prueba de Dunnett. Si la prueba de normalidad de los parámetros “energía” y “potencia de los movimientos” falla, las comparaciones entre grupos se realizan por medio del análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis sobre rangos seguido por, cuando corresponda, un análisis post-hoc utilizando la prueba de Dunn. Para los tres parámetros, los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Ejemplo 3. Preferencia de sacarosa y autoestimulación intracraneal

La ingesta de sacarosa y la autoestimulación intracraneal (ICSS por su sigla en inglés) son medidas hedónicas para los déficits conductuales inducidos por estrés leve crónico (CMS por su sigla en inglés) en roedores. El protocolo se describe en Nielsen, C.K. et al., Behav. Brain Res. 2000, 107:21-33. Se realiza un estudio para evaluar la eficacia potencial del Compuesto A por medio del uso del modelo CMS.

Sujetos: Se utilizan ratas Wistar macho y ratas encapuchadas Pieball Virol Glaxo (PVG) macho que pesan 250-300 y 220-240 g, respectivamente, al comienzo del estudio. Las ratas se alojan individualmente o en parejas en jaulas de policarbonato y se mantienen en un ciclo de luz:oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 06:00). Excepto cuando así lo exija la prueba, los animales tienen libre acceso al alimento y al agua. La temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$.), la humedad relativa ($55 \pm 5\%$) y los intercambios de aire (16 veces por hora) se controlan de manera automática. El peso corporal se mide semanalmente durante todos los experimentos.

Tratamiento farmacológico: el Compuesto A y la imipramina se formulan y administran a las concentraciones descritas en la **Tabla 2** del Ejemplo 1 anterior diariamente durante los regímenes de estrés y/o autoestimulación intracraneal. Para cada experimento, al menos un grupo de control se incluye, manipula y prueba en paralelo bajo condiciones experimentales estrictamente idénticas.

Regímenes de estrés: Se utilizan dos regímenes de estrés diferentes (CMS-1 y CMS-2). Cada semana de CMS-1 consta de dos períodos (8 y 19 h) de privación de alimentos; tres períodos (6, 7 y 19 h) de privación de agua; 2 períodos (7 y 16 h) de inclinación de la jaula (45°); dos periodos de 17 h de alojamiento en pareja; un período de 17 h en una jaula sucia (200 ml de agua en 100 g de lecho de aserrín); un período de 6 h de iluminación estroboscópica de baja intensidad (150 flashes:min); y 48 h de inversión luz:oscuridad. Cada semana de CMS-2 consta de un período de 17 h de privación de alimentos y agua seguido inmediatamente de 2 h de acceso restringido a los alimentos; un período de 17 h de privación de agua seguido inmediatamente de 1 h de exposición a una botella vacía; un período de 17 h de alojamiento en pareja en una jaula sucia (200 ml de agua en 100 g de lecho de aserrín); ocho períodos de 1 h de confinamiento en jaulas pequeñas (25×10×10 cm); un período de iluminación nocturna; y 64 h de ciclo inverso luz:oscuridad durante el fin de semana.

Medidas Hedónicas

Ingesta de sacarosa: Se adquieren ratas (ratas Wistar para algunos experimentos y ratas con capucha PVG para otros experimentos) dos veces por semana (martes y viernes) para consumir una solución de sacarosa al 1%. La adquisición consta de 8-10 pruebas de referencia de 1 h en las que se les presenta una solución de sacarosa, en su jaula de origen, tras un período de 20 h de privación de alimentos y agua. La ingesta de sacarosa se mide pesando las botellas antes y después de la prueba. Después de niveles de referencia estables, el consumo de sacarosa se mide durante el protocolo CMS, en condiciones similares, a intervalos semanales (miércoles), a lo largo de los experimentos. La privación de alimentos y agua antes de las pruebas de sacarosa es un factor estresante sobre el que se imponen los factores estresantes posteriores incluidos en el régimen de CMS, un historial estresante previo que no se considera en ningún análisis posterior.

Autoestimulación intracraneal: Las ratas (ratas Wistar para algunos experimentos y ratas con capucha PVG para otros experimentos) se alojan en parejas y se dejan aclimatar durante 2 semanas antes de la cirugía. Se anestesian y se montan en un marco estereotáxico con la barra incisiva establecida 2,7 mm por debajo de la línea interaural. Los electrodos bipolares de acero inoxidable se implantan de manera unilateral en el área tegmental ventral (VTA por su sigla en inglés) con las puntas de los electrodos separadas por 0,5 mm. Las coordenadas utilizadas son 3,2 mm anterior a la línea interaural, 0,6 mm lateral desde la línea media y 8,2 mm ventral desde la superficie del cráneo. Se utilizan cinco tornillos de acero inoxidable y cemento dental para anclar el conjunto de electrodos al cráneo. Dos semanas después de la operación, se entrena a cada rata para hacer un movimiento de nariz para

recompensar la estimulación eléctrica intracraneal en una cámara de prueba colocada en una caja con sonido atenuado. Al meter la nariz en un orificio (2,5 cm de diámetro) ubicado en la pared lateral, 1 cm por encima del piso, se interrumpe un haz de luz convergente, lo que inicia la estimulación cerebral administrada a través de un estimulador de corriente constante. Cada movimiento de nariz produce un tren de pulsos monofásicos de onda cuadrada de 0,5 s, cada uno de 0,1 ms de duración. La estimulación se entrega bajo un esquema de refuerzos de 1 s de intervalo fijo para evitar una densidad extrema de estimulación. La estimulación eléctrica y el registro de datos se controlan a través de una computadora y una interfaz. Las ratas se entrenan inicialmente a una frecuencia de estimulación fija de 70 Hz y una intensidad de corriente seleccionada de manera individual (70-300 mA) para mantener la tasa de respuesta más alta posible sin inducir deterioro motor. Se entrenan diariamente en sesiones de 40 min durante aproximadamente 3 semanas. Posteriormente, se establecen curvas de tasa-frecuencia cambiando la frecuencia de manera gradual mientras se mantiene constante la intensidad de la corriente. A intervalos de 2 min, la frecuencia se reduce y luego se aumenta en pasos de 0,05 a 0,2 unidades logarítmicas en el rango de 1,1 a 1,9 log Hz (10 a 85 Hz). Cada sesión consta de 15 pruebas discretas de 2 minutos para cada frecuencia con 1 estimulación de cebado al comienzo de cada prueba. Las series decrecientes de frecuencias se utilizan como fase de calentamiento; es decir; solo los datos obtenidos de la fase ascendente se utilizan en los cálculos posteriores. Las series crecientes de frecuencias se seleccionan individualmente para producir una curva ascendente con al menos dos puntos adyacentes a la tasa de respuesta máxima y mínima, respectivamente. Este estudio emplea la versión de frecuencia de tasa del método de cambio de curva para evaluar el efecto de CMS en la recompensa. Las propiedades de la función de tasa-frecuencia, en particular con respecto a la separación de los efectos de recompensa del ICSS en el motor operante: la capacidad de rendimiento, se han validado e investigado ampliamente. El comportamiento del ICSS se evalúa al determinar la frecuencia que admitirá el 50 % de la tasa de respuesta máxima, la frecuencia efectiva (EF_{50}). Basado en el principio de "línea discontinua", se describe un modelo matemático para estimar EF_{50} . Este método proporciona estimaciones EF_{50} fiables y estables. Cada día de prueba se generan curvas de tasa-frecuencia ascendentes para cada rata por medio del modelado de la tasa de respuesta observada (golpes en la nariz (NP): prueba de 2 min) como una función de $\log_{10}$ de la frecuencia impuesta (F). La función consta de tres segmentos lineales; una asíntota inferior horizontal a través de la respuesta mínima ($NP_{\min}$), una asíntota superior horizontal a través de la respuesta máxima ($NP_{\max}$) y una transición lineal entre las asíntotas ($a+b \cdot F$). Solo se incluyen

los datos (M) entre el último $NP_{\min}$ y el primer $NP_{\max}$. Esto se puede describir por medio de las siguientes ecuaciones:

1. Considerar $M=\{(F, NP(F)) | \max\{F | NP(F)=NP_{\min}\}$

$$\leq F \leq \min\{F | NP(F)=NP_{\max}\}\}$$

2. Ajuste $f(F)$ $\min(\max(a+b \cdot F, NP_{\min}), NP_{\max})$ a los datos en M por medio del procedimiento de mínimos cuadrados. En caso de ambigüedad, se utiliza la función con la b más pequeña.

Se determina la frecuencia efectiva (EF_{50}), definida como la frecuencia que soportará el 50% de la tasa de respuesta máxima. Un cambio de curva lateral a lo largo del eje de las frecuencias de simulación, es decir, un cambio en EF_{50} , reflejará cambios en la eficacia de recompensa de la estimulación. La prueba de tasa de frecuencia se realiza dos veces por semana (martes y viernes). Se logra una respuesta estable cuando la respuesta máxima no mostró tendencias crecientes o decrecientes y cuando EF_{50} varió menos del 10-12%. Los animales se asignan posteriormente a dos grupos emparejados.

Diseño de experimentos

Los efectos sobre la ingesta de sacarosa en ratas Wistar expuestas al régimen CMS-1 (ver arriba): Las ratas Wistar se llevan al laboratorio 4 semanas antes de comenzar el experimento. Excepto cuando lo requiera el protocolo de estrés, los animales se alojan individualmente. De acuerdo con las ingestas de sacarosa de referencia, los animales se distribuyen en dos grupos emparejados. Un grupo de ratas se somete a CMS-1 durante un período de 6 semanas, mientras que el otro grupo se mantiene en condiciones estándar de laboratorio.

Los efectos sobre la ingesta de sacarosa en ratas encapuchadas con PVG expuestas al régimen CMS-1 (ver arriba): Las ratas encapuchadas con PVG se llevan al laboratorio 3 semanas antes de comenzar el experimento. Excepto cuando lo requiera el protocolo de estrés, los animales se alojan individualmente. De acuerdo con las ingestas de sacarosa de referencia, los animales se asignaron a dos grupos emparejados. Un grupo de ratas se somete a CMS-1 durante un período de 9 semanas, mientras que el otro grupo se mantiene en condiciones estándar de laboratorio.

Los efectos sobre el ICSS en ratas Wistar expuestas al régimen CMS-2 (ver arriba): Las ratas Wistar se asignan a un grupo, se alojan individualmente y se someten a 10 semanas de CMS-2 y otro grupo (grupo de control), se emparejan y se alojan bajo condiciones estándar de laboratorio. Su EF_{50} se determina dos veces por semana y se realizan comparaciones con la media de las dos últimas pruebas de referencia para cada rata individual.

Los efectos de la tensión de la rata y el régimen de estrés en el comportamiento del ICSS (ver arriba): las ratas Wistar se asignan a tres grupos emparejados; un grupo de control y dos grupos sometidos a 9 semanas de CMS-1 y CMS-2, respectivamente. Las ratas PVG se asignan a dos grupos emparejados; un grupo se somete a 9 semanas de CMS-2 y el otro grupo (grupo de control) se mantiene en condiciones estándar de laboratorio. Los grupos de control se alojan en parejas. Excepto cuando lo requiera el protocolo de estrés, las ratas de los grupos de estrés se alojan individualmente. Su EF_{50} se determina dos veces por semana y se realizan comparaciones con la media de las dos últimas pruebas de referencia para cada rata individual.

Histología: Después de completar la prueba ICSS, los animales se sacrifican y se extraen los cerebros y se almacenan a 80°C. Se cortan secciones de 12 mm en un criostato antes de teñirlas con violeta de cresilo. La colocación de la punta del electrodo se determina en los planos frontales del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson.

Análisis estadístico: además de las comparaciones de homogeneidad de normalidad o de varianza entre las pruebas del grupo de control y del grupo de estrés, tanto para la ingesta de sacarosa como para los datos del ICSS, los datos también se pueden evaluar por medio de estadísticas no paramétricas. Los análisis de varianza (ANOVA) de dos vías se realizan en rangos, con días y tratamiento (estrés) como factores y con animales anidados en el tratamiento, lo que implica que un conjunto de parámetros corresponde a una sola observación. Todas las observaciones son, por tanto, independientes. En los experimentos del ICSS, puede haber una subclasificación del grupo de estrés. Si la respuesta media total de un animal estresado supera la respuesta media máxima del grupo de control, se clasifica como perteneciente a un subgrupo. Antes de las comparaciones entre el estrés (grupo secundario y principal) y el grupo de control, la respuesta del subgrupo de estrés y el grupo principal se comparan por medio de ANOVA de dos vías en rangos, con días y grupo como factores y con animales anidados en grupos. Los efectos principales significativos ($p < 0,05$) en el tratamiento son seguidos por una prueba t no pareada para cada día. Para mayor claridad, tanto los datos de consumo de sacarosa como los datos del ICSS se pueden presentar como $\text{media} \pm \text{SEM}$, aún realizando un análisis no paramétrico. Los datos de peso corporal que pasan las pruebas de homogeneidad de normalidad y varianza se analizan por medio de ANOVA de una o dos vías. Se realizan comparaciones múltiples por medio de la prueba de Tukey y/o se utiliza ANOVA de Kruskal-Wallis en rangos.

Ejemplo 4. Hipofagia inducida por novedad

La inhibición de la alimentación producida por la novedad, denominada “hiponeofagia”, proporciona una medida relacionada con la ansiedad que es sensible a los efectos del tratamiento antidepresivo crónico, pero no agudo o subcrónico. El protocolo se describe en Dulawa, S.C. and Hen, R., *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005, 29:771-83.

Selección de sujetos: Los ratones Balb/cJ macho se mantienen en un horario de 12 L:12 D (las luces se encienden a las 06:00) y se alojan en grupos de cinco con ratones del mismo tipo. La comida y el agua se proporcionan ad libitum. Las pruebas de comportamiento ocurrieron durante la fase de luz entre las 07:00 y las 17:00.

Aparato y Procedimiento: El Compuesto A y la imipramina se formulan y administran a las concentraciones descritas en la **Tabla 2** del Ejemplo 1 anterior, aplicadas al menos 30 minutos antes de la prueba. Los niveles de compuesto A en plasma se determinan por medio de cromatografía líquida con detección de fluorescencia.

Ensayo crónico: Se dosifican ratones Balb/cJ macho (por ejemplo, 1 y 3 mg/kg por día de Compuesto A). Se utilizan grupos separados de ratones para experimentos subcrónicos frente a crónicos. El día 23 de tratamiento, los ratones se alojan individualmente. Los ratones se entrenan para beber leche condensada azucarada durante tres días consecutivos (días 25-27). A los ratones se les presenta leche condensada azucarada diluida (1:3; leche:agua) durante 30 min cada día. La leche se presenta en pipetas serológicas de 10 ml con sipper adheridos con Parafilm. Las pipetas se cierran con tapones de goma y se colocan a través de tapas de jaulas de alambre. Las pruebas en jaulas domésticas se realizan el día 28, cuando los ratones se retiran brevemente de sus jaulas para colocar las pipetas que contienen leche, y las pruebas comienzan cuando los ratones se devuelven a sus jaulas. Se registra la latencia para beber y el volumen consumido cada 5 minutos durante 30 minutos. La prueba de la jaula doméstica se realiza con poca luz (aprox. 50 lux). Las nuevas pruebas en jaulas se realizan el día 29, cuando los ratones se colocan en nuevas jaulas limpias de las mismas dimensiones pero sin virutas, con pipetas que contienen la leche colocadas. Las nuevas pruebas en jaulas se realizan bajo una iluminación brillante (aprox. 1200 lux), con papel blanco colocado debajo de las jaulas para aumentar la aversión. Los ratones que nunca bebieron durante los 30 minutos de la prueba de la jaula doméstica se eliminan del experimento porque, presumiblemente, nunca aprendieron a beber leche durante el entrenamiento. La prueba subcrónica se lleva a cabo por medio del uso de un grupo separado de ratones Balb/cJ machos a los que se dosifica (por ejemplo, 1 y 3 mg/kg por día de Compuesto A). Los ratones se alojan individualmente y luego se entrenan para beber la leche a partir del día 1 de tratamiento. Los ratones están entrenados para beber la leche condensada azucarada en los

días 1-3. Luego se prueban en la prueba de hipofagia inducida por la novedad después de 4 (doméstica) y 5 (nueva) días de tratamiento subcrónico.

Ejemplo 5. Modelo de indefensión aprendida

El paradigma de la indefensión aprendida es un modelo de depresión en el que los animales están expuestos a un estrés impredecible e incontrolable, por ejemplo, descargas eléctricas, y posteriormente desarrollan déficits de afrontamiento de situaciones aversivas pero evitables. El protocolo se describe en Chourbaji, S. et al., Brain Res. Protoc. 2005, 16:70-8.

Materiales: El procedimiento de descarga se aplica en una cámara de descarga de plexiglás transparente (18×18×30 cm³), equipada con un piso de rejilla de acero inoxidable (diámetro de cada rejilla: 0,5 cm, espaciado: 0,6 cm). La prueba de evasión bidireccional se lleva a cabo en una caja de transporte de dos compartimentos, equipada con haces de luz infrarroja en la parte inferior de cada uno de los dos compartimentos para controlar el desplazamiento espontáneo, así como las respuestas conductuales a un estímulo luminoso (condicionada) o a una descarga eléctrica en las patas aversiva (incondicionada), respectivamente. La caja de transporte consta de compartimentos de igual tamaño (18×18×30 cm³) que están separados por una pequeña puerta (6 cm de ancho y 7 cm de alto). Ambos compartimentos de la caja de transporte contienen un suelo de rejilla (diámetro de cada rejilla: 0,5 cm, distancia: 0,6 cm), a través del cual se aplica la corriente, y una luz de señalización en la parte superior de cada compartimento. Se diseñan gráficos de protocolo para el procedimiento de descarga y la prueba de la caja de transporte, respectivamente.

Placa calefactora: para excluir la sensibilidad alterada al dolor como factor de confusión, todos los ratones se prueban en una placa calefactora.

Tratamiento farmacológico: El modelo se valida farmacológicamente con el Compuesto A e imipramina formulados y administrados a las concentraciones descritas en la **Tabla 2** del Ejemplo 1 anterior, aplicadas al menos 30 min antes de la prueba. Se accede a la capacidad del Compuesto A para revertir el comportamiento indefenso en la caja de transporte.

Animales: Se compran ratones C57BL/6N machos de 10 semanas de edad y se aclimatan a un alojamiento individual en jaulas de policarbonato (tipo II) en condiciones constantes con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y una temperatura ambiente promedio de 22°C durante 2 semanas previo a los experimentos, con alimento y agua ad libitum.

Procedimiento de descarga ineludible:

1. Los ratones están expuestos a descargas ineludibles durante su fase activa (oscura). Los animales se transportan en sus jaulas de origen a la sala experimental y luego se colocan en la cámara de descarga.
2. El procedimiento de descarga comprende 360 descargas de pie revuelto (0,150 mA) en dos días consecutivos. Las descargas en las patas son impredecibles, con duración variable (1-3 s) y episodios de intervalo (1-15 s), que suman una duración total de la sesión de aproximadamente 52 minutos. Durante la exposición a la descarga, las luces se apagan.
3. Los animales de control se someten a los mismos procedimientos contextuales y de manipulación sin recibir las descargas en las patas. Por medio de una limpieza a fondo con etanol al 70%, se tiene cuidado de que los animales de control, que no reciben descargas eléctricas, estén expuestos a las cámaras de descarga sin que les moleste el olor de los ratones electrocutados. La limpieza diaria con jabón evita la fijación de posibles sustancias de alarma.

Evaluación de la indefensión aprendida: 24 h después del segundo procedimiento de descarga, la indefensión aprendida se evalúa en la fase oscura de los animales por medio de la prueba del rendimiento de la caja de transporte. Cada prueba comienza con un estímulo de luz de 5 s, anunciando una posterior descarga en las patas de una duración máxima de 10 s (intensidad: 0,150 mA). El intervalo entre ensayos es de 30 s. Se definen las siguientes reacciones conductuales: “evitación” como reacción adecuada al estímulo de la luz por medio del cambio al otro compartimento inmediatamente, “escape” como ir al otro compartimento como reacción a la descarga eléctrica y “fracaso” cuando no se hace el intento de escapar. Además, el parámetro de latencia de escape se registra como el tiempo necesario para trasladarse al otro compartimento después del inicio de la descarga eléctrica en las patas. Para la determinación de la actividad general, se registran los saltos antes de la primera descarga eléctrica en las patas (actividad inicial), así como la actividad entre las pruebas (actividad de intervalo entre pruebas o ITI). El tiempo total de la prueba de indefensión dura aproximadamente 20 a 24 minutos, dependiendo el período de tiempo exacto de la capacidad del animal para aprender el paradigma y responder adecuadamente. Antes de cada ensayo, el aparato se limpia a fondo con etanol al 70%. Para subrayar la evaluación de los efectos de indefensión aprendida “verdaderos”, que se basa en la falta de control del estrés, se prueba una cohorte adicional de animales para la inmunización. Estos animales están expuestos a una sesión previa, idéntica a la prueba de indefensión aprendida en la caja de transporte, en la que experimentan una condición de descarga eléctrica controlable. Además, se controla la actividad inicial durante la preexposición.

Sensibilidad al dolor: para excluir posibles artefactos por sensibilidades alteradas al dolor, que podrían influir en el efecto de las descargas eléctricas, se prueba un subgrupo de ratones en la placa calefactora antes del procedimiento de indefensión aprendida a una temperatura de 52°C. La latencia a la primera reacción (saltando o lamiendo las patas traseras) es monitoreado.

Definición de indefensión: Tras la evaluación de los parámetros de comportamiento, los animales electrocutados se clasifican como “indefensos” o “resistentes”, según su desempeño en la prueba de la caja de transporte. Las fallas y las latencias de escape se toman como indicadores de indefensión, y se aplica un algoritmo de agrupamiento de k-medias ($k = 2$) a un conjunto de datos de ratones sujetos al protocolo descrito. El número de fallas y las latencias de escape se utilizan como puntajes de desempeño de los animales individuales, porque estos son los índices de indefensión más comúnmente informados. Estos índices de comportamiento se normalizan (es decir, se transforman en puntajes Z) para evitar diferencias en el rango de cada variable, lo que podría producir un sesgo y luego, sin darse cuenta, se puede usar para implementar un proceso de agrupación. Esta clasificación se refina aún más por medio de un análisis canónico discriminante de dos pasos, que también proporciona ecuaciones de clasificación para la identificación de ratones indefensos/no indefensos siguiendo este protocolo.

Validación farmacológica: Se entrenan y prueban ratones C57BL/6N adicionales en el protocolo. Antes de cualquier tratamiento farmacológico, estos ratones se clasifican como “indefensos” o “no indefensos” por medio del uso de las ecuaciones de clasificación obtenidas previamente (por ejemplo, la definición de indefensión anterior) que tiene en cuenta el número de fallas y la latencia para escapar. La duración de la indefensión durante aproximadamente 10 días dictó un intervalo de tratamiento del Compuesto A de corta duración de 5-6 días. Por lo tanto, los animales se someten a 5 días de un régimen de Compuesto A. El día 6, los animales se vuelven a analizar en el protocolo. Las ecuaciones de clasificación se usan nuevamente para clasificar cada sujeto, pero ahora los valores de la sesión de reevaluación se usan para el cálculo. Los cambios en esta clasificación categórica (es decir, ratones que pasan del grupo “indefenso” al grupo “no indefenso”) después del tratamiento con el Compuesto A, se consideran como un índice de sensibilidad de la definición operativa proporcionada de indefensión. El análisis se complementa con la evaluación de las variaciones en el cuadrado de la distancia de Mahalanobis al centroide del grupo no indefenso antes/después del tratamiento farmacológico para tener un índice continuo en lugar de categórico de los efectos del Compuesto A.

Todas las patentes US, publicaciones de solicitudes de patentes US, solicitudes de patentes US, patentes extranjeras, solicitudes de patentes extranjeras y publicaciones que no son de patentes a las que se hace referencia en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Aunque las composiciones, métodos y usos anteriores se han descrito con cierto detalle para facilitar la comprensión, será evidente que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, las modalidades descritas se deben considerar ilustrativas y no restrictivas, y la invención reivindicada no se debe limitar a los detalles proporcionados en el presente documento, sino que se puede modificar dentro del alcance y los equivalentes de las reivindicaciones adjuntas.