



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Estudio farmacológico de la modulación del
receptor 5-HT_{2B} de serotonina por inhibidores
selectivos de la COX-2 (celecoxib y valdecoxib) y
fluoxetina**

Ainhoa Nieto Gutiérrez

2013



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Estudio farmacológico de la modulación del
receptor 5-HT_{2B} de serotonina por inhibidores
selectivos de la COX-2 (celecoxib y valdecoxib) y
fluoxetina**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Ainhoa Nieto Gutiérrez

2013





FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE FARMACOLOGÍA
Edificio CIMUS - Av. De Barcelona s/n. 15706 Santiago de
Compostela

Dña. **María Isabel Loza García**, Doctora en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela, D. **José Manuel Brea Floriani**, Doctor en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela y Dña. **Inés Sánchez-Sellero**, Doctora en Medicina por la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Estudio farmacológico de la modulación del receptor 5-HT_{2B} de serotonina por inhibidores selectivos de la COX-2 (celecoxib y valdecoxib) y fluoxetina”, que para optar al grado de Doctor presenta Dña. **Ainhoa Nieto Gutiérrez**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y cumple los requisitos para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 14 de mayo de 2013.

Fdo.: María Isabel Loza
García

Fdo.: José Manuel Brea
Floriani

Fdo.: Inés Sánchez
Sellero





La curiosidad no mato al gato, le
permitió vivir muchas más vidas...



AGRADECIMIENTOS

En este momento, frente al ordenador escribiendo estas líneas, siento que finaliza una etapa de mi vida... recuerdo todas y cada una de las vivencias, emociones y sentimientos. Esta Tesis Doctoral es el resultado de la ilusión, el esfuerzo, la paciencia y la confianza que han volcado en mí las personas que han estado siempre a mi lado, tanto en el ámbito científico como en el personal. Ahora, al verla finalizada, no puedo evitar sentirme algo rara al ver mi nombre solo en la portada. Sí, es mi trabajo, a él he dedicado muchas horas y dedicación, pero lo que aquí presento no sería posible sin la aportación de mucha gente, probablemente más de la que puedo nombrar en estas páginas. A todas ellas mi más sincero y absoluto agradecimiento.

Gracias a mis directores María Isabel Loza, José Manuel Brea e Inés Sánchez, no sólo por su asesoramiento científico, sino por haber sido compañeros en el camino. Gracias Mabel por abrirme las puertas de tu laboratorio, por tus consejos científicos y personales y por tu apoyo en todo momento, eres una gran mentora. Pepo, maestro y compañero, nunca podre agradecerte todo lo que me has ayudado y enseñado, gracias por tener siempre un momento para escuchar. Gracias Inés, por tu paciencia, por las risas en órgano aislado, por haber sido, sobre todo, una amiga.

Agradecer muy especialmente a Maribel Cadavid, a su lado es imposible no aprender, muchas gracias por enriquecer este trabajo con tus aportaciones y por todos tus buenos consejos.

A todos aquellos que de una forma u otra han aportado su granito de arena: al Dr. Jordi Mestres porque él nos puso sobre la pista del 2B. A la Dra. Rosalía Gallego y su grupo por su inestimable ayuda y colaboración para completar y mejorar este trabajo. Al Dr. Máximo Fraga por su experta opinión y consejos en el mundo de la anatomía patológica. A los Drs. Alejandro Pazos, Julián Dorado y a su grupo por su ayuda desinteresada en el análisis de imágenes.

A María y Antón, por hacer mucho más divertido el trabajo con las ratas, por la compañía, los madrugones y los días larguísimos en órgano aislado.

Este trabajo ha sido financiado por el Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7/2007-2013) en virtud del acuerdo de subvención nº 215.847 - el proyecto de la EU-ADR. Me gustaría agradecer también al coordinador y resto de socios por su apoyo e interesantes discusiones.

A todos y cada uno de mis compis, gente estupenda donde la haya, a los que ya estaban cuando llegué, los que han compartido conmigo mi andadura doctoral y los que han llegado cuando ya me marchaba, a todos gracias por haber compartido conmigo los éxitos y los fracasos, ha sido un auténtico placer haber trabajado con vosotros durante estos años. Especialmente gracias a Ro, por ayudarme a dar los primeros pasos en esto de la farmacología y por estar ahí siempre que la he necesitado, no sólo en lo profesional sino también en lo personal, y a Jose, una persona capaz de ayudarte en todo lo que se te ocurra y que nunca dice no.

Estos años en Santiago he tenido la grandísima suerte de conocer y reconocer a grandes amigos con los que he compartido momentos inolvidables. Pris, no sé qué hubiera sido de mí aquí sin ti, mi familia gallega, gracias por ser quien eres y por dejarme compartir contigo este tiempo que espero que sólo sea el principio. Jose, tus visitas intermitentes siempre son una alegría, hemos pasado por tanto juntos... quién nos lo iba a decir!? Tu sabes lo importante que eres.

Ahora lo más difícil, el agradecimiento a mi familia, los que están siempre, mi apoyo, mi referencia. En primer lugar a mi MADRE, así, con mayúsculas, porque sin ella yo no sería quien soy, porque era una persona increíble, porque el movimiento se demuestra andando..., gracias Ana I, por todo. A mi padre, ese gruñón de gran corazón que sabe que es mi debilidad y a mi hermana, mi autentica VIP, mi enana, sin vosotros nada tiene sentido, sois lo más importante, gracias por estar a mi lado siempre, os quiero más de lo que puedo escribir. Por último a Da, a veces no hay espacio ni palabras suficientes, sin ti esto no habría sido posible, no ha sido fácil pero tú nunca has dudado, mi *yang* particular... nos lleve donde nos lleve la vida si estoy contigo estaré en casa. Te quiero.

Aínoa



A mi madre
A mi familia



ÍNDICE

Justificación y Objetivos	1
I. Justificación	3
II. Hipótesis	6
III. Objetivos	6
Introducción	9
I. Receptores acoplados a proteínas G	11
Activación y vías de señalización	12
Interacción ligando-receptor	15
Modulación alostérica	15
II. Serotonina	18
Serotonina y aparato cardiovascular	21
Receptores 5-HT ₁	21
Receptores 5-HT ₂	22
Receptores 5-HT ₃	23
Receptores 5-HT ₄	23
Receptores 5-HT ₅	23
Receptores 5-HT ₆	24
Receptores 5-HT ₇	24
III. Receptor 5-HT _{2B}	24
Estructura y distribución	24
Señalización	25
Función	26
Agonismo del 5-HT _{2B}	26
Valvulopatías cardíacas	27
Anatomía e histología cardíaca	27
Valvulopatías cardíacas inducidas por fármacos	32
IV. I+D de fármacos	36
Farmacología preclínica de seguridad	37
V. Del ácido acetilsalicílico al celecoxib	39
Coxibs y riesgo cardíaco	42
Evidencias de cardiotoxicidad	42
Bases biológicas de la cardiotoxicidad	43
VI. La pastilla de la felicidad: Fluoxetina	44
Fluoxetina y riesgo cardíaco	46

Material y Métodos	49
I. Animales	51
II. Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	51
Estudios en receptores 5-HT _{2B} en fundus de estómago asilado de rata	52
Preparación del tejido	52
Estudio de la potencia y eficacia	53
Análisis de datos	54
III. Tratamientos farmacológicos	55
Animales	55
Tratamiento 5-HT (7 días)	55
Tratamiento celecoxib (21 días)	56
Tratamiento fluoxetina (21 días)	56
Determinación de los niveles plasmáticos de 5-HT	57
Análisis de datos	58
Estudios de receptores 5-HT _{2B} en fundus de estómago de aislado de rata	58
Análisis histológico de las válvulas cardíacas	58
Técnicas inmunohistoquímicas	61
IV. Cultivo celular	62
Descongelación	62
Cambio de medio	63
Expansión	63
Congelación	64
Siembra	64
Preparación de membranas	64
V. Estudios de unión de radioligandos	65
Ensayos de linealidad de proteína	66
Análisis de datos	67
Ensayos de saturación	67
Análisis de datos	68
Ensayos de competición	68
Ensayos de competición por la unión a receptores 5-HT _{2A}	69
Ensayos de competición por la unión a receptores 5-HT _{2B}	69
Análisis de datos	70
Ensayos cinéticos de unión de radioligandos	71
Cinéticas de disociación	71
Análisis de datos	72
VI. Estudios funcionales <i>in vitro</i>	73

Medida de la formación de inositol fosfatos	73
Análisis de datos	76
Medida de la potencia	76
VII. Análisis estadístico	77
VIII. Reactivos utilizados	77
Reactivos utilizados en la preparación de tampones	77
Reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos	77
Resultados	79
I. Coxibs: celecoxib y valdecoxib	81
Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	81
Celecoxib y valdecoxib no activan por si mismos el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata	81
Celecoxib y valdecoxib modulan el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata	82
Implicación del ácido araquidónico como mediador de la respuesta contráctil de la 5-HT en fundus	84
Evaluación de la posible modulación alostérica del receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata por celecoxib y valdecoxib	86
Tratamiento farmacológico	88
Tratamiento con 5-HT	88
Niveles plasmáticos de 5-HT	88
Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	89
Estudios histológicos	90
Tratamiento con celecoxib	91
Niveles plasmáticos de 5-HT	91
Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	92
Estudios inmunohistoquímicos	92
Estudios histológicos	94
Estudios de unión de radioligandos	95
Validación de membranas CHO-K1 5-HT _{2B}	95
Celecoxib y valdecoxib no tienen afinidad por los receptores 5-HT _{2B} y 5-HT _{2A} humanos	96
Celecoxib y valdecoxib modulan la afinidad de la 5-HT por el receptor 5-HT _{2B} humano	97
Celecoxib y valdecoxib no alteran significativamente la cinética de unión de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano	99
Estudios funcionales celulares	101
Celecoxib y valdecoxib por si mismos no activan el receptor 5-HT _{2B} humano	101

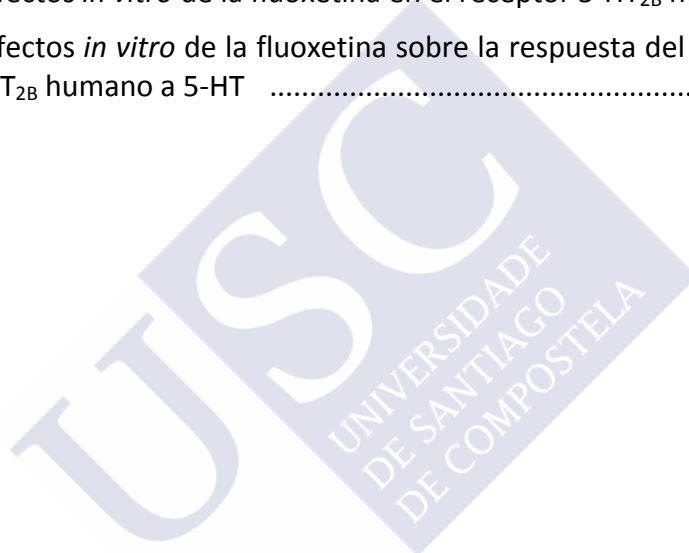
Celecoxib y valdecoxib modulan el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano	102
II. Fluoxetina	103
Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	103
La fluoxetina se comportó como un agonista parcial de los receptores 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata	103
Tratamiento farmacológico	104
Tratamiento con fluoxetina	104
Niveles plasmáticos de 5-HT	104
Estudios funcionales <i>ex vivo</i>	105
Estudios inmunohistoquímicos	106
Estudios histológicos	108
Estudios de unión de radioligandos	108
La fluoxetina se une al receptor 5-HT _{2B} humano con baja afinidad	108
La fluoxetina no afecta a la afinidad de la 5-HT por el receptor 5-HT _{2B} humano	109
Estudios funcionales celulares	110
La fluoxetina no activa los receptores 5-HT _{2B} humanos	110
La fluoxetina a altas concentraciones potencia el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano	111
Discusión	113
I. Inhibidores selectivos de la COX-2	116
II. Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT	125
Conclusiones	131
Bibliografía	135

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Representación esquemática de la estructura general de un GPCR	12
Figura 2:	Representación esquemática de la diversidad de vías de activación y señalización de los GPCRs	13
Figura 3:	Espectro de comportamientos que un ligando puede presentar en un determinado receptor	16
Figura 4:	Estructura química de la serotonina (5-hidroxitriptamina ó 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol)	18
Figura 5:	Efectos de la serotonina en el SNC y la periferia	20
Figura 6:	Representación esquemática de la anatomía básica del corazón en sección	28
Figura 7:	Representación esquemática de las válvulas aórtica y mitral	29
Figura 8:	Válvula aórtica de una rata Sprague-Dawley con crecimiento mixomatoso en una de las valvas	32
Figura 9:	Vías de señalización del receptor 5-HT _{2B}	35
Figura 10:	Representación esquemática de la cascada del ácido araquidónico. Implicaciones de la inhibición selectiva de la COX-2	40
Figura 11:	Estructura química de los coxibs	41
Figura 12:	Estructura química de la fluoxetina (N-metil-3-(<i>p</i> -trifluorometilfenoxi)-3-fenilpropilamina)	45
Figura 13:	Diagrama que muestra el método de corte de la tira fúndica	53
Figura 14:	Registro representativo resultante de la adición acumulativa de concentraciones crecientes de 5-HT en fundus de estómago de rata	54
Figura 15:	Preparación del corazón para su fijación en formalina	59
Figura 16:	Válvula mitral de rata teñida utilizando distintas tinciones	60
Figura 17:	Representación esquemática del método de polímeros de dextrano (EnVision®)	62
Figura 18:	Representación esquemática del ensayo de medida de IP ₁	75
Figura 19:	Efectos <i>in vitro</i> de celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata	82
Figura 20:	Efectos <i>in vitro</i> de celecoxib y valdecoxib sobre la respuesta del receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata inducida por 5-HT	83

Figura 21:	Efectos <i>in vitro</i> de la inhibición de la PLA ₂ sobre la respuesta del receptor 5-HT _{2B} a 5-HT en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib	85
Figura 22:	Efectos <i>in vitro</i> de la rauwolscina sobre la respuesta del receptor 5-HT _{2B} a 5-HT en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib ..	87
Figura 23:	Niveles plasmáticos de 5-HT tras 7 días de tratamiento con 5-HT, 75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces	89
Figura 24:	Efecto del tratamiento con 5-HT sobre la activación del receptor 5-HT _{2B} promovida por 5-HT	89
Figura 25:	Efecto del tratamiento con 5-HT durante 7 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas	90
Figura 26:	Niveles plasmáticos de 5-HT tras 21 días de tratamiento con celecoxib 30 mg/kg/día	91
Figura 27:	Efecto del tratamiento con celecoxib en la activación del receptor 5-HT _{2B} promovida por 5-HT	92
Figura 28:	Inmunorreactividad de receptores 5-HT _{2B} de rata después de 21 días de tratamiento ip con celecoxib 30 mg/kg/día	93
Figura 29:	Efecto del tratamiento i.p. con celecoxib 30 mg/kg/día durante 21 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas	94
Figura 30:	Validación de membranas CHO-K1 5-HT _{2B} con [³ H]-LSD y [³ H]-5-HT	95
Figura 31:	Efectos <i>in vitro</i> de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de celecoxib y valdecoxib sobre la afinidad de 5-HT por el receptor 5-HT _{2B} humano	98
Figura 32:	Efectos <i>in vitro</i> de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de celecoxib y valdecoxib sobre el % de unión específica de 5-HT 1 nM al receptor 5-HT _{2B} humano	99
Figura 33:	Cinéticas de disociación de 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de celecoxib y valdecoxib	100
Figura 34:	Efectos <i>in vitro</i> de celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT _{2B} humano	101
Figura 35:	Efectos <i>in vitro</i> de celecoxib y valdecoxib sobre la respuesta del receptor 5-HT _{2B} humano a 5-HT	103
Figura 36:	Efectos <i>in vitro</i> de la fluoxetina en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata directos y sobre la respuesta a 5-HT	104
Figura 37:	Niveles plasmáticos de 5-HT tras 21 días de tratamiento con fluoxetina 10 mg/kg/día	105

Figura 38:	Efecto del tratamiento con fluoxetina en la activación del receptor 5-HT _{2B} promovida por 5-HT	105
Figura 39:	Inmunorreactividad de receptores 5-HT _{2B} de rata después de 21 días de tratamiento ip con fluoxetina 10 mg/kg/día	107
Figura 40:	Efecto del tratamiento i.p. con fluoxetina 10 mg/kg/día durante 21 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas	108
Figura 41:	Afinidad de la 5-HT y la fluoxetina por el receptor 5-HT _{2B} humano .	109
Figura 42:	Efectos <i>in vitro</i> de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de fluoxetina sobre la afinidad de 5-HT por el receptor 5-HT _{2B} humano	112
Figura 43:	Efectos <i>in vitro</i> de la fluoxetina en el receptor 5-HT _{2B} humano	111
Figura 44:	Efectos <i>in vitro</i> de la fluoxetina sobre la respuesta del receptor 5-HT _{2B} humano a 5-HT	111



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de 5-HT, celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata	82
Tabla 2:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib	84
Tabla 3:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata en presencia de un inhibidor de la PLA ₂ , ác. aristolóquico, en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib	86
Tabla 4:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} de fundus de estómago de rata en presencia de rauwolscina, en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib	88
Tabla 5:	Afinidad de celecoxib y valdecoxib por los receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2B} humanos	97
Tabla 6:	Concentración plasmática fisiológica de 5-HT y concentraciones plasmáticas descritas para las dosis terapéuticas usuales de celecoxib y valdecoxib	97
Tabla 7:	Constante de disociación de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de celecoxib y valdecoxib	100
Tabla 8:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT, el celecoxib y el valdecoxib en el receptor 5-HT _{2B} humano	102
Tabla 9:	Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT _{2B} humano en ausencia y presencia de distintas concentraciones de fluoxetina	112
Tabla 10:	Concentración plasmática fisiológica de 5-HT y concentraciones plasmáticas descritas para las dosis terapéuticas usuales de fluoxetina	112

ABREVIATURAS

°	Grado alcohólico, porcentaje de alcohol en volumen
ε	Eficacia intrínseca
°C	Grado centígrado
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro o micra
^3H	Tritio
5-CT	5-carboxamidotriptamina
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HT _{1(A,B,D,E,F)}	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₁ , formada por los subtipos 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F
5-HT _{2(A,B,C)}	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₂ , formada por los subtipos 2A, 2B y 2C
5-HT ₃	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₃
5-HT ₄	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₄
5-HT _{5(A,B)}	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₅ , formada por los subtipos 5A y 5B
5-HT ₆	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₆
5-HT ₇	Familia de receptores de serotonina 5-HT ₇
5-HTT	Transportador de serotonina
7TM	Receptores 7 Transmembrana
α _{1A}	Receptor adrenérgico alfa1A
AA	Ácido araquidónico
AAr	Ácido aristolóquico
AC	Adenilato ciclasa
Ác.	Ácido
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADR	<i>Adverse Drug Reaction</i> (Reacción adversa medicamentosa)

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMP_c	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BE	<i>Binding</i> específico (unión específica)
B_{max}	Número o densidad máxima de sitios de unión
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albúmina de suero bovino)
BT	<i>Binding</i> total (unión total)
CCR	Curva concentración-respuesta
CCRA	Curva concentración-respuesta acumulativa
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (células de ovario de hámster chino)
Ci	Curio
CIMA	Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS
CLASS	<i>Celecoxib Long-term Arthritis Study</i>
cm	Centímetro
cols	Colaboradores
COX-1/2	Ciclooxigenasa-1/2
COXIBS	Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2
DAB	Diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
e1, e2, e3	Lazos extracelulares 1, 2 y 3
EC₅₀	<i>Effective Concentration 50</i> (Concentración efectiva 50)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetraacético)
eem	Error estándar de la media
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> (ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil éter)- N, N, N', N' - tetraacético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia europea de medicamentos)
E_{max}	Eficacia máxima

ERK_{1/2}	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i> (Cinasas reguladas por señales extracelulares 1/2)
EU-ADR	<i>Exploring and Understanding Adverse Drug Reactions</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (suero fetal bovino)
FD	Factor de dilución
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agencia de alimentos y medicamentos estadounidense)
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia)
g	Gramo
g	Unidad relativa de medida de aceleración
GAG	Glicosaminoglicano
GDP	Guanosín difosfato
GI	Gastrointestinal
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i> (Receptor acoplado a proteína G)
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
h	Hora
hERG	<i>human Ether-à-go-go-Related Gene</i> (Canal de potasio dependiente de voltaje)
HTRF	<i>Homogeneous Time-Resolved Fluorescence</i> (Fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo)
i.p.	Intraperitoneal
i1, i2, i3	Lazos intracelulares 1, 2 y 3
IC₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (Concentración inhibitoria 50)
Ig	Inmunoglobulina
IP₁	Monofosfato de inositol
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISRS	Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina
IUPHAR	<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i> (Asociación internacional de farmacología básica y clínica)
K_B	Constante de disociación de un antagonista
K_D	Constante de disociación
kg	Kilogramo

K_i	Constante de inhibición
K_{off}	Constante cinética de disociación
K_{on}	Constante cinética de asociación
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico
M	Molar
M₁	Receptor muscarínico 1
M₂	Receptor muscarínico 2
mACH	Receptores muscarínicos de acetilcolina
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
mmol	Minimol
n	Tamaño de la muestra
NAM	<i>Negative Allosteric Modulator</i> (Modulador alostérico negativo)
nM	Nanomolar
NSB	<i>Non Specific Binding</i> (Unión inespecífica)
P	Probabilidad
pA₂	Logaritmo del inverso de la concentración molar de antagonista que hace necesario duplicar la concentración de agonista para obtener el mismo efecto que cuando el antagonista no está presente
PAM	<i>Positive Allosteric Modulator</i> (Modulador alostérico positivo)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato)
PEI	<i>Poly(ethyleneimine)</i> (Polietilenimina)
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaciclina
TxA₂	Tromboxano A ₂
pH	Potencial de hidrógeno
PK	Farmacocinética
pK_B	Logaritmo del inverso de la constante de disociación de un

	antagonista
PKC	Proteína cinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PLCβ	Fosfolipasa C-β
PLP	Plasma libre de plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
PSP	<i>Preclinical Safety Pharmacology</i> – Farmacología preclínica de seguridad
R / R*	Estado inactivo/activo de un receptor
rpm	Revoluciones por minute
RSK2	<i>Ribosomal protein S6 Kinase alpha-3</i> (Proteína ribosomal S6 cinasa alfa3)
SAM	Silent Allosteric Modulator (Modulador alostérico silente o neutral)
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i> (Relación estructura actividad)
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
TFG-β	Transforming Growth Factor beta (factor de crecimiento transformante beta)
TMI-VII	Dominio transmembrana I-VII
Tris, Trizma	2-amino-2-(hidroximetil) -1,3-propanodiol
T_x	Tromboxano
VIGOR	<i>Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research</i>
vs	Versus (Frente a, contra)





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



I. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de un nuevo medicamento es un proceso largo y complejo durante el cual deberá demostrarse que la modulación de la diana seleccionada, además de producir el efecto terapéutico deseado, va a ser segura.

Las agencias reguladoras exigen amplios estudios *in vivo* (Snodin 2002), relacionados con la seguridad/evaluación de riesgos de los nuevos medicamentos (Bass y cols. 2004). Estos estudios son costosos, exigen tiempo y, lo que es más importante, entran en el proceso de desarrollo en etapas tardías y con baja capacidad de introducción de cambios. Actualmente, la farmacología preclínica de seguridad (*Preclinical Safety Pharmacology* - PSP) intenta anticipar o prever reacciones adversas a medicamentos (*Adverse Drug Reactions* - ADRs) a partir de ensayos *in vitro* simples durante las fases tempranas del descubrimiento de fármacos.

Esta caracterización predictiva *in vitro* de la seguridad se llevaría a cabo en las etapas más tempranas del descubrimiento de fármacos, en las que se realizarían campañas de *screening* para detectar las interacciones de las moléculas con las antidiarias responsables de sus reacciones adversas y/o toxicidad. En los últimos años el panel mínimo de antidiarias a ensayar se ha visto reducido como resultado de un mejor conocimiento de la significación farmacológica de cada diana y de las limitaciones presupuestarias, sin embargo, se incluyen rutinariamente antidiarias con un alto valor predictivo de toxicidad, entre las que destacan el receptor de serotonina (5-HT) 5-HT_{2B}, asociado a valvulopatía cardíaca, y el hERG, asociado con arritmias cardíacas graves (Bowes y cols. 2012; Cadavid 2013).

El receptor 5-HT_{2B} participa en el desarrollo del sistema cardiovascular y regula el desarrollo y crecimiento de los cardiomiocitos. La activación de estos receptores se ha asociado con hipertrofia cardíaca y con hipertensión pulmonar (Elangbam 2010; Roth 2007; Setola y Roth 2005). En la última década se han encontrado evidencias de que la activación de receptores 5-HT_{2B} de serotonina (5-

HT), junto con la inhibición del transportador de 5-HT (SERT o 5-HTT), juega un papel importante en la patogénesis de la valvulopatía inducida por 5-HT (Elangbam y cols. 2008; Roth 2007). Se ha comprobado que distintos fármacos relacionados con fenómenos de cardiotoxicidad (fenfluramina, pergolida, ergotamina, etc.) activan el receptor 5-HT_{2B} y/o aumentan los niveles de 5-HT en sangre (Fitzgerald y cols. 2000; Pritchett y cols. 2002).

En base a todo lo expuesto, hoy en día la importancia de testar los candidatos a fármaco y sus principales metabolitos como agonistas en el receptor 5-HT_{2B} (antidiana) queda fuera de toda duda (Huang y cols. 2009; Roth 2007; Setola y Roth 2005). Asimismo, compuestos que puedan aumentar la concentración de 5-HT plasmática hasta niveles capaces de activar el receptor o compuestos que puedan potenciar el efecto de ésta en dicho receptor (moduladores alostéricos) serían susceptibles de provocar los efectos adversos descritos.

Por otra parte, los coxibs, inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), surgieron con el fin de evitar los efectos adversos gastrointestinales asociados a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) clásicos, que inhibían tanto la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como la COX-2. En 1999, G.D. Searle y Pfizer (ahora Pfizer Inc) lanzaron el primer inhibidor selectivo de la COX-2: celecoxib (Celebrex®). Desde entonces han salido al mercado diferentes coxibs, siempre intentando aumentar la selectividad COX-2/COX-1. La demostración de esta supuesta ventaja se basó en dos grandes estudios clínicos, el CLASS, *Celecoxib Long-term Arthritis Study* (Silverstein y cols. 2000), y el VIGOR, *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (Bombardier y cols. 2000). Sin embargo, posteriormente se demostró que no sólo no se reducía el riesgo gastrointestinal sino que podían surgir reacciones adversas cardiovasculares (Fundació Institut Català de Farmacologia 2002).

Los primeros signos de preocupación en cuanto a la seguridad cardiovascular de los coxibs surgieron debido a la imprevista, pero significativamente mayor, incidencia de eventos trombóticos cardiovasculares con rofecoxib frente a naproxeno en el estudio VIGOR (Bombardier y cols. 2000). Actualmente, en base a

distintos experimentos y ensayos clínicos, se propone que el mecanismo por el que la inhibición de la COX-2 aumenta el riesgo cardiovascular, consistiría en una disminución de la producción vascular de prostaciclina, PGI₂, (vasodilatadoras y antiagregantes) sin un cambio en los niveles de tromboxano A₂, TxA₂, (vasoconstrictor y proagregante). Esta descompensación en el equilibrio hemostático conduciría a un estado que predispone a trombosis, hipertensión y aterosclerosis (FitzGerald y Patrono 2001).

Con el fin de identificar antidiagnos adicionales implicadas en los efectos adversos asociados con los coxibs, se llevó a cabo un estudio quimiogenómico dentro del proyecto europeo EU-ADR (*Exploring and Understanding Adverse Drug Reactions*) (EU-ADR Project website), que reveló una posible interacción entre los coxibs y el receptor 5-HT_{2B}.

Asimismo, la fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS), provoca, mediante el bloqueo del transportador de 5-HT, una potente desinhibición inicial de la neurotransmisión serotoninérgica que, tras la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} debido al aumento de 5-HT en la hendidura sináptica, produce un aumento en la liberación de 5-HT en las terminales axónicas, mecanismo que explicaría sus efectos antidepresivos (Sghendo y Mifsud 2012). De todas formas, existen diversos estudios que han mostrado que el bloqueo del SERT no aumenta la concentración de 5-HT plasmática, e incluso podría llegar a disminuirla (Alvarez y cols. 1999; Wong y cols. 1995).

Adicionalmente, algunos estudios han encontrado que la fluoxetina es capaz de activar el receptor 5-HT_{2B} en una población de astrocitos que no expresan SERT (Li y cols. 2008; Zhang y cols. 2010) con una afinidad que podría ser compatible con la alcanzada en un tratamiento crónico (Li y cols. 2009; Li y cols. 2008). Además, existen varios informes de casos de diferentes reacciones adversas cardiovasculares asociadas con el tratamiento con fluoxetina y con la sobredosis (Friedman 1991; Gardner y cols. 1991; Graudins y cols. 1997).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral hemos considerado de interés evaluar la posible interacción de dos inhibidores selectivos de la COX-2, celecoxib y valdecoxib, y un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT, fluoxetina, con el receptor 5-HT_{2B}, así como las posibles consecuencias de esta interacción.

II. HIPÓTESIS

La modulación de los receptores 5-HT_{2B} de serotonina podría mediar efectos cardiovasculares adversos en el tratamiento con coxibs (celecoxib y valdecoxib) y fluoxetina.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar farmacológicamente la interacción de celecoxib, valdecoxib y fluoxetina con el receptor 5-HT_{2B} humano y de rata.

Objetivos específicos

1. Evaluar la modulación de la actividad del receptor 5-HT_{2B} de rata y humano ejercida por celecoxib y valdecoxib.
2. Evaluar la expresión y respuesta del receptor 5-HT_{2B} tras un tratamiento con celecoxib en animales de experimentación.
3. Evaluar en un estudio anatomopatológico los efectos estructurales sobre las válvulas cardíacas (mitral y aórtica) de un tratamiento con celecoxib en animales de experimentación.
4. Evaluar la modulación de la actividad del receptor 5-HT_{2B} de rata y humano ejercida por fluoxetina.

5. Evaluar la expresión y respuesta del receptor 5-HT_{2B} tras un tratamiento con fluoxetina en animales de experimentación.
6. Evaluar en un estudio anatomopatológico los efectos estructurales sobre las válvulas cardíacas (mitral y aórtica) de un tratamiento con fluoxetina en animales de experimentación.







INTRODUCCIÓN



I. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Desde que en 1994 Alfred G. Gilman y Martin Rodbell fueran galardonados con el premio Nobel por su descubrimiento del papel de las proteínas G en la transducción de señales, se han producido grandes avances en el campo de la biología de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), incluyendo la clonación de los primeros genes de GPCRs y la secuenciación del genoma humano, que reveló el tamaño de la familia de los GPCR y el número de GPCRs huérfanos.

Los GPCRs constituyen la mayor familia de proteínas de membrana, con en torno a 1000 genes de GPCRs diferentes, representan aproximadamente el 1 % del genoma humano (Takeda y cols. 2002). Actualmente existe una creciente apreciación de que la regulación y señalización de los GPCRs es mucho más compleja de lo originalmente previsto, e incluye señalización a través de vías independientes de la proteína G (Ji y cols. 1998; Lefkowitz y Shenoy 2005). En consecuencia, se ha propuesto que el término GPCR sea abandonado en favor de receptores 7 transmembrana o 7TM.

Los GPCRs comparten una estructura común consistente en una cadena polipeptídica plegada en siete segmentos hidrofóbicos transmembrana (TMI - VII), unidos por tres lazos extracelulares (e1, e2 y e3) y tres lazos intracelulares (i1, i2 e i3), con un extremo amino-terminal extracelular y un extremo carboxi-terminal intracelular (Figura 1). Los dominios transmembrana presentan un amplio grado de conservación de la secuencia. Las regiones más variables se encuentran en el extremo carboxi-terminal, el bucle intracelular que une los segmentos TM5 y TM6 (i3), y el extremo amino-terminal, observándose la mayor diversidad en el extremo amino-terminal (Ji y cols. 1998). Los siete dominios transmembrana y el extremo carboxi-terminal extracelular están implicados en la unión del ligando, mientras que los dominios intracelulares son importantes para la transducción de la señal y la modulación de la función del receptor (Kobilka 2007; Luttrell 2008).

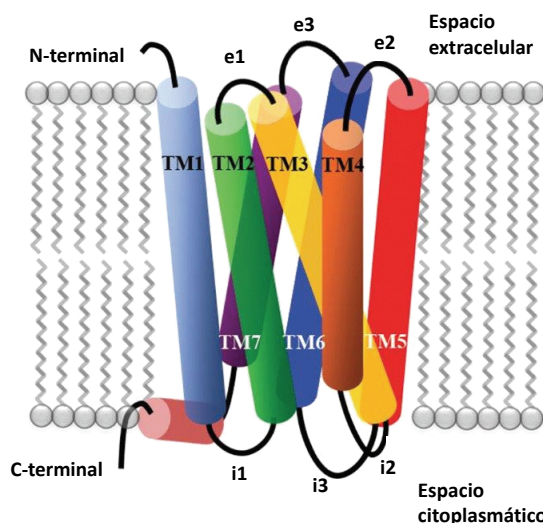


Figura 1: Representación esquemática de la estructura general de un GPCR. (Modificado de Mobarec, 2008).

La distribución ubicua en la membrana celular así como su implicación en multitud de procesos fisiológicos y patológicos han hecho de esta familia de receptores de membrana la fuente más rica de dianas para la industria farmacéutica, con cerca del 50 % de los fármacos del mercado actuando sobre ellos (Heitzler y cols. 2009; Overington y cols. 2006).

Activación y vías de señalización

Clásicamente, tras la unión del ligando, los GPCR sufren un cambio conformacional que conduce al acoplamiento y activación de la proteína G heterotrimérica, promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. El GTP origina un cambio conformacional en $G\alpha$ que provoca la disociación de esta subunidad del complejo $\beta\gamma$. Tanto la subunidad $G\alpha$ como el complejo $\beta\gamma$ pueden interactuar con distintos sistemas efectores modulando múltiples vías de señalización (Figura 2).

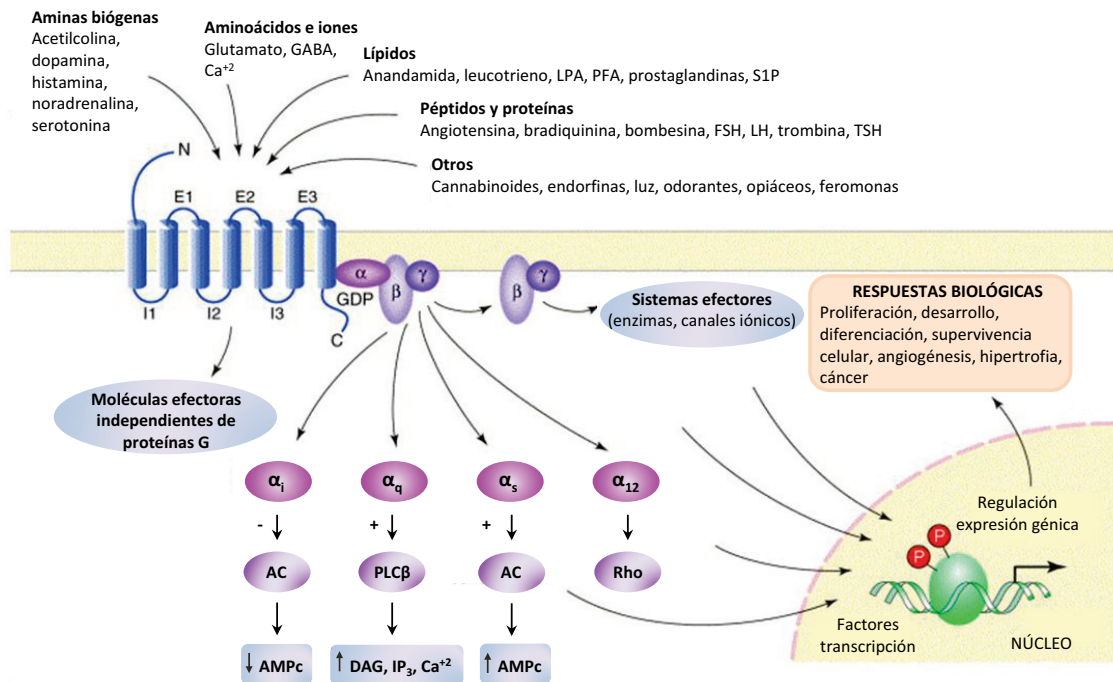


Figura 2: Representación esquemática de la diversidad de vías de activación y señalización de los GPCRs. Una amplia variedad de ligandos utilizan GPCRs para estimular dianas citoplasmáticas y nucleares a través de proteínas G y vías independientes. Estas vías de señalización claves regulan funciones biológicas tales como la proliferación celular, la supervivencia celular y la angiogénesis. (Modificado de Marinissen y Gutkind, 2001).

Las vías de señalización activadas por un determinado ligando dependen, en parte, del tipo de proteína G que se acople al receptor activado. Las proteínas G se dividen en cuatro clases principales en base a la similitud de la secuencia primaria de la subunidad $G\alpha$: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ (Oldham y Hamm 2006). Así, las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ se caracterizan por actuar sobre la adenilato ciclasa (AC), positiva o negativamente, con la consiguiente movilización de AMPc. Las $G\alpha_q$ se asocian con una activación de la fosfolipasa C- β (PLC β) y el consiguiente aumento de diacilglicerol (DAG), de inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y de Ca $^{+2}$. Las proteínas $G\alpha_{12}$, por su parte, están implicadas en la regulación de las proteínas Rho, GTPasas pertenecientes a la superfamilia de las proteínas Ras.

Los GPCRs tienen la capacidad de acoplarse a una o varias de estas proteínas G, permitiendo la modulación selectiva de las vías de señalización.

Alternativamente, los GPCRs pueden activar sistemas efectores independientes de proteínas G a través de la interacción con otras proteínas entre las que se incluyen β -arrestinas, tirosincinasas y proteínas con dominio PDZ (Heitzler y cols. 2009; Sun y cols. 2007).

Por otra parte, existen diversos estudios que muestran que ciertos ligandos favorecen una de las posibles vías de activación de un determinado GPCR en detrimento de las demás (Cussac y cols. 2008). Este fenómeno, conocido como selectividad funcional, debe considerarse como una oportunidad de ganar especificidad terapéutica mediante el diseño de herramientas farmacológicas que puedan seleccionar una determinada vía de señalización del receptor (Berg y Clarke 2006).

Adicionalmente, los receptores pueden poseer actividad constitutiva, consistente en una isomerización a la conformación activa en ausencia de ligando (Seifert y Wenzel-Seifert 2002). Como consecuencia se promueve un aumento de la actividad basal de dicho receptor (Costa y Herz 1989).

Asimismo, tras la activación de los receptores se produce una rápida atenuación de la respuesta, proceso conocido como desensibilización (Golan y cols. 2009). Este fenómeno puede producirse a través de distintos mecanismos tales como:

- El desacoplamiento del receptor de su proteína G como consecuencia de la fosforilación del mismo (Ferguson 2001; Golan y cols. 2009).
- La internalización de los receptores de la superficie celular a compartimentos intracelulares (Ferguson 2001; Trejo y cols. 1998).
- La disminución del número de receptores (down-regulation) debido a la disminución del ARN mensajero y de la síntesis proteica y a la degradación de los receptores preexistentes (Jockers y cols. 1999; Pak y cols. 1999).

Interacción ligando-receptor

Los recientes avances en el campo de los GPCRs han cuestionado definiciones tradicionales como agonismo, antagonismo, afinidad y eficacia. La mejor comprensión de la biología de GPCRs ha llevado al reconocimiento de nuevas "clases" de ligandos tales como agonistas y antagonistas parciales, antagonistas neutros, agonistas inversos y ligandos protean (Brink y cols. 2004; May y cols. 2007). Todo esto junto con el descubrimiento de la selectividad funcional y el alosterismo, ha supuesto un nuevo enfoque para el diseño y el descubrimiento de nuevos fármacos.

- **Modulación alostérica**

Además de los sitios de unión ortostéricos, sitios de unión naturales de los ligandos endógenos del receptor, se ha comprobado que muchos GPCRs poseen sitios de unión alostéricos, espacialmente y a menudo funcionalmente distintos de los primeros (Christopoulos y Kenakin 2002; May y cols. 2007). La presencia de sitios alostéricos permite numerosas interacciones adicionales ligando-receptor. Agonistas, antagonistas y agonistas inversos alostéricos de un determinado GPCR se unirán al sitio de unión alostérico e inducirán un efecto similar a los correspondientes ligandos ortostéricos (Bridges y Lindsley 2008).

Independientemente de su mecanismo (ortostérico o alostérico), todos los ligandos muestran eficacia, definida por la relación de afinidades por un estado activo (R^*) y el estado inactivo (R) de un receptor. La detección del "comportamiento" agonista depende del ligando y la sensibilidad del ensayo utilizado; clasificar "comportamientos" en lugar de "propiedades" da lugar a los tipos de ligandos descritos en la Figura 3. Nótese que, para un solo receptor, es posible tener múltiples estados activos, para cada uno de los cuales un ligando puede tener una afinidad diferente y por lo tanto eficacia diferente (Langmead 2012).

Más allá de estos tipos de ligandos, los moduladores alostéricos se unen al sitio alostérico y estabilizan una determinada conformación del receptor, aumentando o disminuyendo la afinidad y/o eficacia de un agonista ortostérico en el receptor, pero sin activarlo o inhibirlo por si mismos (Christopoulos y Kenakin 2002; May y cols. 2007). Un mayor grado de complejidad surge en el caso de compuestos que presentan un comportamiento como modulador alostérico pero, además, en ausencia de ligando ortostérico, muestran un comportamiento agonista, antagonista o agonista parcial del receptor (Figura 3).

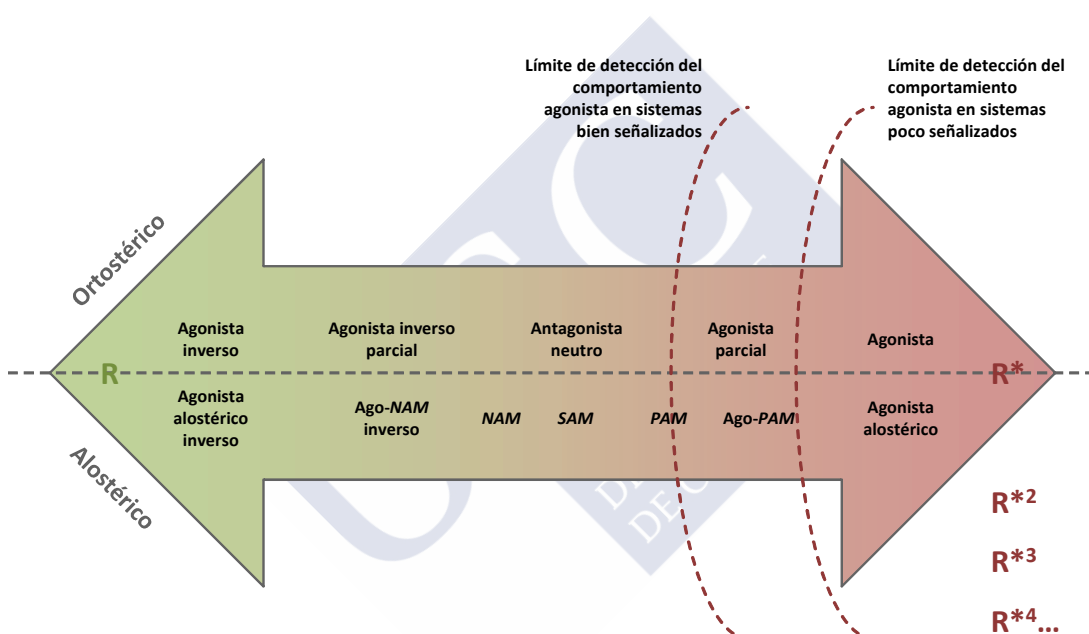


Figura 3: Espectro de comportamientos que un ligando puede presentar en un determinado receptor. (Modificado de Langmead, 2012).

Donde R = receptor en estado inactivo, R* = receptor en estado activo, PAM = *Positive Allosteric Modulator*, SAM = *Silent Allosteric Modulator* y NAM = *Negative Allosteric Modulator* (Keov y cols. 2011).

El alosterismo en GPCRs se caracteriza por una serie de propiedades que reflejan la naturaleza recíproca del efecto de la interacción entre dos ligandos distintos que interactúan a través de sitios topográficamente diferentes en un receptor (Keov y cols. 2011). Estas propiedades fundamentales son:

- Saturabilidad de efecto: Un mecanismo alostérico presenta un límite en el efecto farmacológico que provoca, regido por la cooperatividad entre los ligandos ortostérico y alostérico. Las interacciones alostéricas se caracterizan por tener limitado el grado de cooperatividad, positiva o negativa, lo que provoca que los ligandos alostéricos puedan “reajustar” la señalización fisiológica de ligandos ortostéricos endógenos. Una ventaja adicional de este mecanismo es la minimización del riesgo asociado con la sobredosis, por lo menos a nivel de la diana, puesto que no se observará ningún efecto farmacológico adicional por encima del definido por la cooperatividad e independientemente de la concentración del modulador (Keov y cols. 2011).
- Dependencia de la sonda (*Probe dependence*): Llamada así para poner de relieve el hecho de que el grado y la dirección de una interacción alostérica puede variar con la naturaleza del ligando ortostérico utilizado como “sonda” de la función del receptor (Kenakin 2005). Idealmente, la elección de la sonda ortostérica vendrá definida por el agonista endógeno para un determinado receptor.
- Efectos diferenciales sobre la afinidad vs eficacia del ligando ortostérico: La capacidad de un ligando alostérico de modular la afinidad de un ligando ortostérico no va acompañada necesariamente de un efecto igual en su eficacia y viceversa. En la actualidad hay numerosos ejemplos de ligandos que afectan únicamente una de estas propiedades, que afectan las dos en diferentes medidas o que incluso ejercen efectos opuestos en la unión del ligando y su función (May y cols. 2007).
- Selectividad funcional: Los receptores que pueden unirse a más de una proteína G tienen la capacidad de señalar de forma diferente para las distintas vías, así, los GPCRs pueden adoptar diferentes estados conformacionales, de forma que una de las cascadas de señalización mediadas por el receptor se señalice preferentemente. Este fenómeno, comentado anteriormente, se conoce como *agonist-trafficking*, agonismo

preferente, eficacia colateral o selectividad funcional (Kenakin 2007; Kenakin 1995; Urban y cols. 2007). Los moduladores alostéricos pueden provocar en un ligando normalmente no selectivo (por ejemplo, un agonista endógeno natural), la modulación selectiva de una vía de señalización, ya sea en un sentido positivo o negativo, a expensas de los demás (Kenakin 2007).

De particular importancia para el proceso de descubrimiento de fármacos es el hecho de que todos estos comportamientos son sumamente dependientes de la naturaleza química de los ligandos que interaccionan. Así, un modulador alostérico podría inhibir la unión de un ligando ortostérico, mejorar la de un segundo y no tener ningún efecto sobre un tercero, todos actuando en el mismo GPCR y en el mismo sistema (Leach y cols. 2007).

II. SEROTONINA

La serotonina fue inicialmente denominada enteramina por Erspamer y Vialli en 1937 porque se aisló a partir de las células enterocromafines de la mucosa digestiva. En la misma época Rapport y cols., aislaron una sustancia vasoconstrictora del suero a la que denominaron serotonina (Rapport y cols. 1948b; Rapport y cols. 1948a). Finalmente, se comprobó que ambas sustancias eran 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Erspamer y Asero 1952; Rapport 1949).

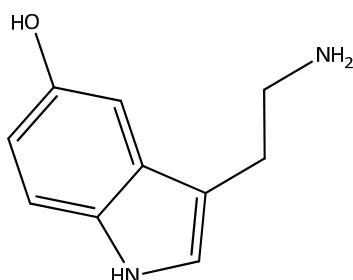


Figura 4: Estructura química de la serotonina (5-hidroxitriptamina ó 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol).

La presencia de esta sustancia en extractos de cerebro fue propuesta inicialmente por Page y cols. (Twarog y Page 1953), pero no fue hasta 1964 cuando Dahlstrom y Fuxe identificaron neuronas del cerebro que contenían serotonina, donde funcionaba como un neurotransmisor (Dahlström y Fuxe 1964a; Dahlström y Fuxe 1964b).

En la actualidad la 5-HT es considerada una amina biógena cuyo principal papel es la neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC). En el SNC la 5-HT se produce casi exclusivamente en las neuronas procedentes de los núcleos del rafe situado en la línea media del tronco cerebral, estas neuronas forman el sistema eferente más grande y complejo del cerebro humano. El rafe más caudal inerva la médula espinal, mientras que los núcleos dorsal y medial del rafe inervan la mayor parte del SNC mediante proyecciones difusas (Figura 5). En el SNC la 5-HT está involucrada en el humor, cognición, sueño, dolor, función motora y secreción endocrina (Millan y cols. 2008), aunque también juega un papel importante como neuromodulador (Daubert y Condron 2010).

A nivel periférico la 5-HT procedente del tracto gastrointestinal (células enterocromafines) se almacena en las plaquetas sanguíneas y participa en la motilidad del intestino, la secreción de fluidos, la coagulación y la homeostasis de la presión arterial (Kema y cols. 2000) (Figura 5).

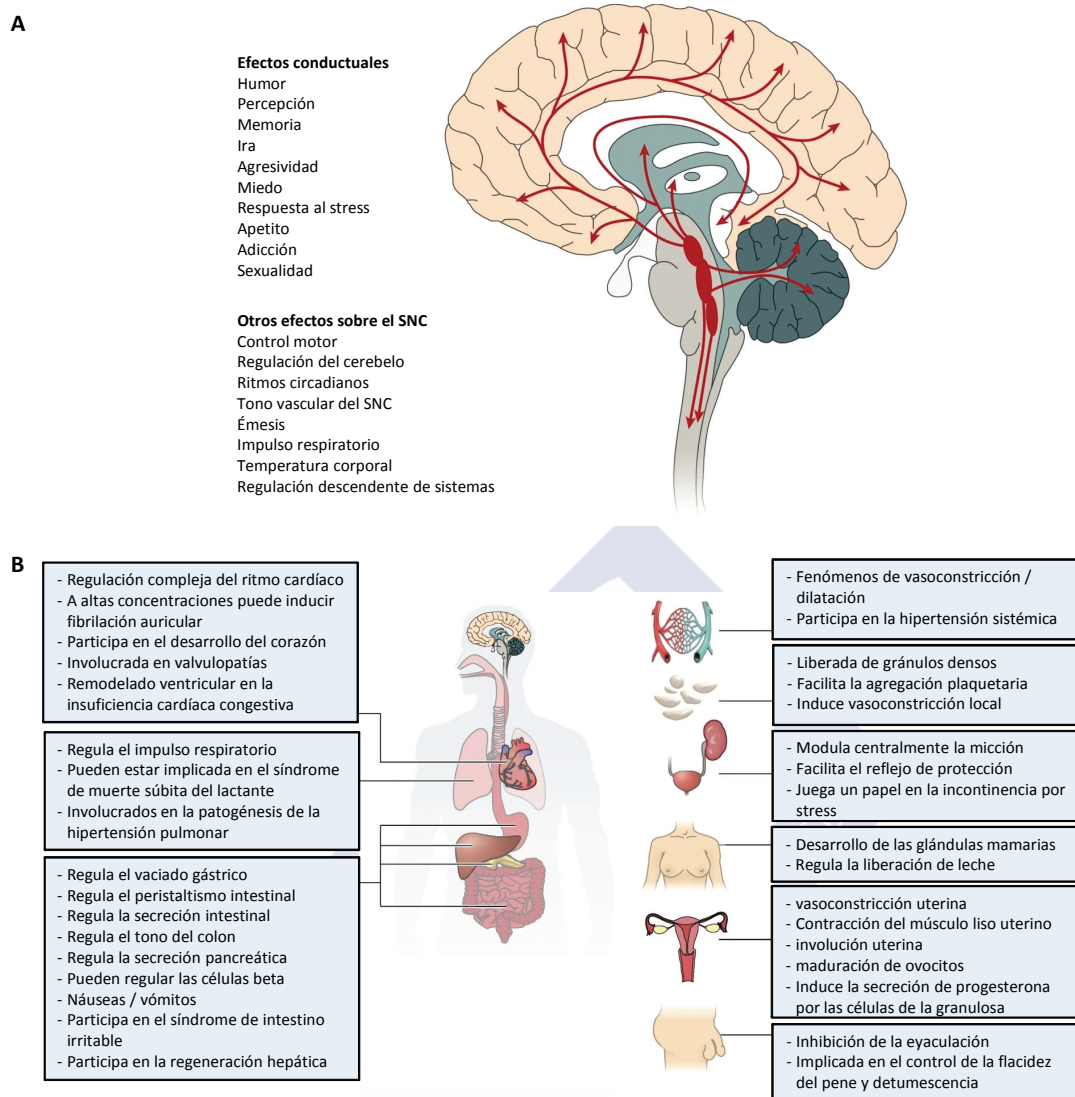


Figura 5: Efectos de la serotonina en el SNC y la periferia. (A) Vías serotoninérgicas centrales y sus efectos. (B) Efectos de la serotonina fuera del SNC.

La acción biológica de la 5-HT está mediada por un sistema de receptores de membrana plasmática, formado por al menos 14 receptores conocidos, divididos en siete familias agrupables en dos grandes grupos: receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), donde se incluyen los receptores 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}), 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}), 5-HT₆ y 5-HT₇; y receptores asociados a canales iónicos, donde se incluyen los receptores 5-HT₃ (Nichols y Nichols 2008). El SERT facilita la recaptación de 5-HT después de la interacción con el receptor (Mercado y Kilic 2010).

Serotonina y aparato cardiovascular

La complejidad de las respuestas cardiovasculares producidas por la 5-HT incluyen taquicardia o bradicardia, hipotensión o hipertensión, y vasodilatación o vasoconstricción. A pesar de que la concentración fisiológica de 5-HT plasmática es muy baja, en torno a 2.8 nM (Kema y cols. 2000), las reacciones adversas mediadas por ella están relacionados con un incremento de la misma, que puede producir trombogénesis, espasmo vascular, mitogénesis y la proliferación de células musculares lisas vasculares (Kaumann y Levy 2006).

Receptores 5-HT₁

Este tipo de receptores forman la mayor subclase de receptores de 5-HT. Se dividen a su vez en cinco subgrupos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Originalmente estos receptores se agruparon porque comparten una alta afinidad por 5-HT y 5-carboxamidotriptamina (5-CT) y son antagonizados por metiolepina y metisergida (Bradley y cols. 1986).

Todos estos receptores se acoplan a una proteína G_i, con inhibición de la AC como su principal vía de señalización (Raymond y cols. 2001). Se localizan principalmente en el SNC y se han relacionado clásicamente con ansiedad, humor y memoria (Pytliak y cols. 2011).

De especial interés resulta el receptor 5-HT_{1B}, ampliamente distribuido en todo el sistema cardiovascular, que, junto con el receptor 5-HT_{2A}, media la vasoconstricción inducida por 5-HT y triptanos en arterias y venas (Kaumann y cols. 1993).

Por otra parte, a pesar de que se ha encontrado ARNm del receptor 5-HT_{1D} en arterias cerebrales, su papel no está claro puesto que no se ha podido demostrar su implicación en la vasoconstricción o relajación de estas arterias (Verheggen y cols. 2004). Asimismo, el receptor 5-HT_{1F} parece estar relacionado con el efecto anti-migrañoso de algunos triptanos, sin embargo, su mecanismo de acción no sería

vascular sino neural, inhibiendo la liberación de mediadores implicados en procesos inflamatorios (Goldstein y cols. 2001).

Receptores 5-HT₂

Esta familia de receptores está formada por 3 receptores diferentes: el receptor 5-HT_{2A}, receptor 5-HT₂ “clásico”, al que todavía a menudo se refiere como 5-HT₂; el receptor 5-HT_{2B}, inicialmente denominado 5-HT_{2F} debido al alto nivel de expresión de este particular receptor en el fundus del estómago; y el receptor 5-HT_{2C} originalmente clasificado como receptor 5-HT_{1C} debido a su alta afinidad por 5-HT, pero más tarde renombrado receptor 5-HT_{2C}, en base a su perfil farmacológico, su acoplamiento a segundos mensajeros y su secuencia aminoacídica (Gerhardt y Van Heerikhuizen 1997).

Estos receptores se acoplan principalmente a proteínas G_q y activan la vía de la PLC, con el consiguiente aumento de IP₃ y DAG así como de Ca⁺² intracelular.

Los receptores 5-HT_{2C} no se han encontrado en periferia (Kaumann y Levy 2006), por lo que nos centraremos en los 5-HT_{2A} y, principalmente, en los receptores 5-HT_{2B} que analizaremos más adelante.

Los receptores 5-HT_{2A} se expresan abundantemente en varias regiones corticales, núcleo caudado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio e hipocampo, así como, a nivel periférico, en el músculo liso y en las plaquetas (Enguix y cols. 2003). Como se ha comentado, este receptor se acopla fundamentalmente a proteínas G_{αq} y activa varias isoformas de la PLC, aunque también se ha descrito el acoplamiento a otras proteínas G y a otros sistemas efectores como la PLA₂ (Berg y cols. 1998; Leysen 2004). Este receptor media vasoconstricción en el músculo liso vascular y favorece la agregación plaquetaria.

Receptores 5-HT₃

Este receptor de 5-HT es el único que no es un GPCR, es un canal iónico de Na⁺ y K⁺ perteneciente a la familia de los *Cys-loop receptors* (Lummis 2012). Se encuentra tanto a nivel central como periférico, en el corazón, se encuentra principalmente en las neuronas aferentes vagales y simpáticas, mediando bradicardia refleja (Mohr y cols. 1987) y dolor cardíaco (Fu y Longhurst 2002).

Receptores 5-HT₄

Estos receptores, acoplados a proteínas G_s, estimulan la AC incrementando los niveles de AMPc. El receptor 5-HT₄ juega un papel significativo en la periferia, especialmente en el tracto gastrointestinal, donde participa en la modulación de la motilidad gastrointestinal y en las respuestas secretoras de la mucosa intestinal (Hansen y cols. 2008).

A nivel cardiovascular, son los responsables de la taquicardia inducida por 5-HT. Su localización, en el tejido auricular, junto con el hecho de que antagonistas de este receptor las reviertan, han relacionado al receptor 5-HT₄ con arritmias (Hegde y Eglen 1996). De hecho, el tegaserod (Zelnorm), un fármaco que activa los receptores 5-HT₄ del tracto gastrointestinal, fue retirado del mercado en varios países debido al aumento de eventos cardiovasculares potencialmente mortales, en particular, ataques al corazón y derrames cerebrales, observados en los ensayos clínicos (Nichols y Nichols 2008).

Receptores 5-HT₅

Los receptores 5-HT₅, que comprenden los subtipos 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}, se expresan en múltiples regiones del cerebro, pero no en los tejidos periféricos. Estos receptores son probablemente los menos estudiados de todos los receptores de 5-HT. Actualmente no se han identificado receptores 5-HT₅ funcionales *in vivo* (Raymond y cols. 2001).

Receptores 5-HT₆

El receptor 5-HT₆, que estimula la AC, se expresa en varias regiones del cerebro y tiene una alta afinidad por los antipsicóticos típicos y atípicos. Aunque se han hallado niveles bajos de ARNm del receptor en algunos órganos periféricos (glándula suprarrenal y estómago), no hay evidencias de su expresión en el aparato cardiovascular (Raymond y cols. 2001).

Receptores 5-HT₇

Estos receptores, al igual que los receptores 5-HT₄ y 5-HT₆, se acoplan a proteínas G_s, activando la vía de la AC. Existen estudios que lo asocian también a la proteína G₁₂, promoviendo la activación transcripcional a través de pequeñas GTPasas de la familia Rho.

En el sistema cardiovascular humano, se ha encontrado ARNm del receptor 5-HT₇ en el músculo liso de las arterias coronarias y otros vasos, en donde puede mediar fenómenos de relajación (Kaumann y Levy 2006).

III. RECEPTOR 5-HT_{2B}

Estructura y distribución

El efecto del receptor 5-HT_{2B} fue caracterizado por primera vez por Vane en 1957, en un estudio de órgano aislado en el que se adicionaba 5-HT a músculo liso aislado de fundus de estómago de rata. Inicialmente se incluyó en el grupo 5-HT_{1-like}, y posteriormente se denominó 5-HT_{2F} por encontrarse en el fundus de estómago de rata mediando contracción (Baxter y cols. 1994; Clineschmidt y cols. 1985; Vane 1957).

El receptor 5-HT_{2B} humano se ha detectado principalmente en tejido intestinal y cardíaco: íleon (Borman y Burleigh 1997; Borman y Burleigh 1995), colon (Borman y cols. 2002) y corazón (Fitzgerald y cols. 2000); pero su ARNm también se

ha encontrado en útero (Kelly y Sharif 2006), cerebro, médula espinal, vasos sanguíneos, hígado, páncreas, bazo y riñón (Bonhaus y cols. 1995; Helton y cols. 1994; Ullmer y cols. 1995).

Señalización

La activación del receptor 5-HT_{2B} en su papel como GPCR lleva a la disociación de su proteína G y la liberación de la subunidad G_{αq}, que a su vez activa la PLCβ produciendo inositol trifosfato (IP₃), con la consiguiente movilización de calcio intracelular, y diacilglicerol (DAG), como segundos mensajeros (Kursar y cols. 1994; Porter y cols. 1999; Schmuck y cols. 1994).

El nivel de complejidad aumenta debido a que la señalización del receptor 5-HT_{2B} varía dependiendo del sistema en el que éste se exprese. En el fundus de estómago de rata, donde se produce contracción tras la activación (Clineschmidt y cols. 1985; Vane 1957), el mecanismo de acción no está del todo claro, aunque parece que el acoplamiento a una proteína G_{αz} podría estar implicado en la contracción del tejido. Como efectores se han descrito la PKC (Cox y Cohen 1996) y canales de calcio voltaje-dependientes (Cox y Cohen 1995). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha detectado aumento en la hidrólisis de fosfoinositoles (Cox y Cohen 1995), movilización de óxido nítrico (NO) (Cox y cols. 1999), activación de la proteína G_q (Cohen y Wittenauer 1987) o acoplamiento a fosfolipasa D (Tournois y cols. 1998).

Se ha comprobado que ligandos agonistas del receptor 5-HT_{2B} poseen selectividad funcional, presentando diferentes grados de eficacia según la cascada de señalización evaluada (Cussac y cols. 2008).

Función

Los receptores 5-HT_{2B} tienen varias acciones/ funciones en distintos sistemas, incluyendo regulación en el SNC (Doly y cols. 2008; Kantor y cols. 2004; Launay y cols. 2006), motilidad gástrica e intestinal (Borman y cols. 2002; Wouters y cols. 2007), función cardiovascular (Jaffré y cols. 2009; Jaffré y cols. 2004) y procesos de desarrollo y embriogénesis (Choi y cols. 1994; Lauder y cols. 2000; Nebigil y cols. 2000).

Este receptor se ha asociado con diferentes patologías vasculares como hipertrofia cardíaca e hipertensión pulmonar (Jaffré y cols. 2009; Launay y cols. 2002). Se ha comprobado que estos receptores están sobreexpresados en el corazón de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva. Asimismo, la hipertrofia cardíaca inducida por la estimulación simpática con una perfusión crónica *in vivo* de isoprotenerol, se previene con antagonistas del receptor 5-HT_{2B} (SB206553 y SB215505) y no se manifiesta en ratones *knockout* para este receptor (Jaffré y cols. 2004). En el caso de la hipertensión pulmonar, la exposición crónica a 5-HT puede contribuir al desarrollo de la enfermedad por proliferación de receptores 5-HT_{2B} (Launay y cols. 2002).

Por otra parte, se ha descrito que la inactivación del gen del receptor 5-HT_{2B} en ratones provoca la muerte embrionaria y neonatal, a causa de defectos en el corazón debidos al deterioro de la capacidad proliferativa de los miocitos (Jaffré y cols. 2004).

Agonismo del 5-HT_{2B}

Se ha comprobado que distintos fármacos relacionados con cardiotoxicidad (fenfluramina, pergolida, ergotamina, etc.) activan el receptor 5-HT_{2B} y/o aumentan los niveles de 5-HT en sangre (Fitzgerald y cols. 2000; Pritchett y cols. 2002). Los graves efectos adversos que presentan los agonistas 5-HT_{2B} han obstaculizado el desarrollo de ligandos agonistas como fármacos que actúen sobre el SNC, aunque

se han descrito algunos compuestos útiles en el tratamiento de la ansiedad (Kennett y cols. 1998; Kennett y cols. 1996) y la depresión (Launay y cols. 2006; Nic Dhonnchadha y cols. 2005).

En términos generales, los fármacos que activan el receptor 5-HT_{2B} y/o aumentan los niveles de 5-HT en sangre son considerados potenciales inductores valvulopáticos. Hoy en día la importancia de probar los candidatos a fármaco y sus principales metabolitos como agonistas en el receptor 5-HT_{2B} queda fuera de toda duda. La prescripción de fármacos que actúan como agonistas 5-HT_{2B} esta asimismo siendo cuestionada (Elangbam 2010; Roth 2007; Setola y Roth 2005).

- **Valvulopatías cardíacas**

Anatomía e histología cardíaca

El corazón, principal órgano del aparato circulatorio, es un órgano musculoso hueco, situado en la cavidad torácica, cuya función es bombear la sangre a través de los vasos sanguíneos del organismo.

El corazón se divide en cuatro cavidades, dos superiores denominadas atrios o aurículas y dos inferiores denominadas ventrículos. El septo o tabique separa las cavidades izquierdas de las derechas, mientras que las válvulas aurículoventriculares separan las cavidades superiores de las inferiores.

Las válvulas cardíacas son un conjunto de complejas y delicadas pero resistentes estructuras de tejido conjuntivo, cuya función es permitir el flujo hemodinámico unidireccional, de la sangre a través de las cámaras del corazón. Hay cuatro válvulas cardíacas, que se clasifican en 2 grupos:

- Válvulas atrioventriculares:
 - Válvula bicúspide o mitral: situada entre la aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo.
 - Válvula tricúspide: situada entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho.

- Válvulas semilunares:
 - Válvula aórtica: situada entre el ventrículo izquierdo y la aorta.
 - Válvula pulmonar: situada entre el ventrículo derecho y la arteria pulmonar.

Las estructuras anatómicas básicas del corazón se ilustran en la Figura 6.

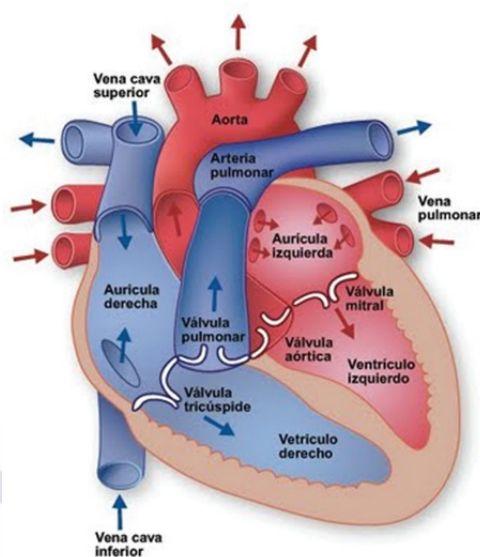


Figura 6: Representación esquemática de la anatomía básica del corazón en sección. Se muestran las cámaras, las válvulas y los grandes vasos.

HISTOLOGÍA VALVULAR. Las válvulas cardíacas se asientan en su raíz a través de un anillo fibroso. Todas ellas tienen una estructura general similar. Las válvulas son continuas en su base con el miocardio (en el caso de las válvulas aurículoventriculares) o con las paredes de los grandes vasos (en el caso de las semilunares). Las válvulas semilunares son normalmente estructuras avasculares, mientras que las hojas de las válvulas mitral y tricúspide pueden ser penetradas por pequeños vasos, pero sólo en su base.

La válvulas aórtica y pulmonar presentan en el medio del borde libre un engrosamiento llamado nódulo de Arancio. Por su parte, los bordes libres de las hojas de las válvulas atrioventriculares están unidos por un tejido fino y fibroso

denominado cuerdas tendinosas a las puntas de los músculos papilares, que son proyecciones de tejido miocárdico derivado de los ventrículos. La función de las cuerdas es evitar el prolapso de las valvas en las aurículas cuando la válvula se cierra durante la sístole. Las válvulas semilunares en los conductos de salida están formadas por tres valvas cada una. Estas válvulas funcionan como bolsillos, abriéndose, durante la sístole, bajo la presión de la sangre hacia la aorta o la arteria pulmonar, y ocluyendo completamente las vías de salida durante la diástole, para así prevenir el reflujo hacia los ventrículos. En el presente trabajo se estudiarán las válvulas aórtica y mitral, representadas en la Figura 7.

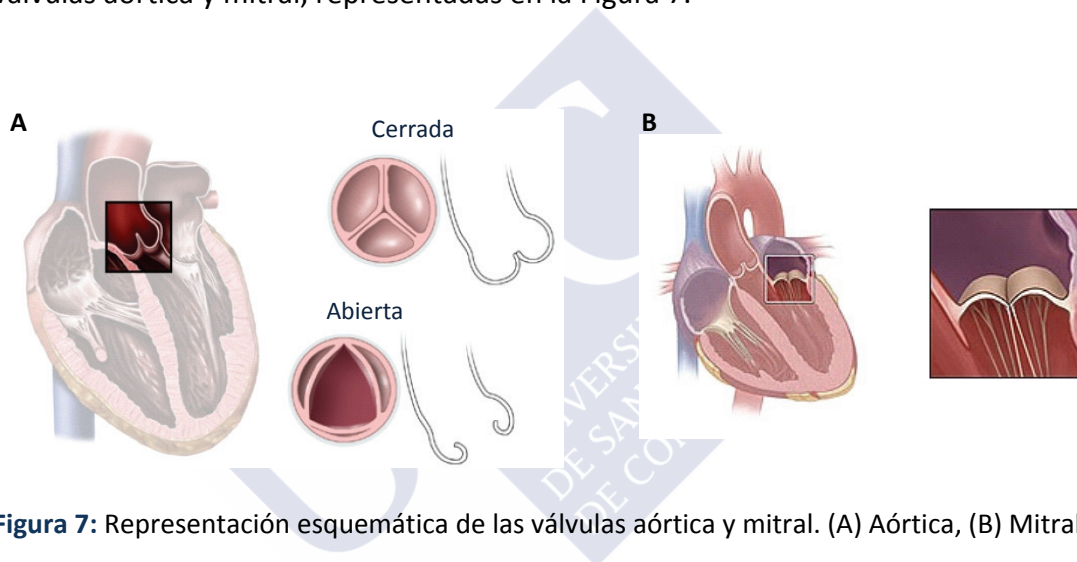


Figura 7: Representación esquemática de las válvulas aórtica y mitral. (A) Aórtica, (B) Mitral.

Las hojas de las válvulas semilunares están cubiertas de endotelio e histológicamente tienen tres capas de tejido bien definidas: la ventricular (que recibe el flujo sanguíneo), compuesta por colágeno y fibras elásticas, que dota de elasticidad a la estructura; la esponjosa subyacente, compuesta por colágeno laxo y abundantes proteoglicanos, que actúan de amortiguador; y la fibrosa (hacia las arterias de salida), formada por fibras de colágeno denso, que aportan consistencia. Se ha descrito una cuarta capa (más fina) hacia el lado aórtico (Schoen 2005).

Las válvulas aurículoventriculares constan de una hoja flexible de tejido conjuntivo, cubierto en sus superficies auricular y ventricular por una capa de endocardio. Las hojas de las válvulas aurículoventriculares son estructuralmente similares a las válvulas semilunares. Presentan una capa atrial o auricular, una

espongiosa, una fibrosa y una ventricular. La capa endocárdica es más gruesa en el lado auricular que en el ventricular. En la zona de inserción de la válvula, la musculatura de la aurícula penetra en el interior de su estructura.

Las válvulas ya formadas presentan células endoteliales valvulares (endocárdicas, que cubren a modo de capa superficial toda la superficie de la hoja valvular), células valvulares intersticiales (principalmente fibroblastos, localizadas en profundidad) y la matriz intersticial extracelular. Existe una relación compleja y dinámica entre estos tres componentes, que dotan a las válvulas de propiedades que permiten su función y capacidad de respuesta a cambios en la hemodinámica del corazón, cambios relacionados con la edad, y diversos procesos fisiopatológicos (Donnelly 2008).

CÉLULAS VALVULARES. Las células intersticiales valvulares, las células más abundantes en las tres capas, son células fenotípicamente dinámicas que mantienen la integridad y estabilidad de las válvulas normales y regulan los procesos de reparación en procesos patológicos de daño valvular, por su capacidad de transformarse en miofibroblastos y células musculares lisas (Walker y cols. 2004). Las células valvulares intersticiales muestran rasgos morfológicos y funcionales característicos de los fibroblastos, células musculares lisas y miofibroblastos (Schoen 2006).

Las células endoteliales valvulares tienen propiedades que las hacen fenotípica y fisiológicamente únicas en comparación con las células endoteliales de otros niveles del árbol vascular, como su capacidad de respuesta a estímulos bioquímicos y a fuerzas físicas y la regulación de respuestas inflamatorias e inmunitarias (Aird 2007). Se ha postulado que estas células pueden volver al proceso de transdiferenciación que las diferenció de las células vasculares intersticiales en respuesta a lesiones, y promover una población incipiente de células intersticiales proliferativas produciendo la típica matriz engrosada, hiper celular y expandida de las válvulas dañadas (Aikawa y cols. 2006; Paranya y cols. 2001).

MATRIZ EXTRACELULAR VALVULAR. La matriz intersticial extracelular está formada por tres capas de tejido conjuntivo organizado que proporciona los cambios en la forma necesarios para permitir el adecuado flujo cíclico de sangre. Como ya se ha explicado anteriormente, la capa más interna se compone de tejido conectivo rico en fibras elásticas que se extienden y se retraen durante la sístole y la diástole (Schoen 1997). La capa media se compone de tejido conectivo laxo rico en colágeno y glicosaminoglicanos (GAGs), capaz de absorber las fuerzas de cizallamiento y choque entre las capas de la válvula durante el movimiento de ésta. La capa más externa, fibrosa, proporciona resistencia y rigidez para mantener la integridad estructural a base de densas fibras de colágeno de tejido conectivo (Schoen 2005).

Los principales componentes de la matriz extracelular valvular, por tanto, son los proteoglicanos, el colágeno y la elastina. La matriz está producida y mantenida por las células intersticiales valvulares. Su cantidad y calidad dependen de la viabilidad y función de tales células. Los proteoglicanos son los componentes básicos de la matriz extracelular y juegan un importante papel estructural. Son cadenas de GAGs unidas a un núcleo proteico. Dependiendo de los requerimientos biológicos y biomecánicos, puede cambiar la estructura química de estas cadenas de GAGs (Grande-Allen y cols. 2004; Wight 2002). Las válvulas contienen colágeno tipo I, III y IV; elastina, fibronectina y tenascina-C. La reparación mediada por células intersticiales valvulares implica la síntesis, degradación y reorganización de la matriz extracelular, que depende de las enzimas presentes en la matriz, como las metaloproteinasas, capaces de degradarla. Se han observado cambios en la matriz extracelular en patologías valvulares cardíacas, por ejemplo la valvulopatía mitral mixomatosa (Grande-Allen y cols. 2004; Gupta y cols. 2009; Mahimkar y cols. 2009) y en valvulopatías inducidas por fármacos en humanos y animales (Droogmans y cols. 2007; Elangbam y cols. 2008; Elangbam y cols. 2006; Gustafsson y cols. 2005; McDonald y cols. 2002) (Figura 8).

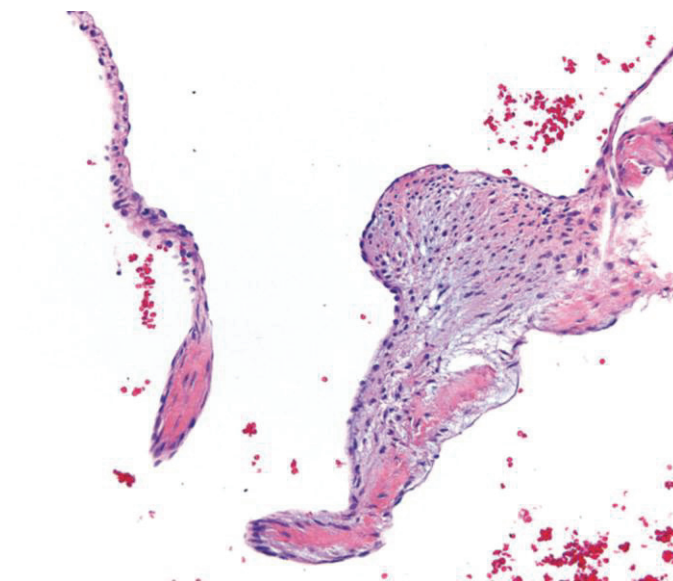


Figura 8: Válvula aórtica de una rata Sprague-Dawley con crecimiento mixomatoso en una de las valvas. Se observa una acumulación de glicosaminoglicanos dentro de la matriz de tejido conectivo de la valva. Tomada de (Donnelly 2008).

Valvulopatías cardíacas inducidas por fármacos

La 5-HT tiene efectos mitogénicos sobre fibroblastos y células del músculo liso (Nemecek y cols. 1986; Pakala y cols. 1994). La estimulación de sus receptores provoca la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta* - TGF- β), que a su vez estimula la producción de GAGs (Jian y cols. 2002), proteínas que se han encontrado en altas concentraciones en las válvulas de pacientes con valvulopatías cardíacas inducidas por fármacos (*drug-induced valvular heart disease*) (Bhattacharyya y cols. 2009).

Ya en 1997, la fenfluramina y la dexfenfluramina, dos fármacos utilizados en el tratamiento de la obesidad, fueron asociados con alteraciones valvulares distintivas en pacientes con hallazgos anatomopatológicos similares al daño en válvulas cardíacas producido por tumores carcinogénicos secretores de serotonina (Connolly y cols. 1997). Las primeras hipótesis sostenían que estos fármacos incrementaban las concentraciones de 5-HT circulante interfiriendo en el mecanismo del SERT, sin embargo, más tarde se comprobó que estos compuestos no sólo no incrementan sino que disminuyen los niveles plasmáticos de 5-HT, lo que

llevó a plantearse si la causa de las valvulopatías no sería un agonismo directo en los receptores de 5-HT en lugar de un incremento de la 5-HT circulante (Bhattacharyya y cols. 2009).

El receptor 5-HT_{2B} se encuentra tanto en la válvula aórtica como en la mitral y, puesto que estimula la mitogénesis, podría contribuir al desarrollo de estas valvulopatías. En el 2000 se comprobó que la norfenfluramina, un agonista de los receptores 5-HT_{2B} (Fitzgerald y cols. 2000), junto con otros agonistas utilizados en el tratamiento de la migraña (ergotamina, dihidroergotamina, metisergida) comparte esta capacidad para inducir la enfermedad cardíaca valvular. Finalmente, en 2007, dos grandes estudios epidemiológicos europeos comprobaron la asociación entre enfermedades en las válvulas mitral, aórtica y tricúspide y el uso de pergolida y cabergolina, dos antiparkinsonianos agonistas dopaminérgicos que también son potentes agonistas 5-HT_{2B} (Schade y cols. 2007; Zanettini y cols. 2007).

En la última década, se han encontrado evidencias de que la activación de receptores 5-HT_{2B}, junto con la inhibición del SERT, juega un papel importante en la patogénesis de la valvulopatía inducida por 5-HT (Elangbam y cols. 2008; Roth 2007). El papel crítico que juega la activación del receptor 5-HT_{2B} en la patogénesis de esta enfermedad se ve resaltado por el hecho de que compuestos químicamente similares a los antes mencionados, tales como lisurida y tergurida, agonistas selectivos para los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{2A} y antagonistas de 5-HT_{2B}, no se asociaron con valvulopatías en los seres humanos (Elangbam 2010).

Por otra parte, en 2008, Elangbam y cols demostraron que el tratamiento durante 7 días con inyecciones subcutáneas de 5-HT provocaba anomalías estructurales y composicionales junto con una modulación de la transcripción de los genes correspondientes al receptor 5HT_{2B} y al transportador de 5-HT en las válvulas mitral y aórtica de ratas Sprague-Dawley (Elangbam y cols. 2008). En el estudio se concluye que «las valvas de las válvulas de las ratas tratadas con 5-HT tenían un mayor grosor, una mayor cantidad de GAGs y una menor cantidad de colágeno. La alteración de la composición se correlacionó con una regulación al alza y una

regulación a la baja de los genes de 5-HT_{2B} y SERT, respectivamente». Esto no sólo conduce a un aumento del número de receptores disponibles, sino también a una mayor cantidad de 5-HT circulante.

El mecanismo de señalización sugerido para la valvulopatía inducida por 5-HT_{2B} implica la participación de la proteína G_{qβ}. Aunque los detalles específicos aún no se conocen, estas proteínas G pueden activar vías mitogénicas, ya sea por la inducción de la fosforilación de Src, tirosincinasas involucradas en la regulación de procesos de proliferación, diferenciación y angiogénesis (Wheeler y cols. 2009), o mediante la activación de cinasas reguladas extracelularmente (*Extracellular Regulated Kinases* - ERK) que participan en la regulación de la meiosis, la mitosis y funciones postmitóticas en células diferenciadas. Además, Src-P puede mediar y potenciar la actividad del TGF-β, aumentando la mitogénesis estimulada por 5-HT_{2B} (Roth BL, 2007) (Figura 9).

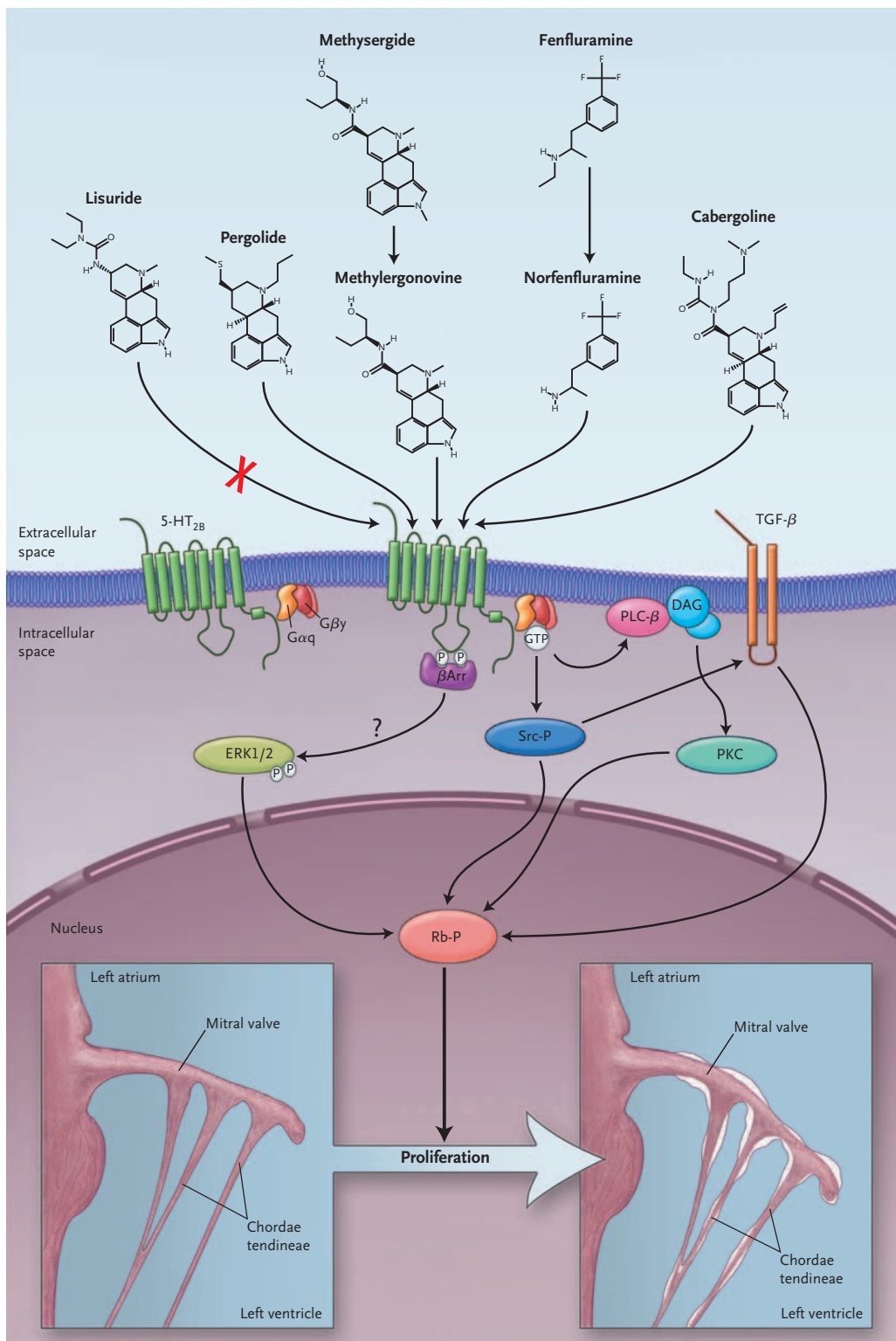


Figura 9: Vías de señalización del receptor 5-HT_{2B}. La activación del receptor 5-HT_{2B} puede mediar proliferación a través de vías que involucran ERK_{1/2}, Src, y PKC. Por otra parte, puede existir *crossstalk* con la vía del TGF-β₁ a través de interacciones con Src. (Tomada de Roth, 2007).

IV. I+D DE FÁRMACOS.

El descubrimiento de un nuevo medicamento es un proceso largo y complejo que consta de tres importantes etapas: investigación (desde un concepto terapéutico al compuesto químico), desarrollo (desde el compuesto químico al medicamento registrado) y comercialización (desde el medicamento registrado a la aplicación terapéutica y al mercado). Estas etapas no son independientes, sino que están perfectamente coordinadas entre sí durante todo el proceso.

En primer lugar surge la idea de la diana donde va actuar el fármaco, moléculas únicas o complementarias que desempeñan un papel modulable por fármacos en la fisiopatología de la enfermedad considerada (genes, proteínas receptoras, canales iónicos, enzimas, factores de regulación, lípidos etc.). Posteriormente la diana seleccionada se somete a validación mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, es decir, demostrar experimentalmente, que su modulación puede modificar la progresión y/o los síntomas de la enfermedad para la que ha sido identificada. A continuación, se trata de encontrar la molécula idónea para modular esta diana, para lo que se evalúa la actividad de decenas a millones de moléculas frente a la diana identificando los compuestos más activos para la diana propuesta, que se denominan *hits*. El siguiente paso consiste en llevar a cabo actividades de química terapéutica, en paralelo con la farmacología, para desarrollar partiendo de los *hits* seleccionados, compuestos que presenten las características farmacológicas más favorables para el efecto buscado y para los que pueda ser protegida su propiedad intelectual, denominados cabezas de serie o *leads*. Estos cabezas de serie se optimizarán en eficacia, farmacocinética y seguridad, hasta un candidato, compuesto que debe cumplir las propiedades necesarias para un candidato a medicamento (drug-like): potencia y selectividad por la diana; propiedades farmacocinéticas idóneas; perfil de seguridad aceptable; estabilidad química y compatibilidad para la formulación farmacéutica; etc. Por último, el candidato entra en la fase de ensayos preclínicos y clínicos, que lo llevarán a convertirse en un medicamento (Loza 2013).

Farmacología preclínica de seguridad

El descubrimiento de fármacos y el proceso de desarrollo pueden ser interpretados como una historia de muchos fracasos, con raros, pero cruciales, casos de éxito, ya sea debido a la suerte o a la planificación racional. Desde las primeras fases de los ensayos clínicos sólo el 11% de los compuestos llegan a registro (Kola y Landis 2004).

Los motivos que pueden explicar los fracasos son variados y han cambiado con el tiempo. Así, en los años 90, la mayoría se podían atribuir a problemas relacionados con cuestiones farmacocinéticas de administración, distribución, metabolismo y eliminación (ADME/PK) (Wang y Urban 2004) mientras que, más recientemente, la integración de modelos de ADME/PK tanto computacionales, *in silico*, como experimentales en el proceso de descubrimiento de fármacos, ha hecho que sean la eficacia y la seguridad los dos principales obstáculos.

Entre los ejemplos recientes de compuestos que se han retirado del mercado, la principal causa de suspensión han sido las reacciones adversas medicamentosas, lo que pone de manifiesto la importancia del perfilado de seguridad en las primeras fases del proceso. Sólo el Drotrecogin alfa (Xigris) se retiró como consecuencia de estudios que probaron su falta de eficacia (Poole y cols. 2009).

Las normativas en vigor exigen amplios estudios *in vivo* (Snodin 2002), relacionados con la seguridad/evaluación de riesgos (Bass y cols. 2004). Estos estudios son costosos y exigen tiempo y, lo que es más importante, entran en el proyecto en etapas tardías y con baja capacidad de introducción de cambios.

Alternativamente, actualmente, en las fases tempranas del proceso de descubrimiento de fármacos, concretamente en la identificación de *hits* y en la selección de series de *leads*, la aplicación de un panel estándar de antidiarias (en torno a 60), asociadas a determinados problemas de seguridad, aporta datos que permiten identificar el peligro y comprender la reactividad potencial de las series de

leads. Estos datos se utilizarían para generar modelos de relación estructura actividad (SAR) y para guiar el diseño de nuevas moléculas, favoreciendo así su eficacia y eliminando su toxicidad potencial, evitando fracasos posteriores. En las fases avanzadas de descubrimiento de fármacos, estos datos se pueden generar evaluando un panel más amplio de antidianas y se pueden utilizar para la mejor comprensión de sus efectos *in vivo* (Loza 2013).

En este sentido por ejemplo, la compañía Boehringer Ingelheim, desarrolló un nuevo inhibidor de la proteína ribosomal S6 kinasa alfa3 (RSK2) para el tratamiento de infarto de miocardio, sin embargo, el *lead* identificado inicialmente, BIX 02565, al evaluarse en un panel de 68 dianas mostró una actividad sustancial en receptores alfa-adrenérgicos. El significado biológico de estas actividades en antidianas se demostró en estudios funcionales en tejido y en estudios *in vivo* relacionándose con la afinidad de las series químicas por el receptor adrenérgico α_{1A} . Los estudios preliminares del perfil farmacológico *in vitro*, junto con los estudios SAR, permitieron identificar un potente inhibidor de la RSK2 sin afinidad por el receptor α_{1A} adrenérgico y sin efectos adversos cardiovasculares *in vivo* (Fryer y cols. 2012).

Por otra parte, recientemente cuatro de las principales compañías farmacéuticas (AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Novartis y Pfizer) compartieron, por primera vez, sus conocimientos y su experiencia en la aplicación en fases tempranas de las nuevas tecnologías de *screening* para detectar las interacciones de las moléculas con las antidianas responsables de su toxicidad con el objetivo de discutir la mejor opción y considerar, en base a la experiencia conjunta, cuál sería el panel mínimo de antidianas a ensayar (Bowes y cols. 2012).

En base a todo lo expuesto, la importancia de obtener un conocimiento completo del perfil farmacológico de un fármaco candidato antes de realizar los primeros ensayos en humanos ha quedado fuera de toda duda.

V. DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO AL CELECOXIB

Los antiinflamatorios no esteroideos, AINEs, son fármacos analgésicos que poseen actividad antitérmica y, en su mayoría, antiinflamatoria. Con frecuencia se les conoce por su acrónimo para diferenciarlos del otro gran grupo de antiinflamatorios, los esteroideos, formado por la cortisona y sus derivados.

El primer AINE sintetizado fue el ácido acetilsalicílico en 1897, posteriormente, gracias al descubrimiento del mecanismo de acción de la aspirina (Vane 1971), se han desarrollado por lo menos otros veinte compuestos que, aunque pertenezcan a diferentes familias químicas, se agrupan bajo el término AINEs.

Los principales efectos terapéuticos, así como muchas de las reacciones adversas de los AINEs, pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de las ciclooxigenasas, COX-1 y COX-2, enzimas que convierten el ácido araquidónico (AA) que se encuentra en las membranas celulares en eicosanoides, particularmente, en prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (Tx). Algunos de estos eicosanoides participan, en grado diverso, en los mecanismos patogénicos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINEs sería responsable de su actividad terapéutica. Dado que los eicosanoides también están implicados en otros muchos procesos fisiológicos: relajación y contracción del músculo liso, vasodilatación, agregación plaquetaria, diuresis, citoprotección (mucosa gastrointestinal), tránsito intestinal... etc.; dicha inhibición sería también responsable de las diversas reacciones adversas características de estos fármacos (Feria M, 2008) (Figura 10).

A principios de los años 90, los grupos de Needleman, Simmons y Herschman (Kujubu y Herschman 1992; Masferrer y cols. 1990; Xie y cols. 1991), evidenciaron la presencia de una isoforma inducible de la enzima COX, más tarde identificada como COX-2. Este descubrimiento condujo a la hipótesis de que las PGs que se producen a través de la expresión constitutiva de la COX-1 están involucradas en funciones de mantenimiento, mientras que las PGs

proinflamatorias se producen por la inducción de la isoforma COX-2 (Meade y cols. 1993; Vane y cols. 1998) (Figura 10).

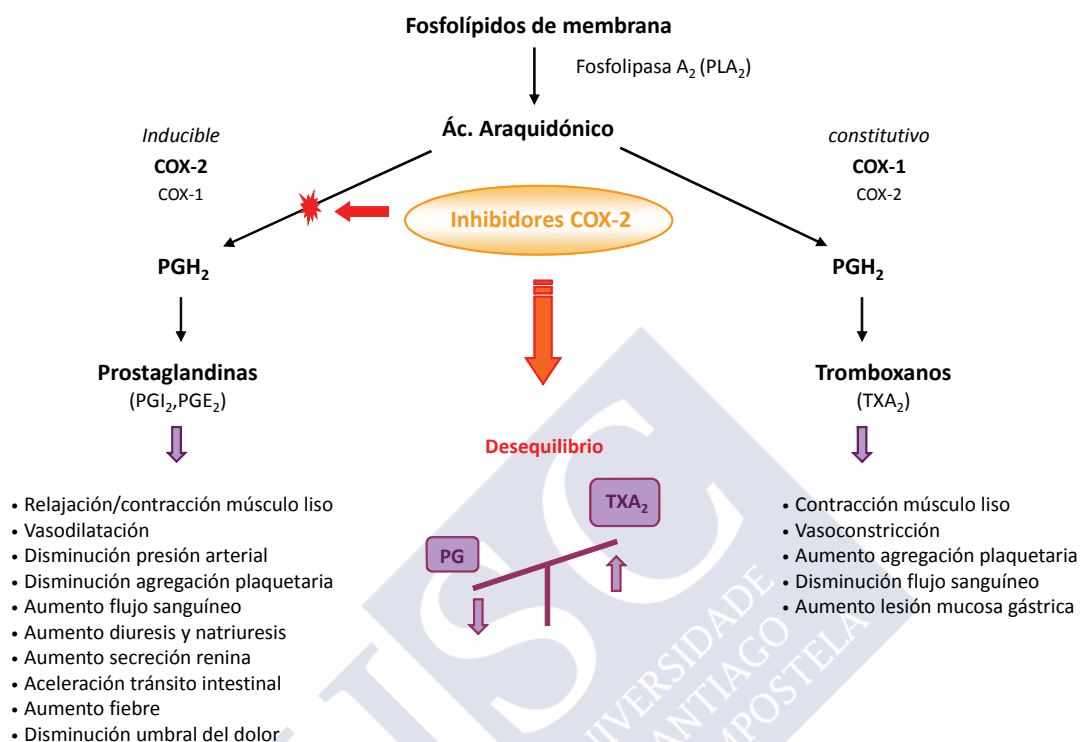


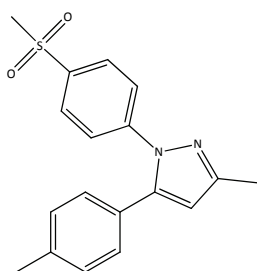
Figura 10: Representación esquemática de la cascada del ácido araquidónico. Implicaciones de la inhibición selectiva de la COX-2.

Era sabido que los AINEs tradicionales inhibían ambas isoformas de la COX y sus efectos adversos gastrointestinales (GI) fueron atribuidos a la inhibición de las PGs gastroprotectoras producidas a través de la vía de la COX-1, puesto que, en humanos y otras especies, se ha demostrado que la COX-1, pero no la COX-2, se expresa constitutivamente a lo largo del tracto gastrointestinal (Kargman y cols. 1996).

A raíz de estos datos, la comunidad científica centró sus esfuerzos en el diseño de inhibidores selectivos de la COX-2, denominados coxibs, con el fin de desarrollar mejores agentes antiinflamatorios y analgésicos con reducción de los efectos adversos en comparación con los AINEs tradicionales. En 1999, G. D. Searle

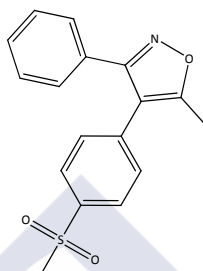
y Pfizer (ahora Pfizer Inc) lanzó el primer inhibidor selectivo de la COX-2: el celecoxib (Celebrex®). Desde entonces han salido al mercado diferentes coxibs, siempre intentando aumentar la selectividad COX-2 vs COX-1 (Figura 11).

Primera generación

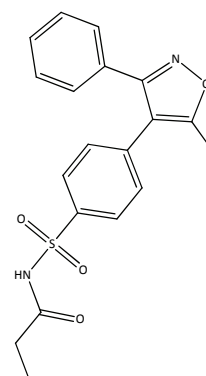


Celecoxib
Sulfonamida

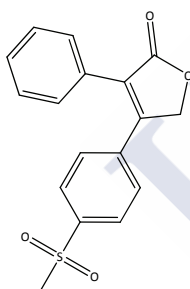
Segunda generación



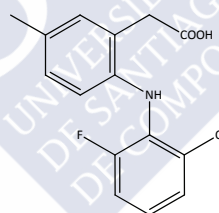
Valdecoxib
Sulfonamida



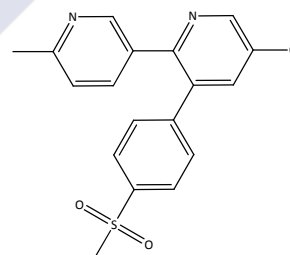
Parecoxib
Sulfonamida



Rofecoxib
Sulfonilo



Lumiracoxib
Ác. fenilacético



Etoricoxib
Sulfonilo

Figura 11: Estructura química de los coxibs.

Todos los coxibs poseen efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, comparables en eficacia a los de los AINEs convencionales. Tales efectos se deberían a la inhibición de la COX-2, puesto que, en principio, a concentraciones terapéuticas, carecerían de actividad inhibidora de la COX-1, hecho que haría que fueran significativamente menos agresivos que otros AINEs para la mucosa gastrointestinal. En los últimos años se ha comprobado que la selectividad de estos compuestos por la COX-2 frente a la COX-1 no es tan alta como se

esperaba (Warner y cols. 1999), por lo que habría que considerar ambas isoformas a la hora de explicar tanto los efectos terapéuticos como los efectos adversos, que siguen existiendo.

Los coxibs representan la primera clase de AINEs fundamentados en un mecanismo razonado, biológicamente plausible, para mejorar la seguridad GI basándose en la inhibición selectiva de la COX-2 o, lo que es lo mismo, en la conservación selectiva de la COX-1 (FitzGerald y Patrono 2001). Sin embargo, estudios posteriores, VIGOR y CLASS (Bombardier et al. 2000; Silverstein et al. 2000), demostraron que no representaron un gran avance puesto que siguen presentando reacciones adversas GI y la eficacia es similar a la de los AINEs anteriores.

Coxibs y riesgo cardíaco

- **Evidencias de cardiotoxicidad**

La capacidad de los coxibs de evitar los efectos secundarios más frecuentes e importantes (toxicidad GI y problemas hemorrágicos) que acompañan de forma casi inseparable a los AINE clásicos, respetando su eficacia analgésica, antipirética y antiinflamatoria, les proporcionó un gran éxito inicial tras su lanzamiento al mercado. Sin embargo, en los años transcurridos desde su aparición, este subgrupo de AINE ha pasado a situarse en segunda línea de uso debido a su riesgo cardiovascular.

Los primeros signos de preocupación en cuanto a la seguridad cardiovascular de los coxibs surgieron debido a la imprevista pero significativamente mayor incidencia de eventos tromboticos cardiovasculares con rofecoxib frente a naproxeno en el estudio VIGOR (Bombardier y cols. 2000). A pesar de que en este estudio no se puede discernir el grado en el que la diferencia en el riesgo de infarto agudo de miocardio puede deberse al efecto protector del naproxeno (Solomon y cols. 2002; Watson y cols. 2002) y/o a un mayor riesgo asociado al inhibidor

selectivo de la COX-2, los datos obtenidos llevaron a Merck a la retirada voluntaria de Vioxx® (rofecoxib) del mercado mundial.

Un posterior meta-análisis de datos (Kearney y cols. 2006) de aproximadamente 140 ensayos aleatorios de cinco coxibs diferentes reveló, entre otras cosas, que los coxibs están asociados con un moderado aumento del riesgo de efectos adversos vasculares importantes, siendo este aumento global del riesgo en gran parte atribuible a un riesgo dos veces mayor de infarto de miocardio.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos llevaron, tanto a la FDA (*Food and Drug Administration*) como a la EMA (*European Medicines Agency*), a recomendar la suspensión de Bextra® (valdecoxib) y colocar una advertencia de seguridad (*black box warning*) en las fichas informativas advirtiendo del riesgo de efectos adversos cardiovasculares en todos los AINEs excepto la aspirina, la FDA, y en los coxibs pero no en los AINEs tradicionales, la EMA (Patrono y Rocca 2009). Actualmente, en España, existen dos coxibs orales: celecoxib (Artilog®, Celebrex®, Onsenal®) y etoricoxib (Arcoxia®, Exxiv®), y un coxib parenteral: parecoxib (Dynastal®), profármaco de valdecoxib en el mercado (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios AEMPS - Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA)).

- **Bases biológicas de la cardiotoxicidad**

Debido a las funciones biológicas opuestas del TxA₂: proagregantes plaquetarios, y de la PGI₂: antiagregantes plaquetarios, el concepto de un equilibrio entre ambos para el mantenimiento de la salud cardiovascular, fue propuesto por primera vez hace más de 30 años (Bunting y cols. 1983; Fitzgerald y cols. 1987; Moncada y cols. 1976). Vane dijo: "un equilibrio entre la cantidad de TxA₂ formados por plaquetas y de PGI₂ formada por los vasos, podría ser crítico para la formación de trombos" (Moncada y cols. 1976).

Es bien sabido que la isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en las plaquetas y es responsable de la formación TxA₂. En cambio, la síntesis de PGI₂ en

las células endoteliales está catalizada principalmente por la COX-2 (McAdam y cols. 1999).

Los AINEs tradicionales reducen la inflamación inhibiendo la COX-2 y temporalmente la agregación plaquetaria mediante la reducción de síntesis de TxA₂ a través de la inactivación incompleta y reversible (excepto en el caso de la aspirina) de la COX-1. Ambos mecanismos podrían traducirse en una reducción del riesgo cardiovascular (Patrono y cols. 2004; Ross 1999).

Actualmente, en base a distintos experimentos y ensayos clínicos, se propone que el mecanismo por el que la inhibición de la COX-2 aumenta el riesgo cardiovascular, consistiría en una disminución de la producción vascular de PGI₂ sin un cambio en los niveles de TxA₂. Esta descompensación en el equilibrio hemostático conduciría a un estado que predispone a trombosis, hipertensión y aterosclerosis (FitzGerald y Patrono 2001; Gurwitz y cols. 1994; Johnson 1997; Patrono y cols. 2004) (Figura 10).

No obstante, considerando las afinidades relativas de los coxibs por la COX-1 y la COX-2 (FitzGerald y Patrono 2001) y el hecho de que los AINE sin riesgo cardiovascular son también inhibidores COX-2 con diferente selectividad para COX-1 o COX-2, esta explicación no parece completamente coherente (Warner y Mitchell 2008). Por lo tanto, otros mecanismos podrían estar contribuyendo a la toxicidad cardíaca asociada con estos compuestos.

VI. LA PASTILLA DE LA FELICIDAD: FLUOXETINA

La fluoxetina (Lilly 110140) fue introducido por Eli Lilly & Co. como Prozac[®] en 1988 (Wong y cols. 1974) (Figura 12).

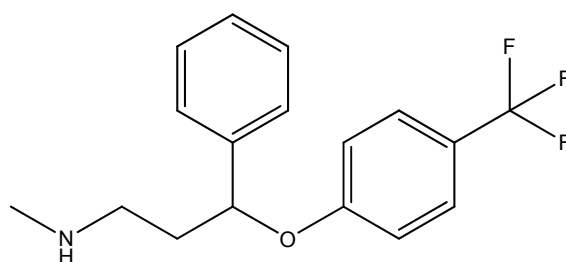


Figura 12: Estructura química de la fluoxetina (N-metil-3-(*p*-trifluorometilfenoxi)-3-fenilpropilamina).

Las acciones antidepresivas, antiobsesivas-compulsivas, y antibulímicas de la fluoxetina se sugiere que están ligadas a la inhibición de la captación neuronal de la serotonina del SNC. Estudios en humanos a dosis clínicamente relevantes han demostrado que la fluoxetina también bloquea la recaptación de serotonina en las plaquetas humanas (FDA Fluoxetine Hydrochloride Approved Labeling Enclosure, NDA 18-936/S-064)

La principal ventaja que tenía la fluoxetina sobre los antidepresivos disponibles anteriormente era un perfil de seguridad más favorable (Anderson 2000; Peretti y cols. 2000). Los antidepresivos tricíclicos clásicos antagonizaban los receptores muscarínicos, histaminérgicos y α_1 -adrenérgicos, mecanismo que se ha asociado con sus efectos anticolinérgicos, sedantes y cardiovasculares. La fluoxetina se une a estos receptores de membrana con mucha menos afinidad que los antidepresivos tricíclicos. Esto permitió que alcanzara una popularidad sin precedentes.

El mantenimiento de una correcta neurotransmisión depende en gran medida de la precisión en el control de los niveles de 5-HT extracelular. Este proceso es impulsado por el SERT, que pertenece a la familia de transportadores dependientes de Na^+/Cl^- (Launay y cols. 2006). SERT asume la captación de la 5-HT extracelular a través de la membrana de las células neuronales y no neuronales, tales como las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe, las plaquetas o las células enterocromafines.

El perfil farmacológico de un ISRS consiste en provocar una potente desinhibición de la neurotransmisión serotoninérgica, lo que mediaría los efectos antidepressivos de estos compuestos, mediante el bloqueo del SERT. Este bloqueo hace que la cantidad de 5-HT en la hendidura sináptica aumente, principalmente en el área somatodendrítica de las neuronas serotoninérgicas; por consiguiente, la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas se inhibe y disminuye la liberación de 5-HT (Sghendo y Mifsud 2012). Con la administración crónica de los ISRS, el aumento sostenido de 5-HT provoca la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos (Fabre y cols. 2000; De Montigny y cols. 1992). Una vez que estos receptores se han desensibilizado, el flujo del impulso neuronal ya no es tan fácilmente inhibido, lo que provoca un aumento de la liberación de 5-HT de las terminales axónicas. El retraso en la producción del aumento de 5-HT en las terminales axónicas se sugiere que es la razón por la que existe un retraso en el inicio de la acción de estos fármacos.

Fluoxetina y riesgo cardíaco

Se han llevado a cabo diferentes ensayos clínicos y estudios epidemiológicos que han evaluado los efectos cardiovasculares de los ISRS, sin embargo, los resultados no son concluyentes. Existen estudios que sugieren un efecto preventivo de estos compuestos, principalmente atribuible al efecto inhibitorio que los ISRS tienen sobre la activación plaquetaria mediada por la serotonina (Sauer y cols. 2001). Otros autores no han encontrado un efecto significativo de estos compuestos a nivel cardiovascular (Meier y cols. 2001) e incluso hay estudios que los asocian con un mayor riesgo cardíaco. Existen casos clínicos de función plaquetaria anormal en asociación con la administración de fluoxetina (Alderman y cols. 1992; Gunzberger y Martinez 1992), y se ha descrito una leve bradicardia durante el tratamiento crónico con diferentes ISRS (fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina) (Pacher y Kecskemeti 2004; Pacher y cols. 1999).

Como se ha comentado anteriormente, la 5-HT es capaz de activar diferentes receptores (14), siendo uno de ellos el receptor 5-HT_{2B}, por el que tiene una gran afinidad ($K_i = 4 - 12.6$ nM (Andrade y cols. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{2B} receptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB))). Un bloqueo de SERT podría provocar un aumento de la 5-HT circulante hasta niveles suficientemente altos como para activar el receptor, pudiendo llegar a provocar los efectos adversos asociados al mismo.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que la fluoxetina es capaz de activar directamente los receptores 5-HT_{2B} en astrocitos (Kong y cols. 2002; Li y cols. 2008; Zhang y cols. 2010). Li y cols. encontraron que, en realidad, su afinidad es lo suficientemente alta ($K_i = 5$ μ M (Rothman y cols. 2000)) como para que la fluoxetina administrada a dosis terapéuticas sea capaz de activar estos receptores (Li y cols. 2009; Li y cols. 2008).

Ya en el año 1993, Zhan y cols. describieron los efectos directos de la fluoxetina en la concentración de calcio libre citosólico ($[Ca^{+2}]_i$) y en la glucogenolisis en los astrocitos, que se sabía que expresaban receptores de serotonina. Sin embargo, asociaron estos efectos a una acción agonista sobre el receptor 5-HT_{1C} (Zhang y cols. 1993). Posteriormente, Sandén y cols. demostraron, mediante estudios inmunohistoquímicos y funcionales, la expresión de receptores 5-HT_{2B} en astrocitos en cultivo primario de tres regiones diferentes de cerebro de rata. En su estudio observaron que cuando los astrocitos eran estimulados con un agonista más selectivo del receptor 5-HT_{2B}, α -metil-5-HT, las células respondían con un aumento transitorio de $[Ca^{+2}]_i$, que era bloqueado por la rauwolscina, antagonista selectivo del 5-HT_{2B} (Sandén y cols. 2000). En el 2002, Kong y cols. demostraron que, durante un periodo de tratamiento similar al requerido para obtener respuesta clínica a fluoxetina, la glucogenolisis mediada por el receptor 5-HT_{2B}, era atenuada inicialmente e incrementada posteriormente. Asimismo, comprobaron que la fluoxetina se comportaba como un agonista de este receptor, desplazando la unión específica de [³H]-mesulergina.

Más recientemente, Li y cols. se plantearon identificar el subtipo de receptor 5-HT₂ involucrado en el aumento de [Ca⁺²]_i y la fosforilación de las ERK_{1/2} observados tras la administración de fluoxetina llegando a la conclusión, mediante diferentes experimentos con antagonistas, que ésta, en astrocitos diferenciados, actúa exclusivamente en los receptores 5-HT_{2B} (Li y cols. 2008).

Estos autores proponen que dado que la fluoxetina se comporta como un agonista de los receptores 5-HT_{2B} a las dosis terapéuticas, la única razón por la que, a estas concentraciones, no se hayan observado los efectos mediados por este receptor en la periferia, puede ser su alto grado de unión a proteínas (Li y cols. 2008).

Asimismo, existe un número creciente de informes de casos de distintas reacciones adversas cardiovasculares asociadas con el tratamiento con fluoxetina y su sobredosis: arritmias cardíacas, tanto bradicardia (Friedman 1991; Gardner y cols. 1991), como taquicardia (Gardner y cols. 1991; Neely 1998), e incluso cardiotoxicidad, medida como prolongación del intervalo QRS (Graudins y cols. 1997). No obstante, debe tenerse en cuenta que hay estudios en los que el tratamiento con fentermina y fluoxetina no se asoció con lesiones valvulares cardíacas (Whigham y cols. 2007).



MATERIAL Y MÉTODOS



I. ANIMALES

En este trabajo se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela con un peso comprendido entre 250 y 300 g. Todos los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato de fondo sólido, con acceso libre a comida y agua (dieta estándar de laboratorio), en una habitación silenciosa, a una temperatura constante de 22 ± 1 °C y un ciclo de 12 h de luz (8:00 – 20:00 h).

Los animales fueron manipulados respetando las normas internacionales y los acuerdos del Consejo de Europa sobre experimentación animal aplicada recogidos en la Directiva del 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) y regulados en España por el Real Decreto del 10 de octubre de 2005 (1201/2005/BOE) y en la Comunidad Autónoma de Galicia por el Decreto del 30 de diciembre de 2008 (296/2008/DOG) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, normativas vigentes en el momento de la realización de los procedimientos. Los protocolos experimentales utilizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela.

II. ESTUDIOS FUNCIONALES *EX VIVO*

Los estudios funcionales buscan evaluar una determinada respuesta inducida por el fármaco sobre el organismo entero o sobre un órgano o tejido. La utilización de las técnicas de órgano aislado *in vitro* permite una simplificación del reactivo biológico eliminando las respuestas reflejas y de tipo hormonal que caracterizan los ensayos *in vivo*, al tiempo que consigue cuantificar la concentración del fármaco que accede a la biofase. De este modo, se pueden conocer y modificar las condiciones de incubación del preparado tisular en los distintos protocolos experimentales.

Como se ha comentado en la Introducción, el ARNm del receptor 5-HT_{2B} se encuentra ampliamente distribuido en tejidos periféricos como el corazón,

endotelio vascular, tejido adiposo, intestino, ovarios, testículos, hígado, riñón, estómago, páncreas, etc., lo que sugiere un importante papel de este receptor en la periferia (Kursar y cols. 1994). El fundus de estómago de rata es el tejido de elección para estudiar actividad serotoninérgica, desde que Vane en 1957 describió que esta preparación era muy sensible a la 5-HT.

Estudios de receptores 5-HT_{2B} en fundus de estómago aislado de rata

- **Preparación del tejido**

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de peso comprendido entre 250-300 g, sacrificadas mediante anestesia con CO₂ y posterior decapitación.

El estómago se diseccionó rápidamente y el fundus (parte superior del estómago, de color grisáceo, perfectamente distinguible del área inferior de color rosado) se dividió en cuatro tiras según el método descrito por Vane en 1957 (Vane 1957), obteniéndose generalmente segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de cada animal (Figura 13). Cada uno de ellos se colocó en un pocillo de baño de órganos conteniendo 20 ml de solución Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂·2H₂O 1.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 y glucosa 11) gasificada continuamente con carbógeno (95 % O₂, 5 % CO₂) y mantenida a una temperatura de 37 °C.

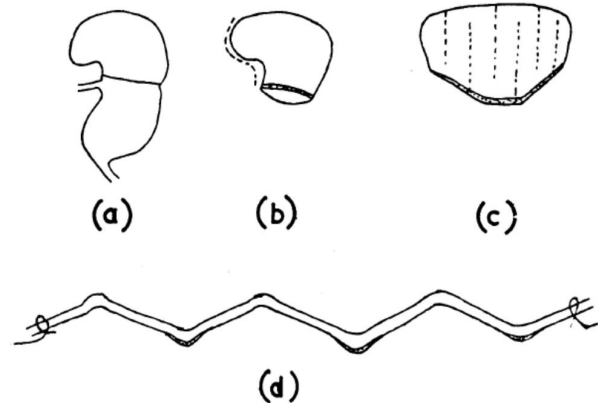


Figura 13: Diagrama que muestra el método de corte de la tira fúndica (Vane 1957). (a) Todo el estómago. (b) El fundus, parte superior del estómago, con una delgada banda de tejido pilórico, se corta a lo largo de la línea punteada. (c) El fundus, abierto en una placa de Petri, se corta mediante cortes alternativos en lados opuestos del músculo. (d) La tira que se obtiene se divide en segmentos de aproximadamente 1cm de longitud. (Tomada de Vane 1957).

- **Estudio de la potencia y eficacia**

Los tejidos se sometieron a una tensión de 2 g y se lavaron cada 15 min durante 1 h. Una vez estabilizados se adicionó a cada tejido una concentración 60 mM de KCl, que se eliminó al cabo de 10 min mediante el lavado de las preparaciones con Krebs. Tras 1 h de estabilización y renovación de la solución del pocillo cada 15 min, se realizó una primera curva concentración-respuesta acumulativa (CCRA) con el agonista 5-HT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), celecoxib (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK), valdecoxib (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK) o fluoxetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Estas curvas fueron realizadas por el método de las dosis acumulativas (Van Rossum 1963).

En el caso del estudio del efecto de los distintos compuestos sobre la respuesta promovida por 5-HT, tras la construcción de la CCRA de 5-HT (Figura 10) y los posteriores lavados cada 15 min durante 1 h, se incubaron los distintos compuestos a estudiar: valdecoxib, celecoxib y fluoxetina a las distintas

concentraciones ensayadas, Rauwolscina (3×10^{-7} M) y/o Ác. Aristolóquico (10^{-5} M) durante 30 min. Posteriormente a la incubación, una CCRA de 5-HT fue construida con el fin de estudiar el efecto de los compuestos en la respuesta contráctil inducida por el agonista 5-HT en el órgano (Figura 14).

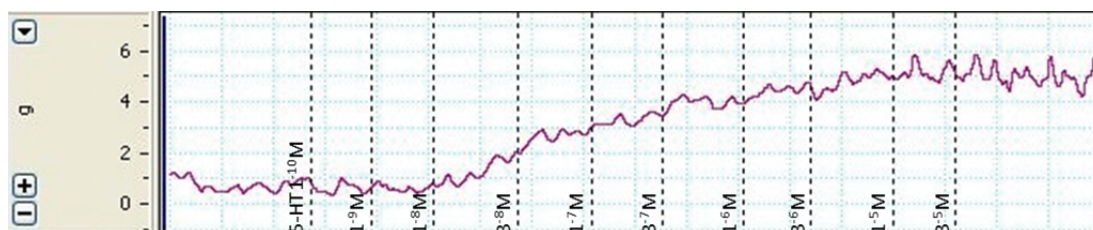


Figura 14: Registro representativo resultante de la adición acumulativa de concentraciones crecientes de 5-HT en fundus de estómago de rata.

• Análisis de datos

Para la medida de las contracciones isométricas se utilizaron transductores de desplazamiento de fuerza Grass FTO3C conectados a un sistema PowerLab 8/30. Los resultados se adquirieron con el software LabChart 6.0 y el ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.), seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

Una vez comprobado que la E_{\max} de la 5-HT se corresponde con el 98-100 % de la tensión máxima alcanzada en el priming con KCl 60mM, la representación de las CCRA se realizó de modo porcentual con respecto a la curva inicial de 5-HT en cada tejido, asignándosele a la tensión máxima alcanzada el valor de 100%.

Se calculó:

- E_{\max} del agonista: Respuesta contráctil máxima del tejido inducida por el agonista.
- EC_{50} del agonista: Concentración de agonista necesaria para inducir el 50 % de la respuesta máxima.

- pK_B del antagonista: Medida de la potencia del antagonista (Baxter y cols. 1994). La constante de disociación K_B se calculó según la fórmula:

$$K_B = \frac{[B]}{\frac{EC_{50} \text{ presencia}}{EC_{50} \text{ ausencia}} - 1}$$

Donde [B] es la concentración de antagonista utilizada.

III. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela con un peso comprendido entre 250 y 300 g. Todos los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato de fondo sólido, con acceso libre a comida y agua (dieta estándar de laboratorio) a lo largo del tratamiento, en una habitación silenciosa, a una temperatura constante de 22 ± 1 °C y un ciclo de 12 h de luz (8:00 – 20:00 h).

Tratamiento 5-HT (7 días)

Con el objetivo de poner a punto la metodología necesaria para la realización de tratamientos de 21 días con celecoxib o fluoxetina en ratas Sprague-Dawley, así como la tecnología necesaria para el procesado de muestras y los distintos ensayos se realizó un tratamiento previo con 5-HT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) durante 7 días.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: tratadas (n=6) y control (n=6). Los animales del grupo tratadas recibieron inyecciones diarias de 5-HT en agua estéril, por vía subcutánea (75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces) durante 7 días en un volumen de 0.1 ml/10 g entre las

08:30 y las 10:30 h. Los animales del grupo control recibieron inyecciones diarias de la solución vehículo (agua estéril) en un volumen de 0.1 ml/10 g. La dosis de 5-HT fue seleccionada en base a los valores utilizados en trabajos previos (Elangbam y cols. 2008) .

Los animales se sacrificaron 24 h después de la última administración por decapitación tras anestesia con CO₂. De las 12 ratas, 11 (cinco ratas control y seis tratadas) se utilizaron para la cuantificación de 5-HT plasmática y los distintos estudios histológicos y funcionales.

Tratamiento celecoxib (21 días)

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: tratadas (n=12) y control (n=12). Los animales del grupo tratadas recibieron inyecciones diarias de celecoxib (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK) en solución salina (NaCl 0.9 %) con 0.5 % de carboximetilcelulosa, por vía intraperitoneal (30 mg/kg/día) durante 21 días en un volumen de 0.1 ml/10 g entre las 08:30 y las 10:30 h. Los animales del grupo control recibieron inyecciones diarias de la solución vehículo (0.5 % de carboximetilcelulosa en solución salina) en un volumen de 0.1 ml/10 g. La dosis de celecoxib fue seleccionada en base al rango de dosificación entre la mínima y máxima dosis eficaz en el “*paw swelling test*” que sería 10-50 mg/kg/día (Niederberger y cols. 2001).

Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración por decapitación tras anestesia con CO₂. Todas las ratas se utilizaron para la cuantificación de 5-HT plasmática y los distintos estudios histológicos y funcionales.

Tratamiento fluoxetina (21 días)

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: tratadas (n=12) y control (n=12). Los animales del grupo tratadas recibieron inyecciones diarias de fluoxetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), en solución salina (NaCl 0.9 %) por vía

intraperitoneal (10 mg/kg/día) durante 21 días en un volumen de 0.1 ml/10 g entre las 08:30 y las 10:30 h. Los animales del grupo control recibieron inyecciones diarias de la solución vehículo (solución salina) en un volumen de 0.1 ml/10 g. La dosis de fluoxetina fue seleccionada en base a las dosis efectivas en tratamientos crónicos previamente descritas (File y cols. 1999; Jones y cols. 2002; Qu y cols. 2009; Qu y cols. 2006).

Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración por decapitación tras anestesia con CO₂. Todas las ratas se utilizaron para la cuantificación de 5-HT plasmática y los distintos estudios histológicos y funcionales.

Determinación de los niveles plasmáticos de 5-HT

Las ratas se anestesiaron con CO₂ antes de ser sacrificadas por decapitación y se recogió sangre de los vasos del cuello en tubos Vacutainer® de vidrio que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los tubos se centrifugaron a 200 g durante 10 min a 25 °C. El plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido se centrifugó de nuevo a 4500 g durante 10 min a 4 °C para obtener plasma libre de plaquetas (PLP). El PLP se alícuotó y las alícuotas se congelaron (-20 °C) hasta su uso en el ensayo de cuantificación.

Una vez recogidas todas las muestras de cada tratamiento respectivamente, se llevó a cabo la cuantificación de 5-HT mediante el kit *Serotonin ELISA* (IBL International, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento de ensayo sigue el principio básico de los ELISAs competitivos, donde existe competencia entre el antígeno biotinilado y el no biotinilado por un número fijo de sitios de unión. La cantidad de antígeno biotinilado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno biotinilado libre se elimina con una etapa de lavado y el antígeno biotinilado unido al anticuerpo se determina empleando estreptavidina fosfatasa alcalina como marcador y p-nitrofenil fosfato como sustrato.

- **Análisis de datos**

La cuantificación se logra por comparación de la actividad enzimática de la muestra desconocida con una curva de respuesta preparada con estándares conocidos.

La DO (densidad óptica) de los estándares (eje-y, lineal) se representan frente a su concentración (eje-x, logarítmico). El ajuste, regresión logística de 4 parámetros, se realizó utilizando el programa XLfit™ v3.0.5 (IDBS, Surrey, UK):

$$DO = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{10^{\log EC_{50}}}{x} \right)^C}$$

Donde A se correspondería con la asíntota inferior (valor mínimo de Y), B con la asíntota superior (valor máximo de Y) y C con la pendiente de la curva.

La concentración de las muestras de los distintos grupos de ratas se extrapoló de la curva estándar.

Estudios de receptores 5-HT_{2B} en fundus de estómago aislado de rata

Para determinar los efectos del tratamiento sobre los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago aislado de rata, se construyeron CCRA de 5-HT en tejido de las ratas control (12) y ratas tratadas (12) simultáneamente, siguiendo el protocolo descrito anteriormente,

Análisis histológico de las válvulas cardíacas

La morfología valvular se evaluó en muestras de corazón seccionadas en un plano frontal. Una vez anestesiadas con CO₂, las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajo el corazón y, tras 1 h en formol, las muestras se seccionaron con una matriz HSR002-2 (Zivic Instruments, Pittsburgh, USA).

Con ayuda de un procesador Shandon Citadel 2000® (en el que cada contenedor tiene un volumen de 2400 ml), cada sección fue fijada en 10% formalina tamponada (tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4) y se embebió en parafina siguiendo los protocolos de rutina (Fijación en formalina: formalina 5h, formalina 5h. Deshidratación en etanol al 70° 1 h, etanol 96° 1 h, etanol 100° 1 h, etanol 100° 2 h, etanol 100° 2 h. Aclarado en xileno: xileno 1 h, xileno 30 min, xileno 30 min. Inclusión en parafina: parafina a 60 °C 2 h, parafina a 60 °C 2 h). La duración total del procedimiento es de 23 h (Figura 15).

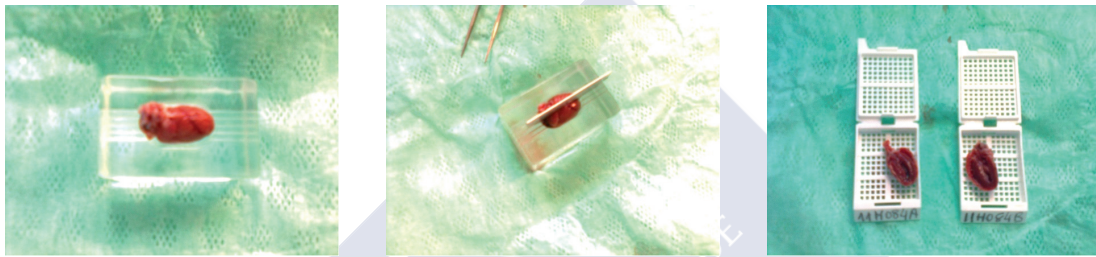


Figura 15: Preparación del corazón para su fijación en formalina.

Una vez obtenidos los bloques de parafina se cortaron secciones seriadas con un microtomo Minot (Microm HM350S®) a 4 μ m y se dividieron en distintos grupos a los que se aplicaron distintas tinciones para así poder confirmar los hallazgos encontrados.

Parte de las mismas, se procesaron para evaluar la morfología de la válvula con la técnica de Hematoxilina-Eosina: Desparafinado: xileno 3 min, xileno 3 min, xileno 3 min. Hidratación con alcoholes en concentración creciente: etanol 100° 3 min, etanol 100° 3 min, etanol 96° 3 min, etanol 96° 3 min, lavado en agua corriente. Tinción con hematoxilina (estructuras ácidas en tonos azul y púrpura) 3 min, lavado en agua corriente. Tinción con eosina (componentes básicos en tonos rosa) 2 min, lavado en agua corriente. Deshidratación con alcoholes en concentración decreciente y aclarado en xileno: etanol 96°, etanol 96°, etanol 100°, etanol 100°, xileno, xileno, xileno, dando 10 pases en cada cubeta. Montaje para microscopía con medio Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemania).

Otra serie de muestras se procesaron para determinar la cantidad de colágeno y la presencia de fibrosis mediante tinción con tricrómico de Masson: Desparafinar e hidratar siguiendo el protocolo descrito con anterioridad. Tinción con hematoxilina 3 min, lavado en agua corriente. Tinción con Masson rojo 5 min, lavado en agua corriente. Tratamiento con ácido fosfomolibdico 6 min, lavado en agua corriente. Tinción con azul de anilina 2 min, lavado en agua corriente. Deshidratar, aclarar y montar tal y como se describió para la técnica de hematoxilina-eosina.

Por último, algunas muestras se utilizaron para evaluar el contenido de GAGs y ácido hialurónico, a través del colorante azul de toluidina, que presenta el fenómeno de metacromasia (vira a púrpura) al contacto con la sustancia fundamental del tejido conjuntivo. Para ello se desparafinó e hidrató, se tiñó con azul de toluidina 5 min, se lavó con agua corriente y se hidrató, aclaró y montó como se ha descrito previamente.

Una vez teñidas, las secciones se observaron y fotografiaron con un microscopio Olympus Provis AX70 (Figura 16).

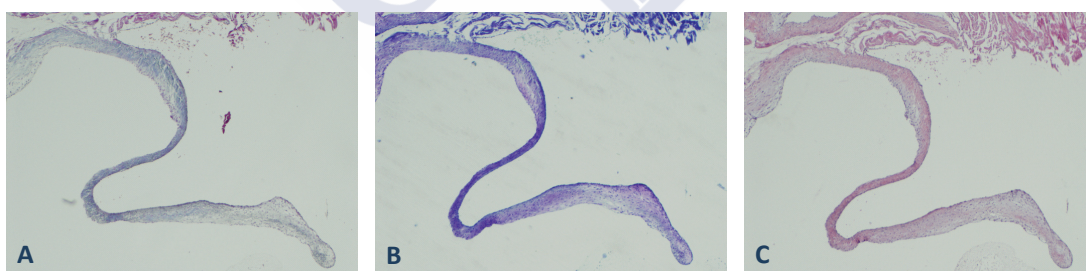


Figura 16: Válvula mitral de rata teñida utilizando distintas tinciones. (A) Tricrómico de Masson, (B) Azul de toluidina, (C) Hematoxilina-Eosina.

Los hallazgos histológicos fueron primero evaluados de forma independiente por tres observadores, llegándose posteriormente a un consenso tras una evaluación conjunta. Los parámetros estudiados fueron: irregularidad del contorno,

engrosamiento de la válvula, densidad celular y depósitos de GAG nodulares y difusos.

Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas se corresponden con un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos, reacción visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

Se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas tanto en fundus gástrico de rata como en corazón de rata, previamente fijados en formalina y embebidos en parafina. Los tejidos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de conejo anti-5HT_{2B}R (1:2000 Abcam, Cambridge, UK). Con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica se utilizó como sistema de detección un polímero de alto peso molecular: dextrano (EnVision®, policlonal de Dako, Glostrup, Dinamarca), conjugado con inmunoglobulina (Ig) anti-conejo y con peroxidasa (Figura 17). Con este método evitamos el uso de la estreptavidina y nos aseguramos que lo que estamos detectando no es biotina endógena. El cromógeno utilizado para el revelado fue diaminobencidina (DAB). En todos los casos se incluyeron controles negativos, en los que se sustituyó el anticuerpo primario por PBS 0.1 M (pH 7.2).

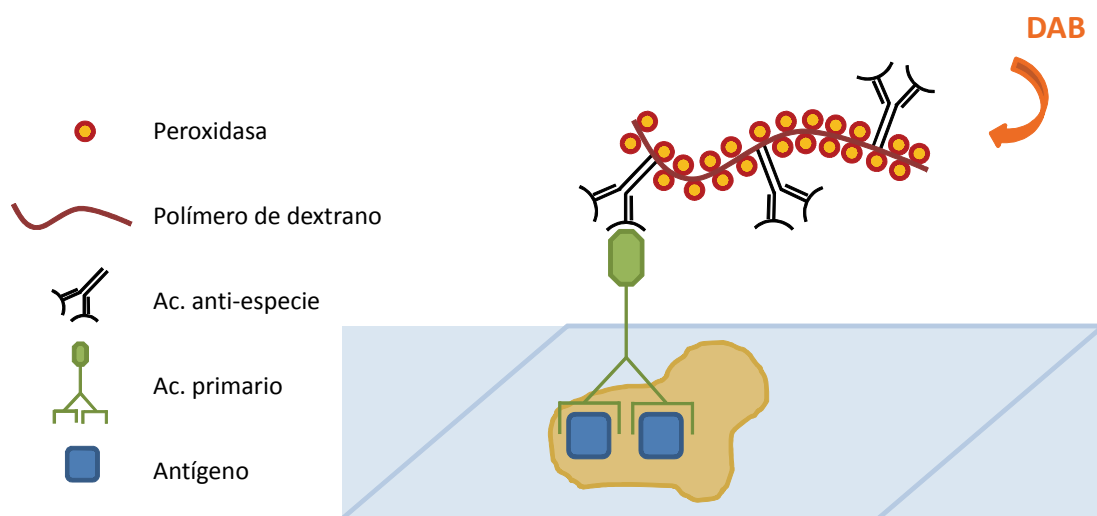


Figura 17: Representación esquemática del método de polímeros de dextrano (EnVision®).

IV. CULTIVO CELULAR

En la elaboración del presente trabajo se ha utilizado la línea celular CHO-K1 5-HT_{2B} (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA). Esta línea celular procede de células de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary) y fue transfectada con un gen que codifica el receptor de interés. Además, se incluyó un gen de resistencia a antibiótico (geneticina) que garantiza, incluyendo este antibiótico en el medio de cultivo, la selección de las células en las que la transfección fue positiva.

El medio de cultivo utilizado se componía de Advanced DMEM-F12 suplementado con 1 % FBS dializado, 0.4 mg/mL G418, 4 mM L-Glutamina, 0.1 % Penicilina-Estreptomicina.

Los pasos de los que consta el cultivo celular son: Descongelación, cambio de medio, expansión, congelación y siembra.

Descongelación

Se realizó a partir de un vial de células congeladas en nitrógeno líquido. La alícuota se descongeló lo más rápidamente posible en un baño a 37 °C y se resuspendió en 10 mL de medio completo para evitar la acción del DMSO. Se

centrifugó a 1000 rpm durante 8 min, descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 2 mL de medio completo y se sembró en una placa de 150 mm de diámetro en la que previamente se habían adicionado 15 mL de medio completo. La placa se rotuló indicando el tipo de células sembradas, el receptor, el pase (número de veces que han sido tripsinizadas) y la fecha.

La placa se mantuvo en un incubador celular a una temperatura de 37 °C, en condiciones de humedad (95 %) y oxigenación (95 % O₂, 5 % CO₂) adecuadas.

Cambio de medio

El medio de cultivo lleva incorporado rojo fenol como indicador de pH, de forma que, cuando el color del medio viró de rojo a anaranjado se procedió a su sustitución. Se aspiró el medio con una pipeta Pasteur de rama corta y se añadieron 16 mL de medio completo nuevo, previamente atemperado a 37 °C.

Expansión

Se dice que una placa está a confluencia cuando toda su base esta tapizada de células formando una monocapa. El stock se mantuvo siempre por debajo del 80 % de confluencia, haciendo subdivisiones cada dos o tres días en las que se diluían las células entre 5 y 10 veces.

Para ello se aspiró el medio de la placa madre, se lavó con 10 mL de PBS (en mM: NaCl 136, KH₂PO₄ 1.47, NaH₂PO₄ 8, KCl 2.68) para eliminar los restos de medio y, tras aspirar éste, se incubó la placa con 2.5 mL de tripsina durante 2 min. Transcurrido este tiempo se golpeó suavemente la base de la placa para favorecer la separación de las células y se adicionaron 10 mL de medio para neutralizar el enzima y frenar el proceso de tripsinización. Posteriormente se tomaron los mL necesarios de esta suspensión para hacer la dilución requerida y se pasaron a nuevas placas, rotuladas previamente aumentando en una unidad el número de pase anterior. En todas las placas se añadió el medio de cultivo completo necesario y se llevaron al incubador.

Congelación

Se realizó una tripsinización siguiendo los mismos pasos descritos en la expansión, pero en este caso, la suspensión celular se pasó a tubos Falcon® de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm durante 8 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 1.5 mL de medio de congelación (medio de cultivo completo + 10 % DMSO), se traspasó a un criovial y se congeló gradualmente utilizando un Mr. Frosty (Nalgene, Rochester, USA).

Siembra

Tras tripsinizar y centrifugar las células tal y como se ha descrito anteriormente, el pellet se resuspendió en 1.1 mL de medio y se preparó la dilución de contaje: 0.1 mL suspensión celular, 0.1 mL Trypan blue, 0.3 mL medio completo. El contaje de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer contando al menos 4 de los campos. El recuento de células se calculó según la fórmula:

$$N = c \times FD \times A$$

Donde N es el número total de células/mL, c es la media del recuento por campo, FD es el factor de dilución (en nuestro caso: 5) y A es el factor de corrección de la cámara (en cámara Neubauer: 10000).

Una vez conocida la concentración de células, se realizó la dilución necesaria para poder sembrar el número de células por pocillo requeridas en cada caso (volumen final: 100 µL/pocillo) y se sembró con ayuda de una pipeta de repetición, homogeneizando la suspensión periódicamente.

Preparación de membranas

Con el fin de su utilización en los ensayos de unión de radioligandos, se preparó un lote de membranas 5-HT_{2B}. Las membranas se prepararon a partir de placas de células CHO-K1 5-HT_{2B} a confluencia.

Se aspiró el medio de cultivo y se lavó la placa dos veces con 10 mL de PBS enfriado en hielo, se añadieron 8 mL de PBS y se rascaron bien las células con una espátula de goma, aspirando la suspensión celular obtenida a tubos de centrifuga colocados sobre hielo picado, se lavó la placa con 2 mL más de PBS para asegurar que se arrastran todas las células. Se sedimentaron por centrifugación a 1500 *g* durante 3 min a 4 °C. Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce (Kontes Glass Co., Vineland, NJ) en tampón A (en mM: Tris-HCl 15, MgCl₂ 2, EDTA 0.3, EGTA 1, pH = 7.5), a 4 °C. El homogeneizado se centrifugó a 40000 *g* durante 25 min a 4 °C, y el pellet resultante se resuspendió en tampón A y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente el pellet resultante se resuspendió en tampón B (en mM: Tris-HCl 50, MgCl₂ 10, EDTA 0.5, sacarosa 10 %, pH = 7.5). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Alemania), con albúmina sérica bovina, BSA, como estándar.

V. ESTUDIOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS

Dada su aplicabilidad a la gran mayoría de sistemas de neurotransmisores y hormonas, los estudios de unión de radioligandos, son una importante herramienta para la caracterización farmacológica de los receptores, posibilitando la cuantificación de receptores involucrados en distintos procesos fisiológicos y patológicos así como la evaluación de la afinidad de distintos ligandos por éstos. Los principales parámetros determinados en estos estudios son: densidad de una determinada clase de receptores y constante de afinidad de diferentes ligandos por una determinada clase de receptores.

Dado que éstas son las técnicas de referencia a la hora de caracterizar farmacológicamente un ligando (evaluar su interacción con distintos receptores), se han seleccionado para estudiar la afinidad de los compuestos objeto de estudio en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} humanos transfectados en la línea celular CHO.

Ensayos de linealidad de proteína

En estos ensayos se estudian diferentes concentraciones de proteína con el objetivo de evaluar las distintas relaciones ventana/ concentración de proteína y seleccionar así la cantidad de proteína óptima para la realización de futuros ensayos.

Para determinar la especificidad de la unión del radioligando a los receptores estudiados, los ensayos se llevaron a cabo en presencia de un ligando no tritiado de igual perfil farmacológico pero con una estructura química distinta a la del ligando marcado. Este ligando no marcado competirá con el marcado por el sitio de unión, definiendo así la unión específica. La señal de radioligando remanente tras su completo desplazamiento por el ligando no tritiado corresponderá a uniones inespecíficas: BE=BT-NSB.

Se incubaron distintas cantidades de proteína por pocillo (1.25 – 60 µg/pto) con una concentración equivalente al valor de la constante de disociación del radioligando (K_D), obtenida de bibliografía (Andrade y cols. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{2B} receptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB)), 1 nM [³H]-LSD (84 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) y 10 nM [³H]-5-HT (28.3 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) respectivamente, utilizando 5-HT 50 µM como ligando inespecífico. Las disoluciones se incubaron en un volumen total de 250 µl de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 4 mM, Ác. Ascórbico 1 % pH 7.4) en una placa de polipropileno de 96 pocillos durante 30 min a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se traspasaron 200 µl de la mezcla a una placa MultiScreen_{HTS} con filtros GF/C (Merck Millipore, Billerica, USA) pretratada 24 h antes con PEI 0.5 % y previo al ensayo con tampón de incubación durante 15 min (250 µl/pocillo). Se filtró el contenido realizando 4 lavados con 250 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.4) frío. Los filtros se secaron en estufa durante 1 h a 60 °C adicionándoseles posteriormente 30 µl de líquido de centelleo Universol® (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) para realizar la medida de radioactividad. La radioactividad se midió en un contador Microbeta Trilux (Perkin-Elmer).

- **Análisis de datos**

Se calculó la ventana a cada concentración de proteína siguiendo la fórmula:

$$\text{Ventana} = \frac{\text{BT} - \text{NSB}}{\text{BT}} * 100$$

Y se valoró la relación ventana/ concentración de proteína para seleccionar la cantidad de proteína óptima en el ensayo.

Ensayos de saturación

En los ensayos de saturación se determina la unión específica en el equilibrio a varias concentraciones de radioligando. Los parámetros obtenidos de este tipo de ensayos son el número o la densidad de sitios de unión (B_{max}) y la afinidad del radioligando por el receptor, generalmente expresada por la constante de disociación en el equilibrio (K_D).

Se incubaron 5 μg de proteína por pocillo en el caso de [^3H]-LSD y 40 μg cuando se utilizó [^3H]-5-HT, con 11 concentraciones diferentes del radioligando correspondiente (siempre diluciones 1:2 a partir de una disolución de concentración igual a 10 veces K_D bibliográfica), utilizando 5-HT 50 μM como ligando inespecífico. Las disoluciones se incubaron en un volumen total de 250 μl de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 4 mM, Ác. Ascórbico 1 % pH 7.4) en una placa de polipropileno de 96 pocillos durante 30 min a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se traspasaron 200 μl de la mezcla a una placa MultiScreen_{HTS} con filtros GF/C (Merck Millipore, Billerica, USA) pretratada 24 h antes con PEI 0.5 % y previo al ensayo con tampón de incubación durante 15 min (250 μl /pocillo). Se filtró el contenido realizando 4 lavados con 250 μl de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.4) frío. Los filtros se secaron en estufa durante 1 h a 60 °C adicionándoseles posteriormente 30 μl de líquido de centelleo Universol® (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) para realizar la medida de radioactividad. La radioactividad se midió en un contador Microbeta Trilux (Perkin-Elmer).

- **Análisis de datos**

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.), seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

En los ensayos de saturación la ecuación estándar que define la unión específica del radioligando al receptor describe una hipérbola rectangular:

$$Y = \frac{B_{\max} * x}{K_D + x}$$

Donde x es la concentración de radioligando libre, B_{\max} es la máxima densidad de sitios de unión y K_D es la constante de disociación del radioligando en el equilibrio. Si la K_D es baja, la afinidad del radioligando por el receptor será alta.

Ensayos de competición

Con el fin de validar los parámetros optimizados y la respuesta de las membranas preparadas, se llevaron a cabo ensayos de competición de estándares. En estos ensayos se mide la unión de una concentración de radioligando en presencia de distintas concentraciones del ligando a estudio y se basan en la competición por la ocupación del receptor establecida entre el radioligando y el ligando de interés. Los parámetros obtenidos son la IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50 %*), definida como la concentración del ligando competidor que inhibe el 50 % de la unión específica del radioligando y la K_i , constante de inhibición del ligando competidor que indica la afinidad del ligando por el receptor.

Los ligandos, insolubles en agua, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 10^{-2} M, preparando las siguientes diluciones en tampón de ensayo a partir de ésta, de esta forma la concentración final de DMSO en el ensayo es siempre ≤ 1 %. Se comprobó que la inclusión de un 1 % de DMSO en el ensayo de competición no modificaba ni la unión total ni la unión inespecífica. Los compuestos

a estudiar se incubaron a concentraciones crecientes comprendidas entre 10^{-9} M y 10^{-4} M.

- **Ensayos de competición por la unión a receptores 5-HT_{2A} humanos**

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando membranas previamente preparadas y validadas en el grupo.

Se incubaron 80 μ g de proteína por pocillo con 1 nM [³H]-ketanserina (67 Ci/mmol Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) utilizando metisergida 1 μ M como ligando inespecífico. Los compuestos a estudiar se incubaron a una concentración 10^{-5} M, en un volumen total de 250 μ l de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM pH 7.5) en una placa de polipropileno de 96 pocillos durante 30 min a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se traspasaron 200 μ l de la mezcla a una placa MultiScreen_{HTS} con filtros GF/B (Merck Millipore, Billerica, USA) pretratada 24 h antes con PEI 0.5 % y previo al ensayo con tampón de incubación durante 15 min (250 μ l/pocillo), y se filtró el contenido realizando 6 lavados con 250 μ l de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 6.6) frío. Los filtros se secaron en estufa durante 1 h a 60 °C y se les adicionó 30 μ l de líquido de centelleo Universol® (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) para realizar la medida de radioactividad. La radioactividad se midió en un contador Microbeta Trilux (Perkin-Elmer).

- **Ensayos de competición por la unión a receptores 5-HT_{2B} humanos**

Se incubaron 5 μ g de proteína por pocillo en el caso de [³H]-LSD y 40 μ g cuando se utilizó [³H]-5-HT, con 1 nM de [³H]-LSD o 10 nM de [³H]-5-HT respectivamente, utilizando 5-HT 50 μ M como ligando inespecífico. Los compuestos a estudiar se incubaron a concentraciones crecientes (comprendidas entre 10^{-10} M y 10^{-5} M), en un volumen total de 250 μ l de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 4 mM, Ác. Ascórbico 1 % pH 7.4) en una placa de polipropileno de 96 pocillos

durante 30 min a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo se traspasaron 200 µl de la mezcla a una placa MultiScreen_{HTS} con filtros GF/C (Merck Millipore, Billerica, USA) pretratada 24 h antes con PEI 0.5 % y previo al ensayo con tampón de incubación durante 15 min (250 µl/pocillo). Se filtró el contenido realizando 4 lavados con 250 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 50mM pH 7.4) frío. Los filtros se secaron en estufa durante 1 h a 60 °C adicionándoseles posteriormente 30µl de líquido de centelleo Universol® (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) para realizar la medida de radioactividad. La radioactividad se midió en un contador Microbeta Trilux (Perkin-Elmer).

- **Análisis de datos**

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.), seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

En los ensayos de competición la ecuación que define la competición establecida entre radioligando y ligando competidor por la unión a un solo sitio de unión describe una curva sigmoidea:

$$Y = NSB + \frac{BT - NSB}{1 + 10^{x - \log IC_{50}}}$$

Donde Y es la unión medida en presencia de varias concentraciones de ligando competidor, x es la concentración del ligando competidor, IC₅₀ es la concentración del ligando competidor necesaria para inhibir el 50 % de la unión específica del radioligando, BT es la unión total en ausencia de ligando competidor y NSB es la unión no específica.

La K_i se calcula a partir de la IC_{50} utilizando la ecuación de Cheng y Prusoff (Cheng y Prusoff 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{x}{K_D}}$$

Donde IC_{50} es la concentración de ligando competidor requerida para inhibir el 50 % de la unión específica, x es la concentración del ligando competidor, K_D es la constante de disociación del radioligando y K_i es la concentración de ligando competidor que se unirá a la mitad de sitios de unión en el equilibrio en ausencia de radioligando u otros ligandos competidores. Si la K_i es baja, la afinidad del receptor por el ligando competidor será alta.

En los casos en los que los compuestos no desplazan totalmente al radioligando, se refiere el % de desplazamiento de la unión específica del radioligando a una concentración determinada:

$$\% = \frac{BT - x}{BT - NSB} * 100$$

Ensayos cinéticos de unión de radioligandos

Los ensayos de cinética permiten calcular las constantes de velocidad de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) del complejo radioligando-receptor. Para ello, se determina la cantidad de radioligando unido al receptor en función del tiempo.

- **Cinéticas de disociación**

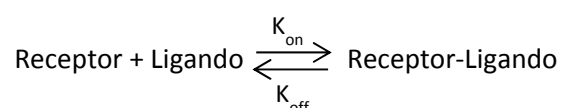
Se incubaron 40 μ g de proteína por pocillo con 10 nM de [3 H]-5-HT, utilizando metisergida 1 μ M como ligando inespecífico. Los compuestos a estudiar se incubaron a 3 concentraciones diferentes (1, 10 y 30 μ M para celecoxib; 0.1, 1 y 10 μ M para valdecoxib y fluoxetina), en un volumen total de 250 μ l de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, $CaCl_2$ 4 mM, Ác. Ascórbico 1 % pH 7.4) en una placa de

polipropileno de 96 pocillos durante 30 min a 4 °C con agitación. Transcurrido este tiempo, una vez alcanzado el equilibrio, se adicionó al medio una nueva dilución de ligando inespecífico, 5-HT 50 μM o metisergida 1 μM respectivamente, a distintos tiempos (0, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32 y 33 min) con el fin de evaluar distintos tiempos de interacción radioligando-receptor (33, 23, 18, 13, 8, 5, 3, 1, y 0 min respectivamente), en un volumen total de 250 μl de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 4 mM, Ác. Ascórbico 1 % pH 7.4) en una placa de polipropileno de 96 pocillos a 37 °C con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se traspasaron 200 μl de la mezcla a una placa MultiScreenHTS con filtros GF/C (Merck Millipore, Billerica, USA) pretratada 24 h antes con PEI 0.5 % y previo al ensayo con tampón de incubación durante 15 min (250 μl/pocillo). Se filtró el contenido realizando 4 lavados con 250 μl de tampón de lavado (Tris-HCl 50mM pH 7.4) frío. Los filtros se secaron en estufa durante 1 h a 60 °C adicionándoseles posteriormente 30 μl de líquido de centelleo Universol® (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) para realizar la medida de radioactividad. La radioactividad se midió en un contador Microbeta Trilux (Perkin-Elmer).

- **Análisis de datos**

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.), seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

Los experimentos cinéticos se utilizan para determinar las constantes de asociación y disociación. Todos los análisis asumen que la unión sigue la ley de acción de masas:



En cualquier momento dado, la velocidad a la que se forman los complejos receptor-ligando es proporcional a la concentración de radioligando y al número de

receptores todavía no ocupados. La constante de disociación (K_{off}) es proporcional a la concentración de complejos receptor-ligando.

Un experimento de disociación mide la velocidad de disociación del radioligando del receptor. Inicialmente se permite llegar a ligando y receptor al equilibrio. En ese punto, es necesario bloquear la unión adicional de radioligando a receptor (en nuestro caso por adición de un ligando no marcado, inespecífico) para que se pueda medir la velocidad de disociación, que sigue un *one phase exponential decay* (decaimiento exponencial de una fase) con una constante de velocidad igual a la constante de disociación del radioligando:

$$Y = ((Y_0 - NSB) * e^{(-K_{off} * x)}) + NSB$$

Donde Y_0 corresponde al valor de Y a tiempo cero y NSB a la unión no específica.

VI. ESTUDIOS FUNCIONALES *IN VITRO*

La activación de los receptores 5-HT_{2B} en su papel de GPCRs conduce a la disociación de la proteína G heterotrimérica y liberación de la subunidad $G\alpha_q$, que a su vez activa la PLC- β . La PLC- β hidroliza los fosfoglicéridos de membrana que contienen en la posición 3 del glicerol un grupo inositol bifosfato, produciendo inositol trifosfato (IP₃) -con la consiguiente movilización de calcio intracelular- y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros (Kursar y cols. 1994; Porter y cols. 1999).

Medida de la formación de inositol fosfatos

La tecnología FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) se basa en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, un donante y un aceptor, cuando ambos se encuentran muy próximos. Así, las interacciones moleculares entre biomoléculas se pueden evaluar mediante el acoplamiento de un marcador

fluorescente a cada una de ellas y la posterior detección del nivel de transferencia de energía.

Cuando dos entidades se acercan lo suficiente la una a la otra, la excitación del donante por una fuente de energía desencadena una transferencia de energía hacia el aceptor, que a su vez emitirá fluorescencia a una longitud de onda dada. El donante y el aceptor pueden ser acoplados covalentemente a múltiples parejas, entre otros, dos proteínas de dimerización, dos hebras de ADN, un antígeno y un anticuerpo o un ligando y su receptor. Debido a estas propiedades espectrales, un complejo donante-aceptor, puede ser detectado sin la necesidad de separación física de los reactivos no unidos. Los ensayos no requieren etapas de separación tales como centrifugación, lavado o filtración.

La tecnología HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence*) combina la tecnología FRET con la medida *time-resolved* de fluorescencia, eliminando así la fluorescencia de fondo, que desaparece rápidamente. Los aceptores HTRF emiten fluorescencia estable en el tiempo cuando participan en un proceso de FRET por lo que, dejando de 50 a 150 μs entre la excitación del sistema y la medida de la fluorescencia, se consigue una señal limpia de todas las emisiones no específicas. Las emisiones medidas con esta tecnología se corresponden únicamente con la transferencia de energía debido a la proximidad de las biomoléculas marcadas.

Recientemente, un nuevo ensayo que utiliza tecnología HTRF para detectar un metabolito de la cascada del IP_3 , el monofosfato de inositol (IP_1), ha superado los inconvenientes de la cuantificación IP_3 (vida media muy corta). El IP_1 se acumula en las células después de la activación del receptor y es estable en presencia de LiCl , por lo que es ideal para la realización de ensayos funcionales en GPCR (Gq) (Figura 18).

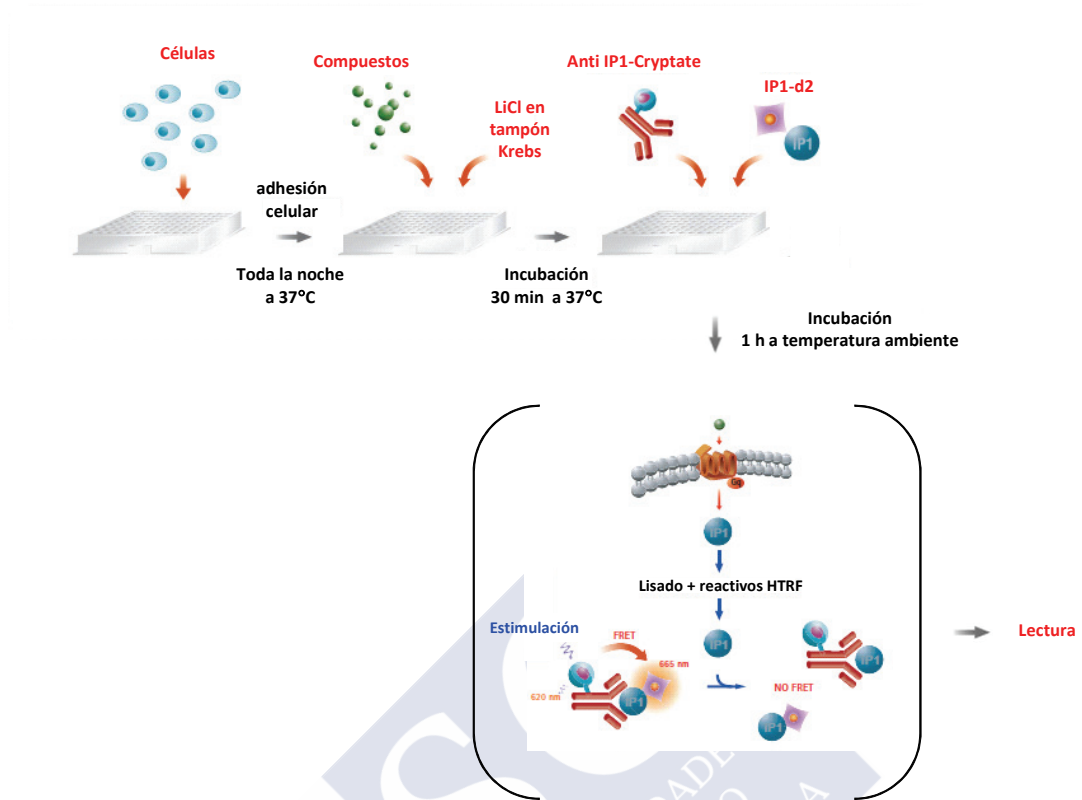


Figura 18: Representación esquemática del ensayo de medida de IP_1 . Modificada de IP-One Assay Principle, Cisbio Bioassays (<http://www.htrf.com/ip-one-htrf-assay>).

La acumulación de IP_1 inducida por los agonistas en las células CHO-K1 5-HT_{2B} se midió por tanto utilizando el kit HTRF IP-One terbium assay kit (CisBio International, Codolet, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante (a menos que se especifique lo contrario). Las células se sembraron 24 h antes del experimento en placas de cultivo blancas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) a una densidad de 30.000 células por pocillo en 100 μ L de medio completo. El día del ensayo, se retiró el medio y se añadieron los compuestos a ensayo disueltos en 70 μ L de tampón de estimulación. Las placas se incubaron a 37 ° C durante 30 min, y la reacción se terminó mediante la adición de 15 μ L del trazador IP1-d2 y 15 μ L del anticuerpo monoclonal anti- IP_1 marcado con criptato de terbio (Tb), disueltos en tampón de lisis. A continuación las placas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente y la señal de HTRF se midió (usando un

protocolo multilabelling y 30 flashes, con $\lambda_{exc} = 320$ nm, $\lambda_{em} = 620, 665$ nm) en un lector Tecan Ultra Evolution (Tecan, Männedorf, Suiza).

- **Análisis de datos**

Los resultados se calcularon a partir de la relación de fluorescencia 665 nm/620 nm, expresada como ratio, de las distintas muestras y el control negativo (blanco del ensayo):

$$\text{Ratio} = \frac{A_{665\text{nm}}}{B_{620\text{nm}}} \times 10^4 \qquad \text{Delta F} = \frac{\text{Ratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100$$

Una vez obtenida la curva estándar del ensayo representando Delta F frente a la correspondiente concentración de IP₁, conociendo el Delta F en cada caso, se pueden extrapolar los valores correspondientes de concentración de IP₁ de las distintas muestras problema.

Medida de la potencia

Se construyeron curvas concentración-respuesta de los distintos compuestos y se utilizó el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.) para analizar los datos, seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

Ecuación “log(agonista) vs respuesta”:

$$E = E_{\text{basal}} + \frac{E_{\text{máx}} - E_{\text{basal}}}{1 + 10^{\log EC_{50} - x}}$$

En estos experimentos los datos se normalizaron considerando el 100 % la respuesta máxima ($E_{\text{máx}}$) obtenida con 5-HT 1 μM en cada caso y el 0 % el valor de estimulación basal.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media \pm eem (en los ensayos de saturación y competición).

Las comparaciones se realizaron mediante t test o ANOVA de una vía utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.). En el caso de los tratamientos farmacológicos, las diferencias histológicas entre los grupos control y tratadas se evaluaron mediante el test chi-cuadrado con el programa SPSS. En todos los casos se fijó un nivel de significación de $P < 0.05$.

VIII. REACTIVOS UTILIZADOS

Además de los distintos reactivos ya citados a lo largo del texto, a continuación se detallan las casas comerciales que suministraron los reactivos utilizados en la preparación de los distintos tampones de ensayo así como las de los reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos.

Reactivos utilizados en la preparación de tampones

Los reactivos Trizma base, ácido L-ascórbico, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , fueron suministrados por Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Los reactivos NaCl, KCl, KH_2PO_4 , glucosa y NaOH fueron suministrados por Panreac (Panreac, Castellar del Vallès, España).

Reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos

Los reactivos farmacológicos ácido aristolóquico, metisergida y metiotepina fueron suministrados por Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). La rauwolscina fue suministrada por RBI (RBI, Massachusetts, USA). A partir de estos reactivos se preparó una solución stock de 10 mM con DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).





RESULTADOS



I. COXIBS: CELECOXIB Y VALDECOXIB

Estudios funcionales *ex vivo*

Se realizaron estudios funcionales en fundus de estómago de rata con el fin de evaluar una posible respuesta inducida por el fármaco sobre el tejido.

- **Celecoxib y valdecoxib no activan por si mismos el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata.**

Se evaluó la potencia de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} en ausencia de otros compuestos y la posible respuesta del tejido a celecoxib y valdecoxib (Figura 19, Tabla 1).

En estos estudios se observa que, mientras que la 5-HT presenta un efecto concentración-dependiente, en el caso tanto del celecoxib como del valdecoxib, sólo se detecta una leve estimulación a concentraciones superiores a 0.1 μ M (8.1 % y 13.9 % del efecto máximo de la 5-HT respectivamente) haciendo imposible calcular la potencia (EC₅₀) de estos compuestos.

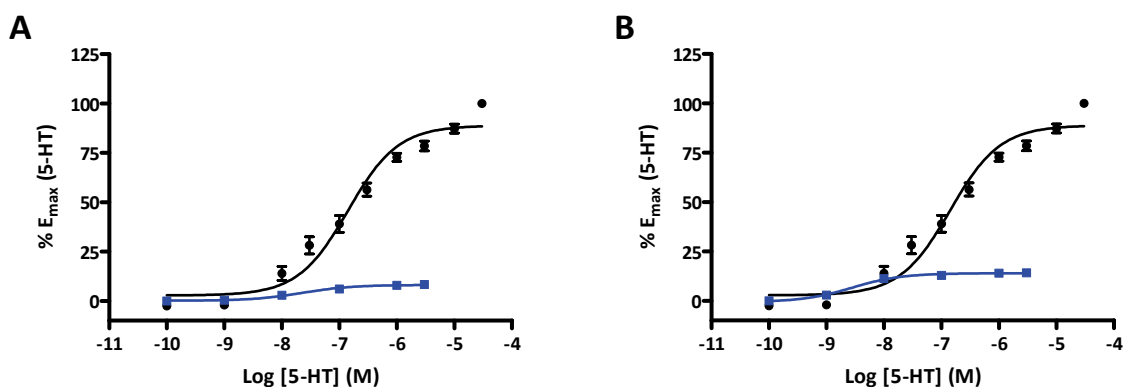


Figura 19: Efectos *in vitro* de celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Curvas concentración-respuesta acumulativas (CCRAs) de 5-HT (●) y del compuesto en estudio (■): (A) celecoxib y (B) valdecoxib. Se representa la media ± eem (barras verticales) de 10 experimentos independientes (n=10); en el caso de las CCRAs de los compuestos se muestra un experimento representativo de un total de 3 experimentos independientes (n=3).

Tabla 1: Potencia (EC₅₀) y eficacia (E_{max}) de 5-HT, celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Los datos muestran la media ± eem de 10 experimentos independientes en el caso de 5-HT y 3 experimentos independientes en el caso de celecoxib y valdecoxib.

	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% E _{max} 5-HT)
5-HT	141 ± 24	99 ± 2
Celecoxib	---	8.1 ± 0,6
Valdecoxib	---	13.9 ± 0.6

• **Celecoxib y valdecoxib modulan el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata.**

Tras comprobar que ambos compuestos por sí mismos no provocan un efecto apreciable en el receptor 5-HT_{2B}, se estudió su influencia en el efecto mediado por 5-HT en estos receptores (Figura 20, Tabla 2).

En ambos casos los compuestos ejercen una modulación indirecta del efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Se observa que, a concentraciones terapéuticas, celecoxib y valdecoxib incrementan tanto la potencia, EC₅₀, como la eficacia, E_{max}, de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata de forma significativa ($P < 0.01$ t test).

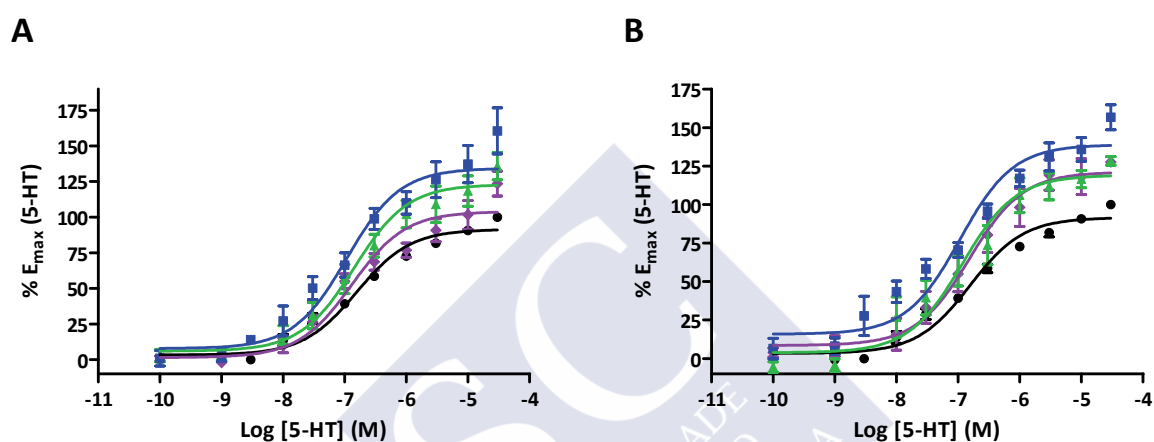


Figura 20: Efectos *in vitro* de celecoxib y valdecoxib sobre la respuesta del receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata inducida por 5-HT. CCRA de 5-HT en ausencia (●) y presencia de distintas concentraciones (0.1 (◆), 0.3 (▲), 1 (■) μM) de: (A) celecoxib y (B) valdecoxib. Se representa la media ± eem (barras verticales) de 4 experimentos independientes (n=4).

Tabla 2: Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib. Los datos representan la media \pm eem de 4 experimentos independientes (n=4). * $P < 0.01$ t test

	EC_{50} (nM)	E_{max} (%) (% E_{max} 5-HT)
5-HT	156 \pm 22	100 \pm 2
5-HT + Celecoxib 0,1 μ M	131 \pm 41	105 \pm 5
5-HT + Celecoxib 0,3 μ M	142 \pm 49	123 \pm 6*
5-HT + Celecoxib 1 μ M	108 \pm 37*	134 \pm 7*
5-HT	156 \pm 22	100 \pm 2
5-HT + Valdecoxib 0,1 μ M	153 \pm 60	121 \pm 7*
5-HT + Valdecoxib 0,3 μ M	116 \pm 41*	119 \pm 6*
5-HT + Valdecoxib 1 μ M	106 \pm 28*	139 \pm 5*

Implicación del ácido araquidónico como mediador de la respuesta contractil de la 5-HT en fundus.

Para estudiar el posible mecanismo implicado en la potenciación observada y determinar si el efecto de estos compuestos viene mediado por su actividad inhibidora de la COX-2, se realizaron CCRA en presencia de ácido aristolóquico, AAr, (inhibidor de la PLA₂) (Figura 21, Tabla 3).

No se observan diferencias significativas en las CCRA de 5-HT en ausencia y presencia de ácido aristolóquico, sin embargo, cuando estas curvas se llevaron a cabo en presencia de celecoxib y valdecoxib se observó un incremento de la potencia, más acusado con valdecoxib, y un claro aumento de la eficacia en ambos casos, siendo más importante en el caso del celecoxib.

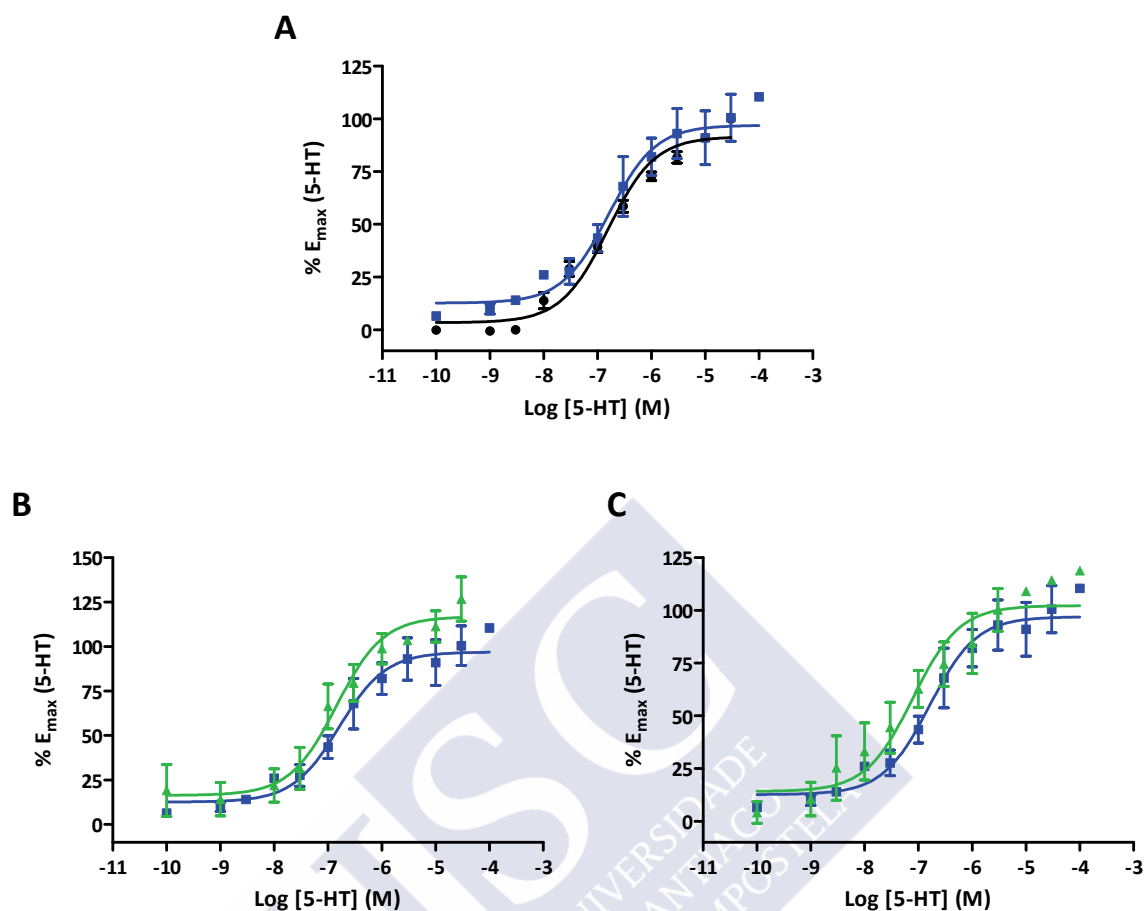


Figura 21: Efectos *in vitro* de la inhibición de la PLA₂ sobre la respuesta del receptor 5-HT_{2B} a 5-HT en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib. (A) CCRA de 5-HT en ausencia (●) y presencia (■) de ácido aristolóquico (AAR) 10 μM. (B) CCRA de 5-HT en presencia de AAR 10 μM en ausencia (■) y presencia (▲) de celecoxib 1 μM. (C) CCRA de 5-HT en presencia de AAR 10 μM en ausencia (■) y presencia (▲) de valdecoxib 1 μM. Se representa la media ± eem (barras verticales) de 4 experimentos independientes (n=4) en el caso del AAR y de 3 experimentos independientes (n=3) en el caso de los compuestos en estudio.

Tabla 3: Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata en presencia de un inhibidor de la PLA₂, ác. aristolóquico, en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib. Los datos representan la media \pm eem de 4 experimentos independientes (n=4) en el caso del AAr y de 3 experimentos independientes (n=3) en el caso de los compuestos en estudio. * $P < 0.01$ t test.

	EC_{50} (nM)	E_{max} (%) (% E_{max} 5-HT)
5-HT	156 \pm 22	100 \pm 2
5-HT + AAr 10 μ M	162 \pm 70	97 \pm 5
5-HT + AAr 10 μ M + Celecoxib 1 μ M	144 \pm 73	127 \pm 8*
5-HT + AAr 10 μ M + Valdecoxib 1 μ M	79 \pm 45*	118 \pm 6*

Evaluación de la posible modulación alostérica del receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata por celecoxib y valdecoxib.

Con el fin de caracterizar la potenciación observada y determinar si los coxibs seleccionados comparten sitio de unión con la 5-HT, se realizaron CCRA en presencia de un antagonista conocido del receptor 5-HT_{2B}: rauwolscina (Villazón y cols. 2003) (Figura 22, Tabla 4).

Se observa que la rauwolscina antagoniza claramente el efecto de la 5-HT en estos receptores incrementando significativamente el valor de EC_{50} ($P < 0.01$ t test). Cuando se llevan a cabo CCRA en presencia de rauwolscina y celecoxib o valdecoxib, el efecto de la rauwolscina se revierte parcialmente con ambos compuestos ($P < 0.01$ t test), desplazando la curva a la izquierda, detectándose a su vez un ligero incremento en la eficacia de la 5-HT ($P < 0.05$ t test)

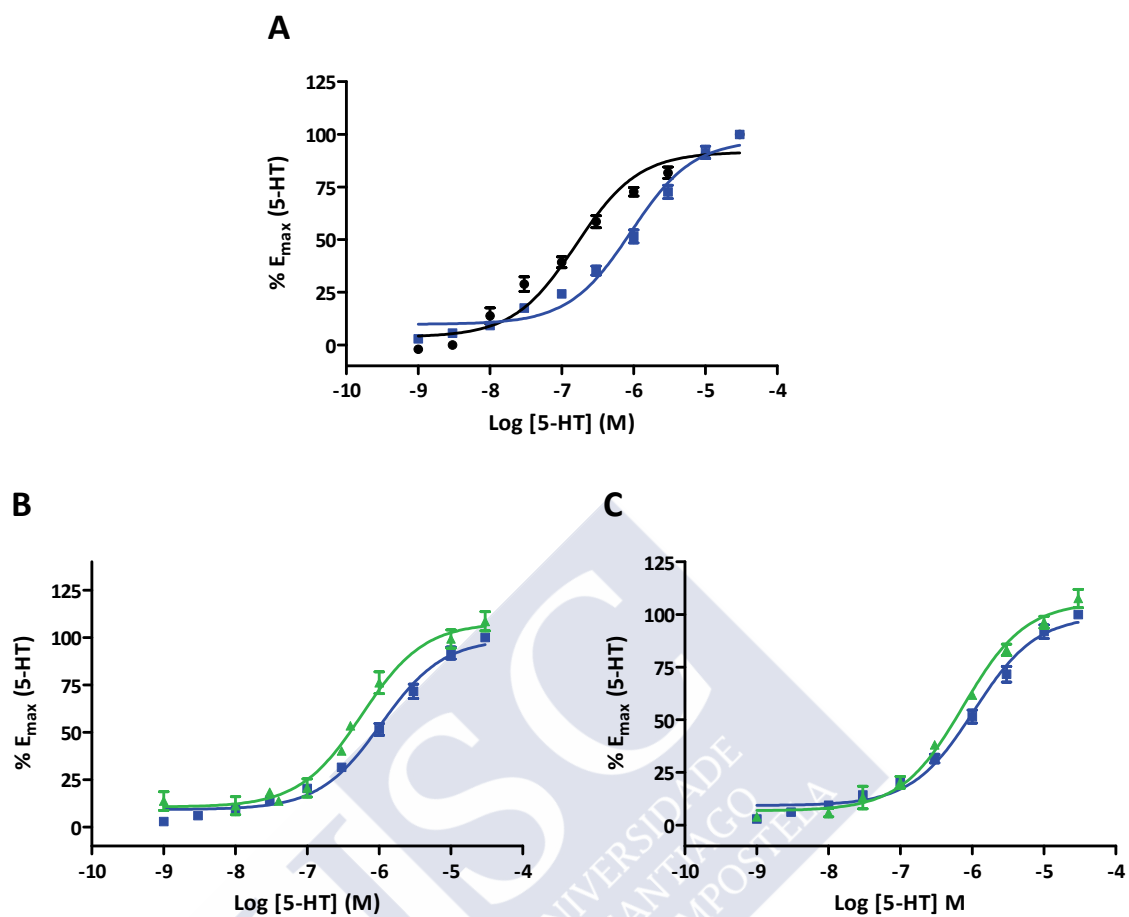


Figura 22: Efectos *in vitro* de la rauwolscina sobre la respuesta del receptor 5-HT_{2B} a 5-HT en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib. (A) Medida del efecto agonista de la 5-HT en ausencia (●) y presencia (■) de rauwolscina 0.3 μM. (B) Medida del efecto agonista de la 5-HT en presencia de rauwolscina 0.3 μM en ausencia (■) y presencia (▲) de celecoxib 1 μM. (C) Medida del efecto agonista de la 5-HT en presencia de rauwolscina 0.3 μM en ausencia (■) y presencia (▲) de valdecoxib 1 μM. Se representa la media ± eem (barras verticales) de 4 experimentos independientes (n=4).

Tabla 4: Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata en presencia de rauwolscina, en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib. Los datos representan la media \pm eem de 4 experimentos independientes. * $P < 0.05$ t test.

	EC_{50} (nM)	E_{max} (% E_{max} 5-HT)
5-HT	159 \pm 43	100 \pm 4
5-HT + Rauwolscina 0.3 μ M	1065 \pm 292	100 \pm 8
5-HT + Rauwolscina 0.3 μ M + Celecoxib 1 μ M	574 \pm 218*	108 \pm 4*
5-HT + Rauwolscina 0.3 μ M + Valdecoxib 1 μ M	747 \pm 189*	107 \pm 2*

Tratamiento farmacológico

• Tratamiento con 5-HT

Inicialmente, para comprobar que somos capaces de evaluar el daño valvular, se llevó a cabo un experimento análogo al descrito por Elangbam y cols (Elangbam y cols. 2008) como prueba de concepto (ver Introducción). De esta manera, el modelo permitiría comprobar en las válvulas cardíacas *ex vivo* los posibles efectos sinérgicos de los distintos fármacos, siendo los resultados obtenidos aquí un control positivo de la disfunción valvular.

Las ratas se trataron durante 7 días con 5-HT (75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces) y se evaluaron los niveles plasmáticos de 5-HT, la respuesta del receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago y las posibles alteraciones morfológicas valvulares.

Niveles plasmáticos de 5-HT

Se determinaron los niveles plasmáticos de 5-HT en plasma libre de plaquetas (Figura 23), encontrándose que el tratamiento descrito incrementa significativamente ($P < 0.01$ t test) la concentración de 5-HT circulante.

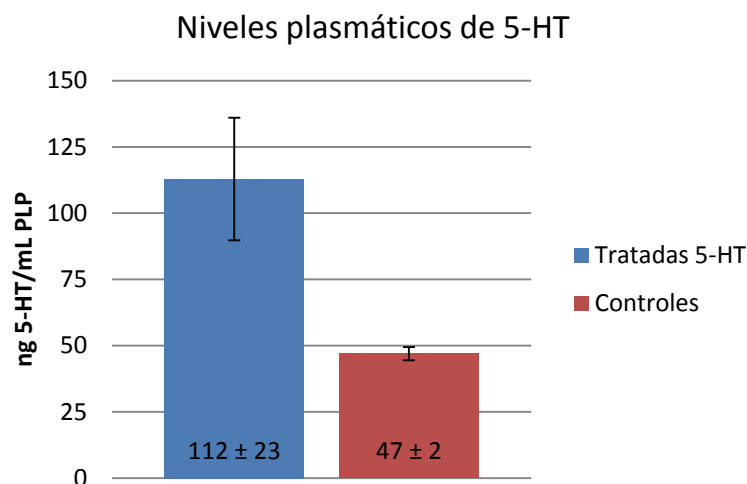


Figura 23: Niveles plasmáticos de 5-HT tras 7 días de tratamiento con 5-HT, 75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces. Los datos representan la media \pm eem de 6 ratas experimentales (6 controles y 6 tratadas).

Estudios funcionales *ex vivo*

Se estudió la posible alteración de la respuesta del receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata tras el tratamiento con 5-HT durante 7 días, observándose una disminución en la respuesta de estos receptores a 5-HT en las ratas tratadas respecto a las control (Figura 24).

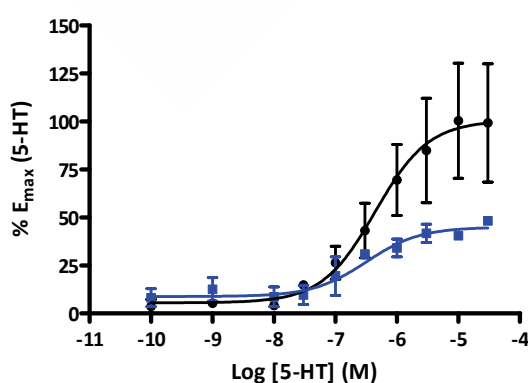


Figura 24: Efecto del tratamiento con 5-HT en la activación del receptor 5-HT_{2B} promovida por 5-HT. CCRA de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de ratas control (a las que se les administró solución salina) (●) y ratas tratadas con 5-HT (75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces) (■). Se representa la media \pm eem de 6 ratas experimentales (6 controles y 6 tratadas).

Estudios histológicos

El examen histológico de los corazones procedentes de ratas tratadas y ratas control, reveló un importante aumento en acumulaciones de GAGs, así como una pérdida de rigidez en las válvulas de las ratas tratadas (Figura 25).

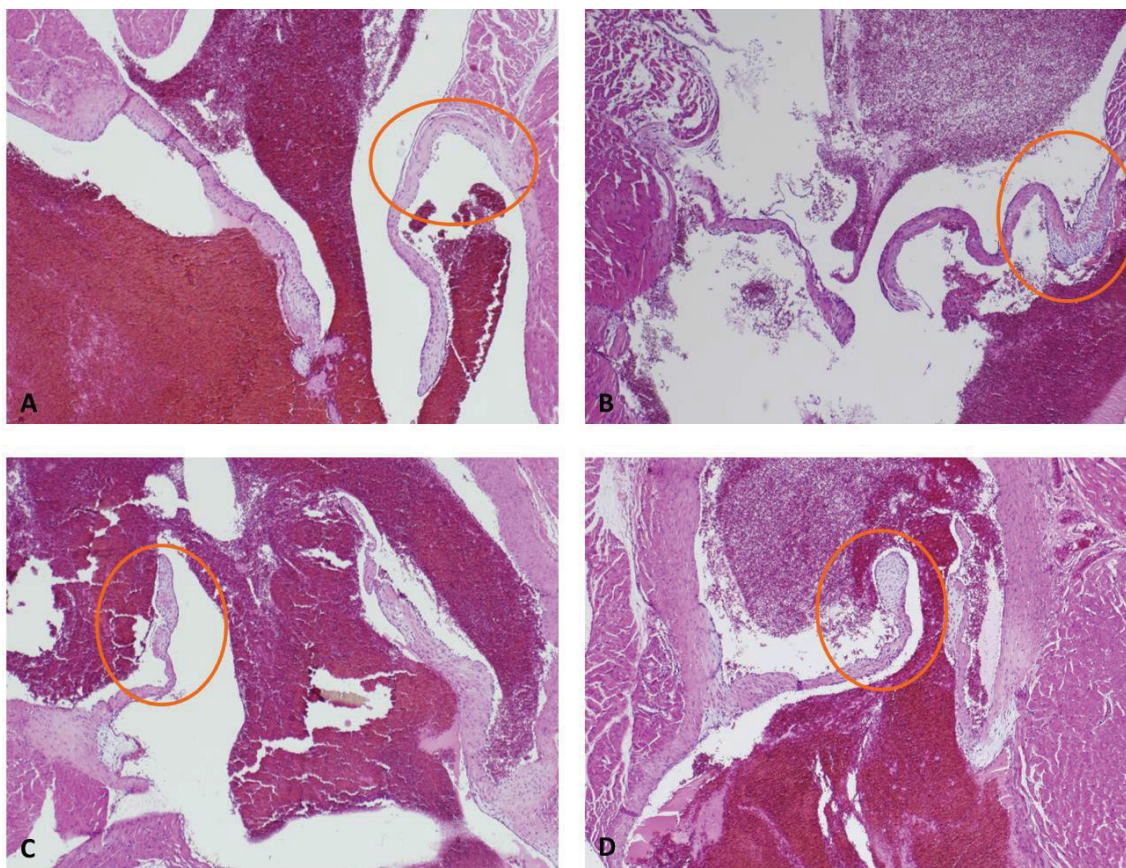


Figura 25: Efecto del tratamiento con 5-HT durante 7 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas. (A, B) Válvula mitral A: control B: tratada. (C, D) Válvula aórtica C: control D: tratada.

En resumen, el tratamiento con 5-HT durante 7 días (75 mg/kg durante los primeros 4 días y 60 mg/kg a partir de entonces) dio lugar a un aumento de la 5-HT plasmática acompañado de una disminución en la respuesta a 5-HT de los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago y un engrosamiento y alteración de la composición de las válvulas aórtica y mitral en las ratas tratadas; más

específicamente, las valvas de las ratas tratadas tenían mayor grosor y una mayor cantidad de GAGs.

- **Tratamiento con celecoxib**

Una vez puesta a punto la metodología necesaria, con el fin de evaluar si el efecto observado en los ensayos también se observaba con concentraciones de celecoxib cercanas a concentraciones terapéuticas, las ratas fueron tratadas con celecoxib 30 mg/Kg/día durante 21 días.

Niveles plasmáticos de 5-HT

Tras determinar los niveles plasmáticos de 5-HT en plasma libre de plaquetas, se comprobó que el tratamiento con celecoxib no alteraba la concentración de 5-HT plasmática (Figura 26).

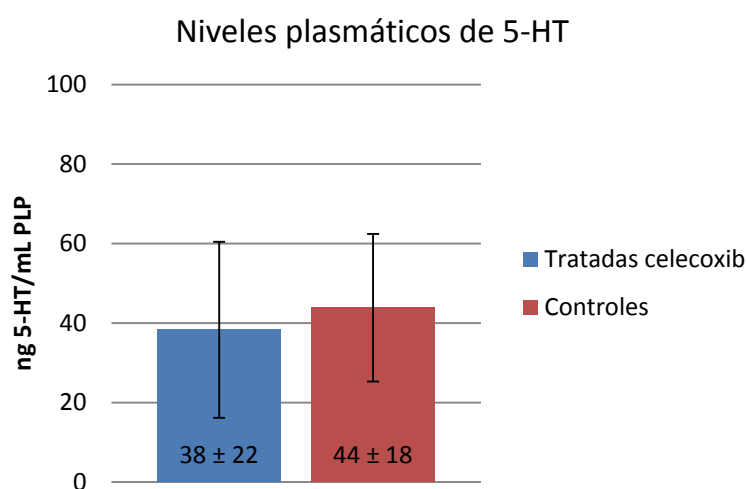


Figura 26: Niveles plasmáticos de 5-HT tras 21 días de tratamiento con celecoxib 30 mg/kg/día. Los datos representan la media \pm eem de 12 ratas experimentales (12 controles y 12 tratadas).

Estudios funcionales *ex vivo*

El tratamiento de 21 días con celecoxib 30 mg/kg/día aumentó significativamente la respuesta de 5-HT en los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata (Figura 27). Se observó un aumento de hasta 1,6 veces el efecto máximo en las ratas tratadas con celecoxib con respecto a los controles, mientras que los valores de EC₅₀ no se vieron afectados (EC₅₀ = 240, 291 nM y E_{max} = 100, 156% de las ratas tratadas y controles, respectivamente) ($P < 0.01$, t test).

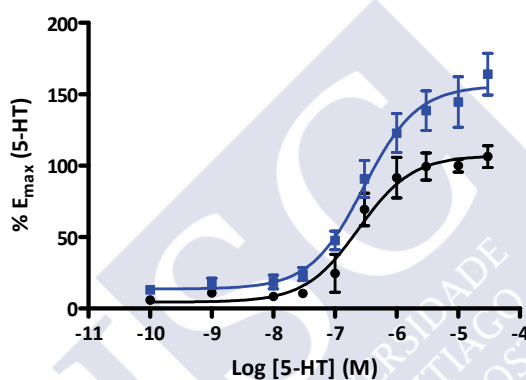


Figura 27: Efecto del tratamiento con celecoxib sobre la activación del receptor 5-HT_{2B} promovida por 5-HT. CCRAs de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata de ratas control (a las que se les administró vehículo) (●) y ratas tratadas con celecoxib (30 mg/kg/día) (■). Los datos representan la media ± eem de 12 ratas experimentales (12 controles y 12 tratadas).

Estudios inmunohistoquímicos

El fundus del estómago de las ratas tratadas con celecoxib mostraron una mayor inmunorreactividad para el receptor 5-HT_{2B} que la mostrada por el mismo tejido en las ratas control (Figuras 28A, B). El receptor se localizó en las neuronas del plexo de Auerbach tanto en los animales control como en los tratados, sin embargo, la intensidad de la reacción inmunohistoquímica en estas neuronas fue mayor en las ratas tratadas con celecoxib (Figura 28A) que en las ratas control (Figura 28B). Se obtuvieron resultados similares en las válvulas aórtica y mitral (Figuras 28C-F).

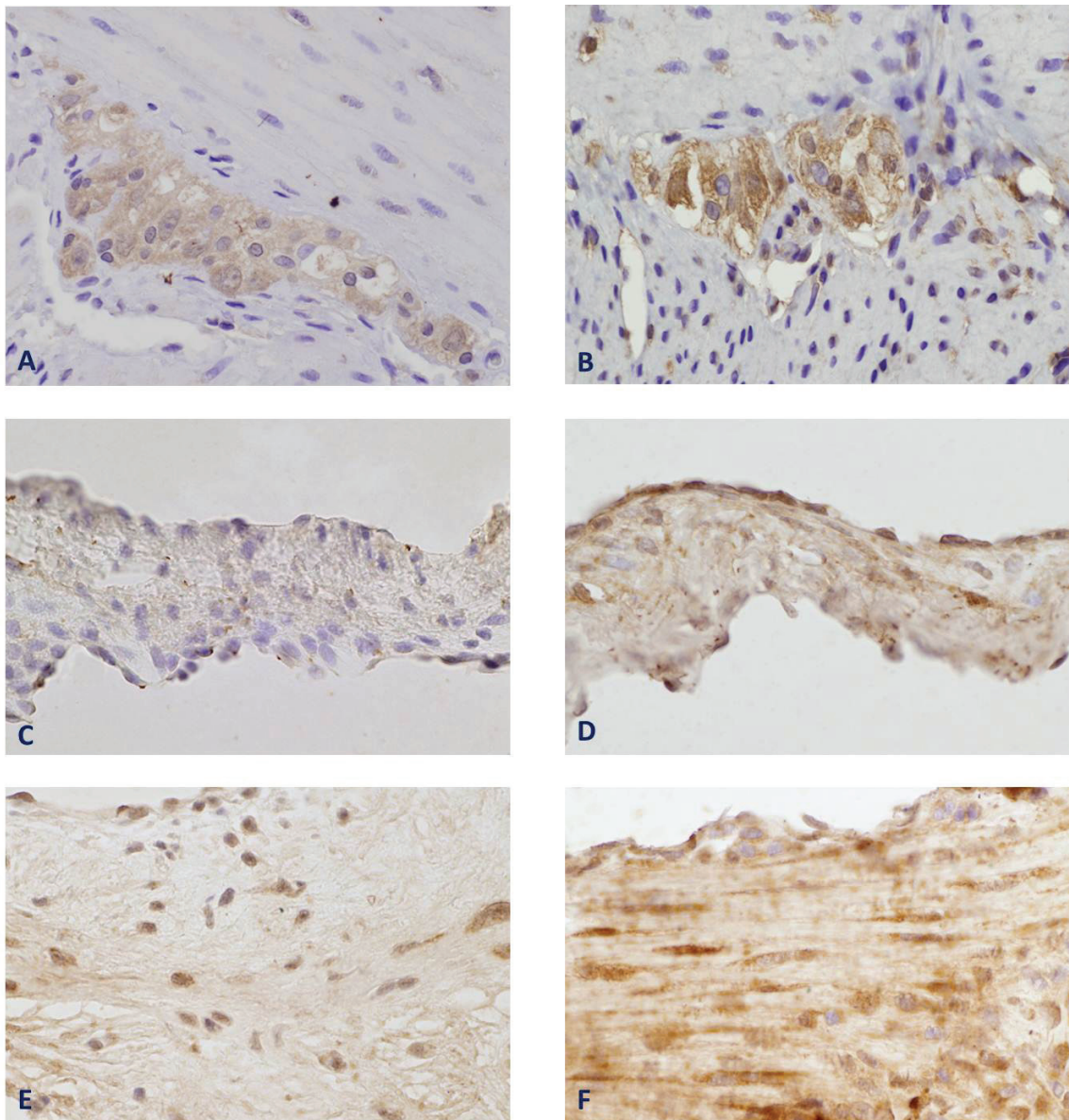


Figura 28: Inmunorreactividad de receptores 5-HT_{2B} de rata después de 21 días de tratamiento i.p. con celecoxib 30 mg/kg/día. (A, C, E) vehículo (B, D, F) celecoxib 30 mg/kg/día. (A, B) plexo mientérico (C, D) válvula aórtica (E, F) válvula mitral (40x).

Se produjo reacción inmunopositiva para el receptor 5-HT_{2B} tanto en los fibroblastos de ratas tratadas como en los de ratas control, si bien el número de células positivas y la intensidad de la inmunorreacción fue mayor en las ratas tratadas con celecoxib (Figura 28B, D, F) que en las ratas control (Figura 28A, C, E).

Estudios histológicos

El estudio histológico de las válvulas mostró algunas diferencias en las ratas tratadas en comparación con los controles sin llegar a ser estadísticamente significativas. Los hallazgos anatomopatológicos en las válvulas de las ratas tratadas consistieron principalmente en un engrosamiento de la válvula acompañado de un mayor depósito de GAGs nodular (Figura 29).

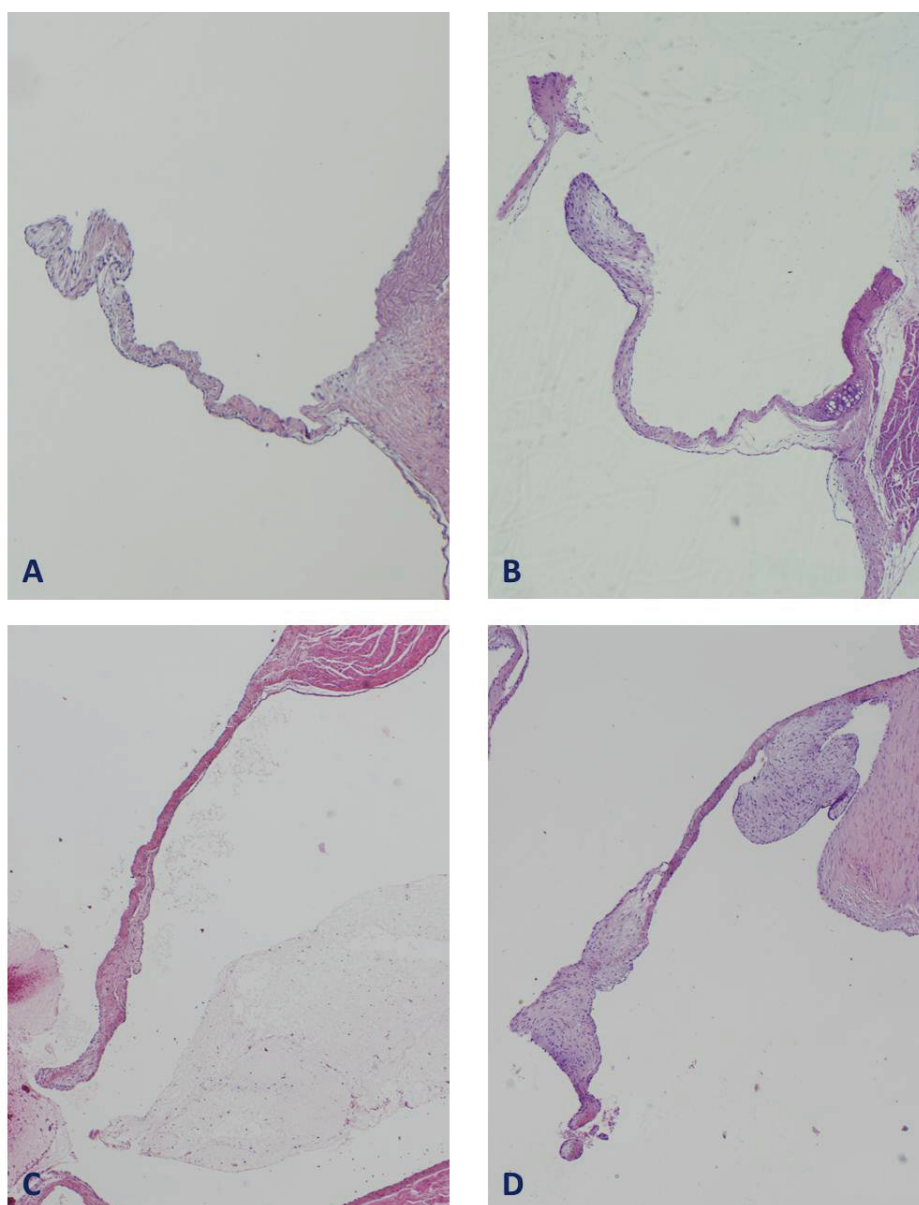


Figura 29: Efecto del tratamiento i.p. con celecoxib 30 mg/kg/día durante 21 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas. (A, B) válvula aórtica, (C, D) válvula mitral (4x).

Estudios de unión de radioligandos

• Validación de membranas CHO-K1 5-HT_{2B}

Con el fin de determinar la cantidad de proteína por punto y la concentración de radioligando a utilizar así como el correcto funcionamiento de las membranas CHO-K1 5-HT_{2B} preparadas, antes de llevar a cabo los estudios de unión de radioligandos con los diferentes compuestos, se realizaron ensayos de linealidad de proteína, saturación de radioligando y competición de compuestos con actividad conocida sobre estos receptores, tanto con [³H]-LSD como con [³H]-5-HT (Figura 30).

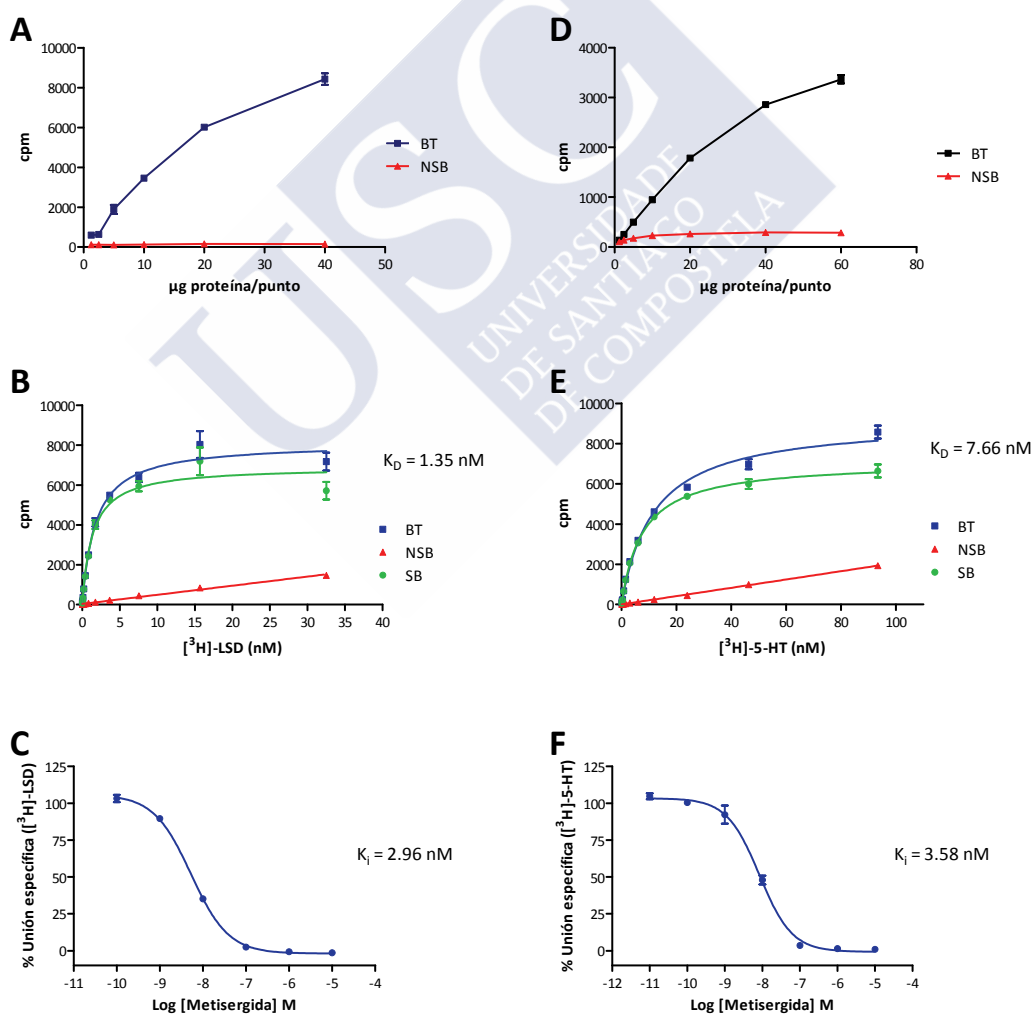


Figura 30: Validación de membranas CHO-K1 5-HT_{2B} con [³H]-LSD y [³H]-5-HT. (A, D) Linealidad de proteína (B, E) Saturación de radioligando (C, F) Competición de estándares.

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron 5 μg de proteína por pocillo en el caso de [^3H]-LSD y 40 μg cuando se utiliza [^3H]-5-HT. Asimismo se seleccionó 1 nM de [^3H]-LSD o 10 nM de [^3H]-5-HT como concentración de radioligando.

El valor de K_D obtenido para cada radioligando así como el valor de K_i para la metisergida en cada caso, son consistentes con la bibliografía existente (Andrade y cols. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{2B} receptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB)).

- **Celecoxib y valdecoxib no tienen afinidad por los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2A} humanos**

Los compuestos evaluados mostraron muy baja afinidad por los receptores 5-HT_{2B} recombinantes humanos expresados de forma estable en células CHO, a concentraciones elevadas (10 μM) apenas fueron capaces de desplazar la unión específica del radioligando por lo que no se pudieron realizar curvas concentración-respuesta (Tabla 5).

Teniendo en cuenta que el receptor 5-HT_{2A} media contracción en aorta de rata (Enguix y cols. 2003) y, por tanto, podría contribuir a la cardiotoxicidad observada en estos compuestos, se decidió evaluar también la afinidad de celecoxib y valdecoxib en este receptor, observándose que ni celecoxib ni valdecoxib muestran afinidad por el receptor 5-HT_{2A} (Tabla 5).

Tabla 5: Afinidad de celecoxib y valdecoxib por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} humanos. Se muestra la media \pm eem de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

	% Desplazamiento unión específica del radioligando	
	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}
Celecoxib 10 μ M	2 \pm 3	17 \pm 2
Valdecoxib 10 μ M	3,2 \pm 0,7	28 \pm 6

• **Celecoxib y valdecoxib modulan la afinidad de la 5-HT por el receptor 5-HT_{2B} humano**

Con el fin de evaluar el efecto de los compuestos en el efecto mediado por 5-HT en el receptor 5-HT_{2B}, se construyeron CCRA de 5-HT en ausencia y presencia de concentraciones equivalentes a las terapéuticas (Tabla 6) tanto de celecoxib como de valdecoxib (Figura 31).

Tabla 6: Concentración plasmática fisiológica de 5-HT y concentraciones plasmáticas descritas para las dosis terapéuticas usuales de celecoxib y valdecoxib.

	Concentración plasmática	Bibliografía
5-HT	2.8 nM	Kema i.p. y cols, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 747:33-48
Celecoxib	6.24 μ M - 42.7 μ M	EMA Scientific Discussion 2005
Valdecoxib	0,46 μ M - 1.85 μ M	FDA Clinical Pharmacological y Biopharmaceutics Review(s) 2001

Se comprobó que, en ausencia de otros compuestos, la 5-HT mostró una K_i en el receptor 5-HT_{2B} de 4.5 nM, compatible con los datos previamente descritos (Kursar y cols. 1994; Rothman y cols. 2000), mientras que, en presencia de concentraciones similares a las terapéuticas (10-30 μ M)(EMA 2005)(EMA 2005) (EMA 2005) el celecoxib aumenta de forma significativa ($P < 0.01$, t test) la afinidad de concentraciones de 5-HT equivalentes a los niveles plasmáticos (0.1-10 nM) por el receptor 5-HT_{2B} humano. Este efecto también se observó con valdecoxib, sin embargo, en este caso, sólo a concentraciones superiores a 1 μ M (concentración equivalente a la terapéutica) (Figura 32).

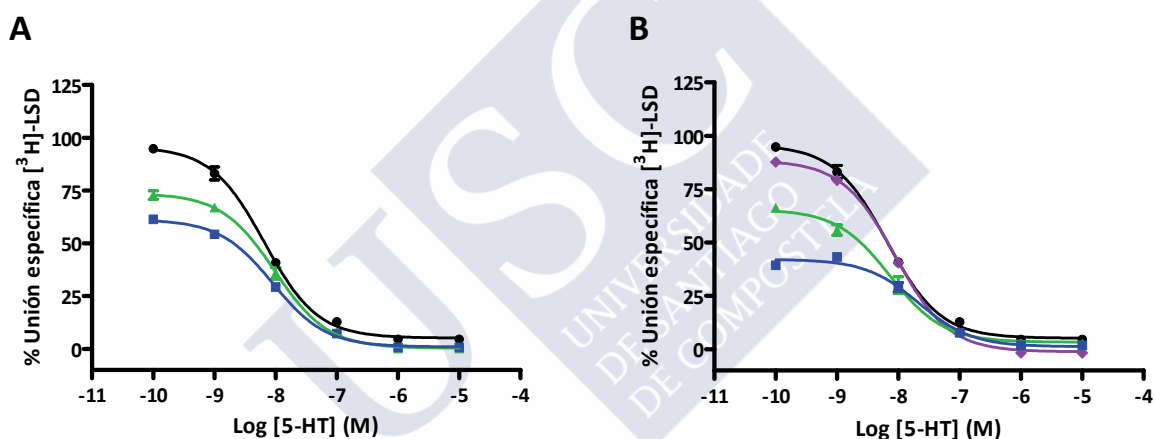


Figura 31: Efectos *in vitro* de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de celecoxib y valdecoxib sobre la afinidad de 5-HT por el receptor 5-HT_{2B} humano. Curvas concentración-respuesta (CCRs) de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano marcado con [³H]-LSD utilizando 5-HT 50 μ M para determinar la unión no específica. Se representa el porcentaje de unión de [³H]-LSD para cada concentración de 5-HT en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones de (A) celecoxib (10 (▲), 30 (■) μ M) y (B) valdecoxib (1 (◆), 10 (▲), 30 (■) μ M). Se muestra la media \pm eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

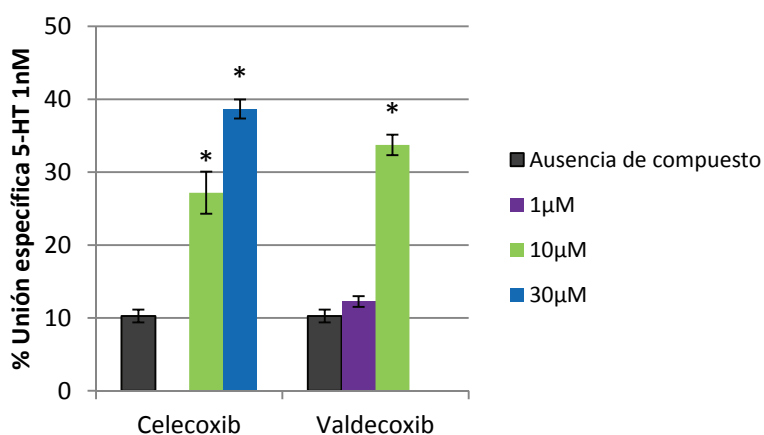


Figura 32: Efectos *in vitro* de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de celecoxib y valdecoxib sobre el % de unión específica de 5-HT 1 nM al receptor 5-HT_{2B} humano. * $P < 0.01$ t test.

- **Celecoxib y valdecoxib no alteran significativamente la cinética de unión de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano.**

Para examinar la posible alteración de la cinética de unión de la 5-HT, se llevaron a cabo experimentos de disociación en ausencia y presencia de celecoxib y valdecoxib (Figura 33).

El estudio cinético de ambos inhibidores de la COX-2 puso de manifiesto que, aunque la velocidad a la que la 5-HT se disocia de su sitio de unión se vio afectada, no hubo cambios significativos en las curvas de disociación de 5-HT a concentraciones comparables con los niveles plasmáticos terapéuticos (Tabla 7).

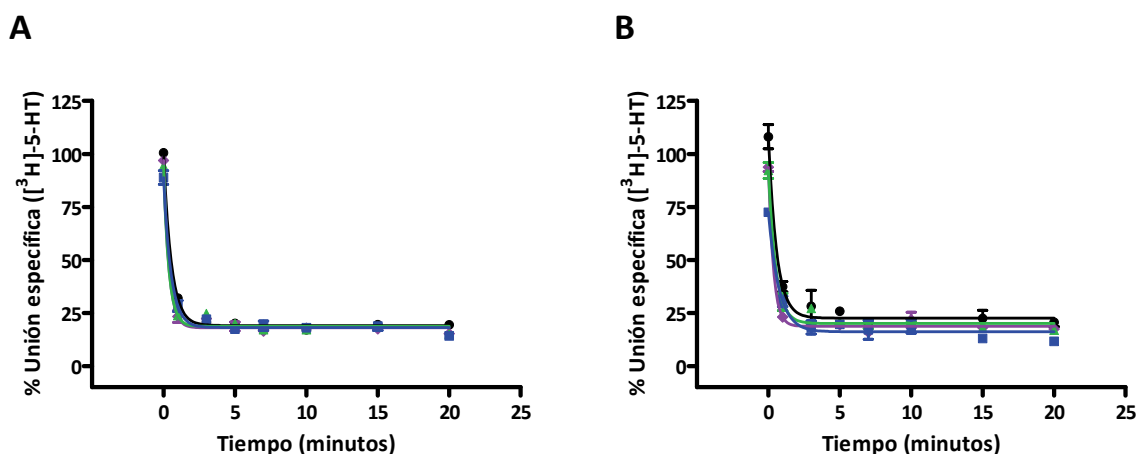


Figura 33: Cinéticas de disociación de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de celecoxib y valdecoxib. (A) 5-HT en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones de celecoxib (1 (◆), 10 (▲), 30 (■) μM) y (B) 5-HT en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones de valdecoxib (0,1 (◆), 1 (▲), 10 (■) μM). Se muestra un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 7: Constante de disociación de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de celecoxib y valdecoxib. Se muestra la media ± eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

	K_{off} (min^{-1})
5-HT	1,718 ± 0,26
5-HT + Celecoxib 1μM	2,836 ± 0,44
5-HT + Celecoxib 10μM	1,921 ± 0,30
5-HT + Celecoxib 30μM	1,349 ± 0,21
5-HT	1,836 ± 0,10
5-HT + Valdecoxib 0,1μM	2,689 ± 0,39
5-HT + Valdecoxib 1μM	2,704 ± 0,46
5-HT + Valdecoxib 10μM	1,921 ± 0,23

Estudios funcionales celulares

Se evaluó la activación de los receptores 5-HT_{2B} humanos midiendo la acumulación de IP₁ en células CHO-5-HT_{2B} (ver Material y métodos).

- **Celecoxib y valdecoxib por si mismos no activan el receptor 5-HT_{2B} humano**

Tanto el celecoxib como el valdecoxib provocaron un aumento en la acumulación de IP₁ a altas concentraciones. A la concentración terapéutica, celecoxib mostró una ligera activación (26 %, 10 μM), mientras que valdecoxib no ejerció ningún efecto (0.5 %, 1 μM) (Figura 34, Tabla 8).

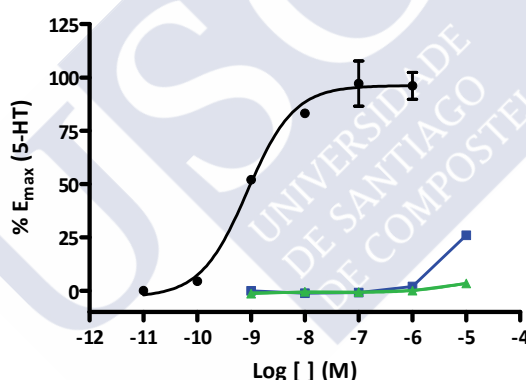


Figura 34: Efectos *in vitro* de celecoxib y valdecoxib en el receptor 5-HT_{2B} humano. CCRs de 5-HT (●), celecoxib (■) y valdecoxib (▲). Se muestra la media ± eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 8: Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT, el celecoxib y el valdecoxib en el receptor 5-HT_{2B} humano. Los datos representan la media \pm eem de 3 experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

	EC_{50} (nM)	E_{max} (%)
5-HT	0,87 \pm 0,49	100 \pm 7
Celecoxib	--*	26 \pm 6
Valdecoxib	--*	4 \pm 8

* Compuesto inactivo. La K_i no puede ser calculada.

- **Celecoxib y valdecoxib modulan el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano**

Cuando se construyeron CCRs de 5-HT en presencia de estos compuestos, el celecoxib (10 μ M) potenció significativamente ($P < 0.01$, t test) la acumulación de IP₁ inducida por 5-HT 0.01-0.1 nM (de 0.4 y 8.6 % a 71 y 76 % respectivamente) (Figura 35A). El valdecoxib (10 μ M) potenció significativamente ($P < 0.05$, t test) el efecto de la concentración más baja de 5-HT (0,01 nM) (Figura 35B).

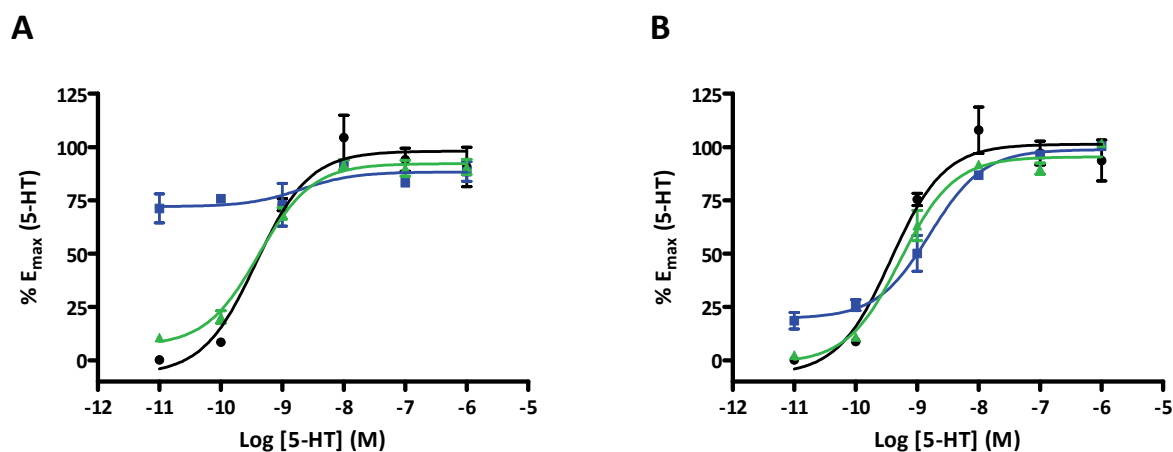


Figura 35: Efectos *in vitro* de celecoxib y valdecoxib sobre la respuesta del receptor 5-HT_{2B} humano a 5-HT. CCRs de 5-HT en ausencia (●) y presencia de diferentes concentraciones (1 (▲), 10 (■) μM) de (A) celecoxib y (B) valdecoxib. Se muestra la media ± eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

II. ISRS: FLUOXETINA

Estudios funcionales *ex vivo*

Se realizaron estudios funcionales en fundus de estómago de rata con el fin de evaluar la respuesta inducida por el fármaco sobre el tejido.

- **La fluoxetina se comportó como un agonista parcial de los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata.**

La fluoxetina causó una estimulación leve de los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata (a concentraciones superiores a 10 μM alcanzó un 35 % del efecto de 5-HT) (Figura 36A).

Sin embargo, cuando las CCRAs del agonista endógeno (5-HT) se realizaron en presencia de fluoxetina, se encontró que ésta era capaz de aumentar ligeramente el efecto de bajas dosis de 5-HT (20 % de incremento), mientras que, al

mismo tiempo, inhibía el efecto de 5-HT de forma concentración-dependiente (Figura 36B).

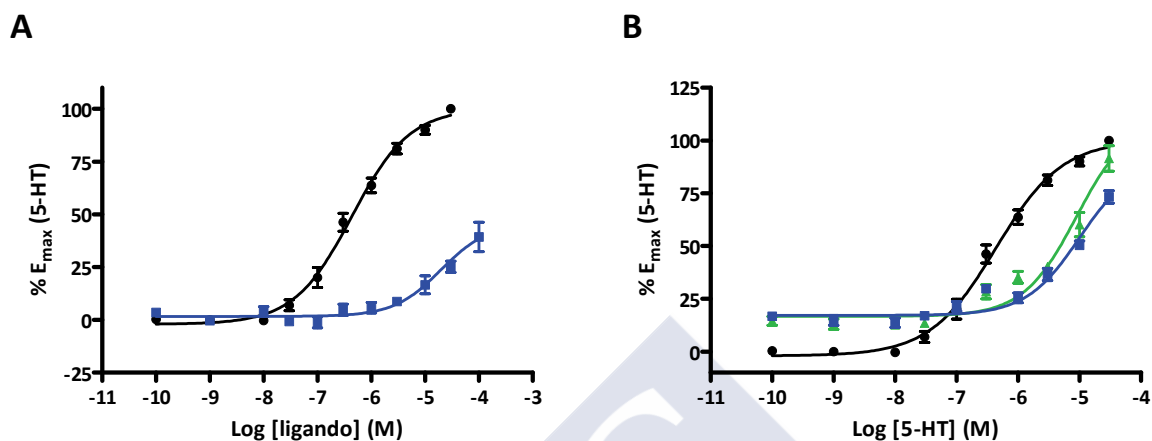


Figura 36: Efectos *in vitro* de la fluoxetina en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata directos y sobre la respuesta a 5-HT. (A) CCRAs de 5-HT (●) o fluoxetina (■). (B) CCRAs de 5-HT en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones (10 (▲), 30 (■) μM) de fluoxetina. Los puntos representan la media ± eem de 4 experimentos independientes.

Tratamiento farmacológico

• Tratamiento con fluoxetina

Con el fin de evaluar las posibles implicaciones *in vivo* del comportamiento observado, se llevó a cabo un experimento con ratas a las que se administró un tratamiento consistente en 10 mg/kg/día de fluoxetina durante 21 días.

Niveles plasmáticos de 5-HT

Tras el análisis cuantitativo de la 5-HT en plasma libre de plaquetas se observó que el tratamiento con fluoxetina no alteraba significativamente los niveles de 5-HT circulante (Figura 37).

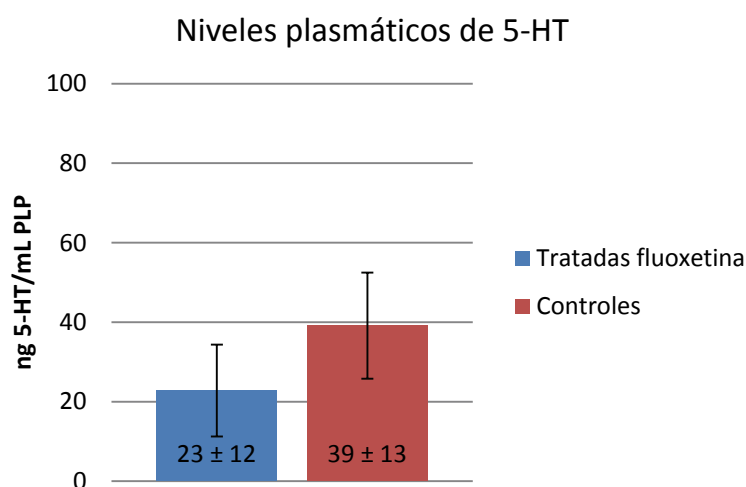


Figura 37: Niveles plasmáticos de 5-HT tras 21 días de tratamiento con fluoxetina 10 mg/kg/día. Los datos representan la media \pm eem de 12 ratas experimentales (12 controles y 12 tratadas).

Estudios funcionales *ex vivo*

El tratamiento de 21 días con fluoxetina 10 mg/kg/día disminuyó significativamente ($P < 0.01$, t test) la respuesta de 5-HT en fundus de estómago de rata (Figura 38).

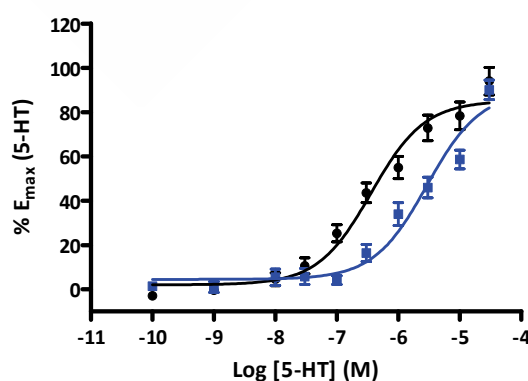


Figura 38: Efecto del tratamiento con fluoxetina en la activación del receptor 5-HT_{2B} promovida por 5-HT. CCRAs de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata de ratas control (tratadas con vehículo) (●) y ratas tratadas con fluoxetina (10 mg/kg/día) (■). Los datos representan la media \pm eem de 12 ratas experimentales (12 controles y 12 tratadas).

Se observó una disminución de la potencia de la 5-HT de hasta 10 veces sin afectar el efecto máximo en ratas tratadas en comparación con las ratas control ($EC_{50} = 363, 2931 \text{ nM}$ y $E_{max} = 100, 100 \%$ de las ratas tratadas y los controles, respectivamente).

Estudios inmunohistoquímicos

Una vez evaluados inmunohistoquímicamente, se observó que los fundus de estómago de las ratas tratadas con fluoxetina mostraron una mayor inmunoreactividad para el receptor 5-HT_{2B} que los mismos tejidos de las ratas control (Figura 39A, B). El receptor se localiza en las neuronas del plexo de Auerbach tanto en las ratas control como en las tratadas, pero la intensidad de la reacción inmunohistoquímica en estas neuronas es mayor en las ratas tratadas con fluoxetina (Figura 39B) en comparación con las ratas control (Figura 39A). Resultados similares se observan en las válvulas aórtica y mitral (Figura 39C-F), donde la reacción inmunopositiva para el receptor 5-HT_{2B} se mostró en los fibroblastos de ambos grupos de ratas, sin embargo, el número de células positivas y la intensidad de inmunorreacción fue mayor en las ratas tratadas con fluoxetina (Figura 39D, F) en comparación con la de las ratas control (Figura 39C, E).

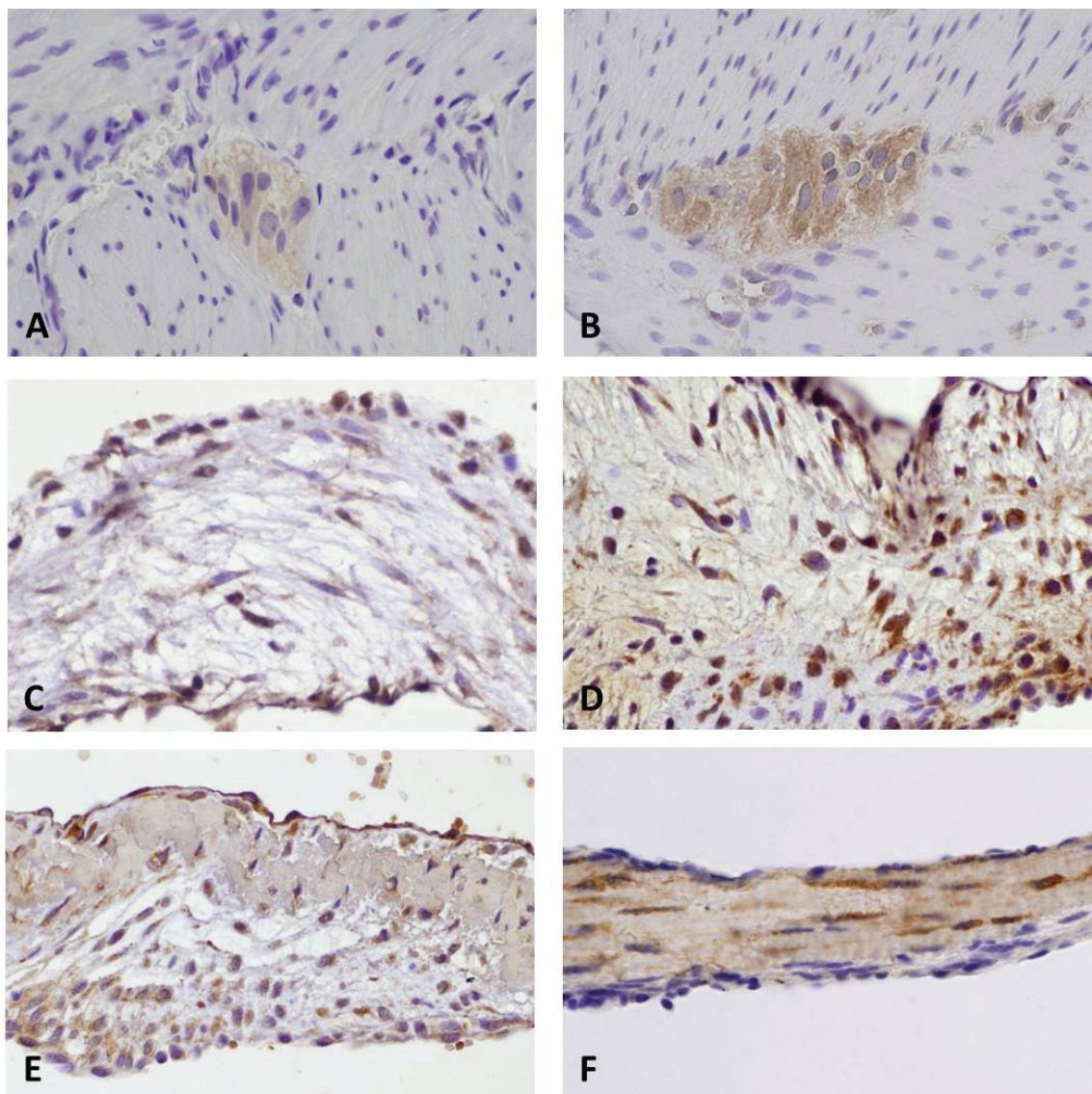


Figura 39: Inmunorreactividad de receptores 5-HT_{2B} de rata después de 21 días de tratamiento i.p. con fluoxetina 10 mg/kg/día. (A, C, E) vehículo (B, D, F) fluoxetina 10 mg/kg/día. (A, B) plexo mientérico (C, D) válvula aórtica (E, F) válvula mitral (40x).

Estudios histológicos

El análisis histológico de las válvulas mostró algunas diferencias en las ratas tratadas en comparación con los controles, principalmente en forma de engrosamiento de la válvula y depósito de GAG nodular, siendo estadísticamente significativa ($P < 0.05$, chi-cuadrado) en las válvulas aórticas (Figura 40).

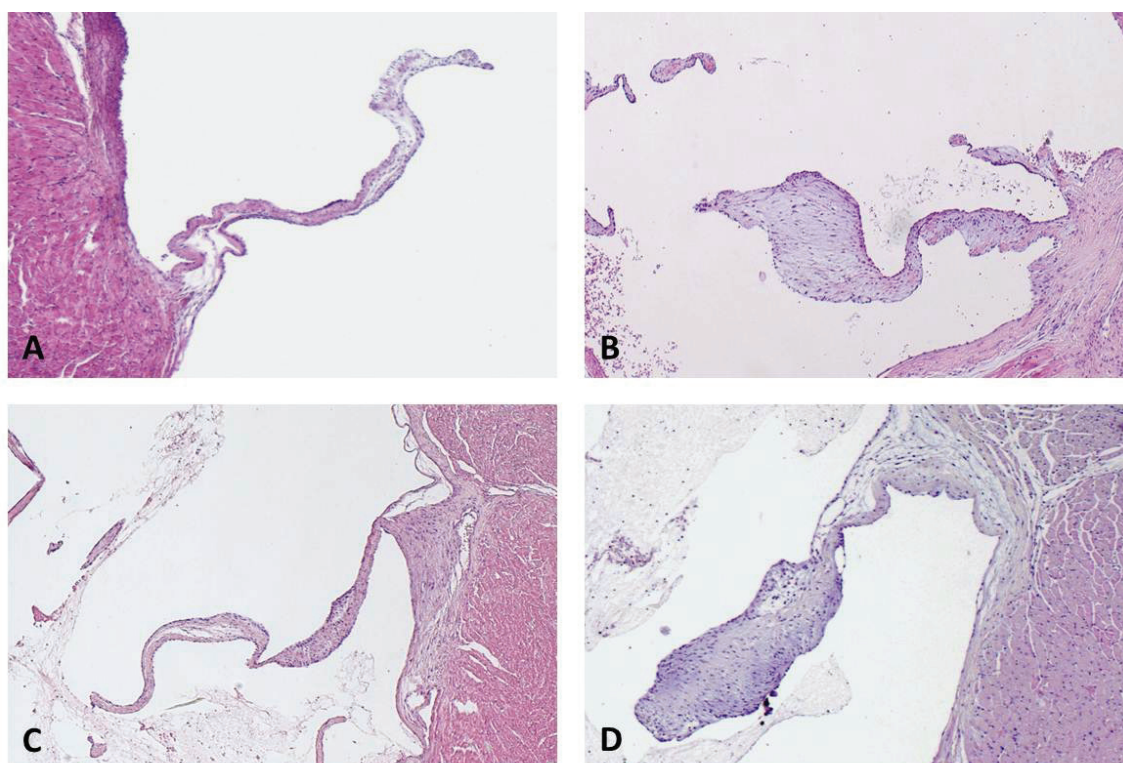


Figura 40: Efecto del tratamiento i.p. con fluoxetina 10 mg/kg/día durante 21 días sobre la morfología de las válvulas cardíacas. (A, C) vehículo (B, D) fluoxetina 10 mg/kg/día. (A, B) válvula aórtica, (C, D) válvula mitral (4x).

Estudios de unión de radioligandos

- **La fluoxetina se une al receptor 5-HT_{2B} humano con baja afinidad.**

Cuando se estudió el comportamiento de la fluoxetina en receptores 5-HT_{2B} recombinantes humanos expresados de forma estable en células CHO, ésta mostró

baja afinidad, desplazando la unión de [3 H]-LSD 1 nM con un valor de K_i de 2514 nM, mientras que la 5-HT mostró una K_i de 3.4 nM, compatible con los datos previamente descritos (Kursar y cols. 1994; Rothman y cols. 2000)(Figura 41).

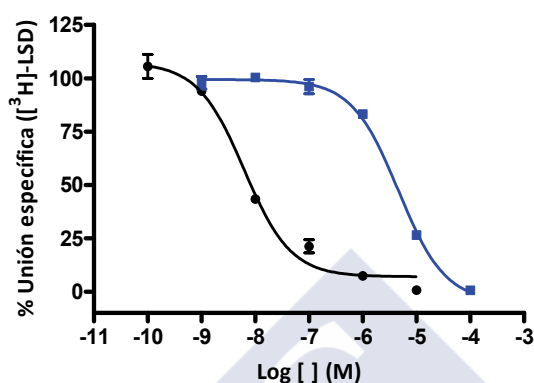


Figura 41: Afinidad de la 5-HT y la fluoxetina por el receptor 5-HT_{2B} humano. CCRs de 5-HT (●) y fluoxetina (■) en el receptor 5-HT_{2B} humano marcado con [3 H]-LSD utilizando 5-HT 50 μ M para determinar la unión no específica. Se representa el porcentaje de unión de [3 H]-LSD para cada concentración de compuesto. Se muestra un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

- **La fluoxetina no afecta a la afinidad de la 5-HT por el receptor 5-HT_{2B} humano**

Cuando se construyeron CCRs de 5-HT en presencia de diferentes concentraciones de fluoxetina, el aumento del desplazamiento de la unión del radioligando a bajas concentraciones de 5-HT se corresponde con el provocado por la propia fluoxetina a las concentraciones estudiadas (Figura 42).

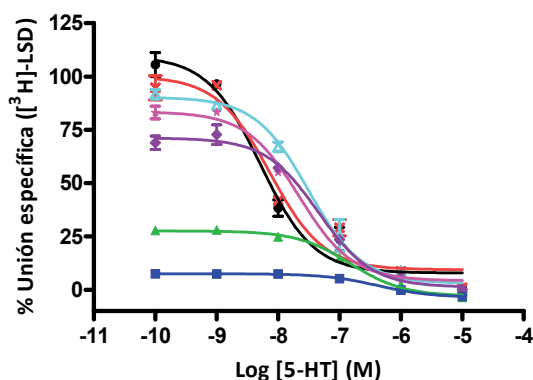


Figura 42: Efectos *in vitro* de concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas de fluoxetina sobre la afinidad de 5-HT por el receptor 5-HT_{2B} humano. CCRs de 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano marcado con [³H]-LSD utilizando 5-HT 50 μM para determinar la unión no específica. Se representa el porcentaje de unión de [³H]-LSD para cada concentración de 5-HT en ausencia (●) y en presencia de diferentes concentraciones (0.1 (x), 0.5 (Δ), 1 (★), 2 (◆), 10 (▲), 30 (■) μM) de fluoxetina. Se muestra un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

Estudios funcionales celulares

Se evaluó la activación de los receptores 5-HT_{2B} humanos midiendo la acumulación de IP₁ en células CHO-5-HT_{2B} (ver Material y Métodos).

- **La fluoxetina no activa los receptores 5-HT_{2B} humanos**

Se observó que la fluoxetina causó un ligero aumento en la acumulación de IP₁ únicamente a la concentración más alta ensayada (100 μM) (Figura 43).

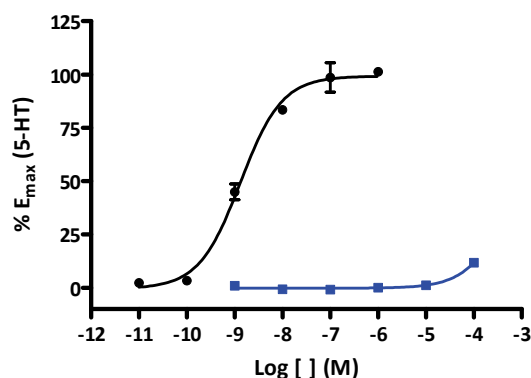


Figura 43: Efectos *in vitro* de la fluoxetina en el receptor 5-HT_{2B} humano. CCRs de 5-HT (●) y fluoxetina (■). Se muestra la media ± eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

- **La fluoxetina a altas concentraciones potencia el efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano**

La fluoxetina mostró un aumento del efecto de altas concentraciones de 5-HT (0,1-1 μM) a 10 μM (Figura 44, Tabla 9).

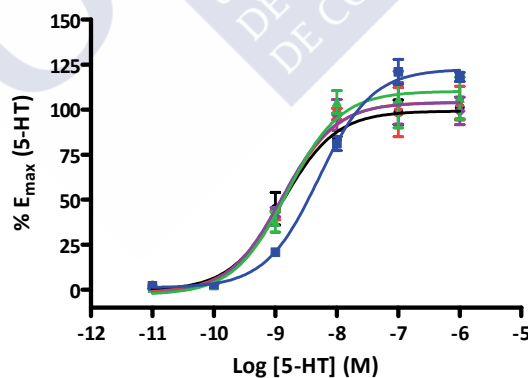


Figura 44: Efectos *in vitro* de la fluoxetina sobre la respuesta del receptor 5-HT_{2B} humano a 5-HT. CCRs de 5-HT en ausencia (●) y presencia de diferentes concentraciones (0.1 (x), 1 (◆), 2 (▲), 10 (■) μM) de fluoxetina. Se muestra la media ± eem de un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 9: Potencia (EC_{50}) y eficacia (E_{max}) de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano en ausencia y presencia de distintas concentraciones de fluoxetina. Los datos representan la media \pm eem de 3 experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

	EC_{50} (nM)	E_{max} (% E_{max} 5-HT)
5-HT	1,32 \pm 0,3	99,2 \pm 3,8
5-HT + Fluoxetina 0.1 μ M	1,35 \pm 0,5	104,2 \pm 8,1
5-HT + Fluoxetina 1 μ M	1,26 \pm 0,5	104,1 \pm 7,9
5-HT + Fluoxetina 2 μ M	1,55 \pm 0,7	110,2 \pm 10,5
5-HT + Fluoxetina 10 μ M	5,01 \pm 0,8	122,5 \pm 4,4

Teniendo en cuenta las concentraciones de fluoxetina plasmáticas alcanzadas en los tratamientos convencionales (Tabla 10), únicamente dosis por encima del umbral superior de este intervalo (10 μ M) potenciaron significativamente ($P < 0.05$, t test) la acumulación de IPs inducida por 0,1 – 1 μ M 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano.

Tabla 10: Concentración plasmática fisiológica de 5-HT y concentraciones plasmáticas descritas para las dosis terapéuticas usuales de fluoxetina.

	Concentración plasmática	Bibliografía
5-HT	2.8 nM	Kema i.p. y cols, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 747:33-48
Fluoxetina	0,47 - 1,62 μ M	FDA Approved Labeling Enclosure (NDA 18-936/S-064)



DISCUSIÓN





El objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar las implicaciones de la modulación de los efectos de la 5-HT ejercida por fármacos en los receptores 5-HT_{2B}. Para ello se han estudiado dos grupos de fármacos: inhibidores selectivos de la COX-2 (celecoxib, valdecoxib), e inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (fluoxetina).

Aparte de su papel fisiológico en la mediación de las acciones de la 5-HT, los receptores 5-HT_{2B} están asociados con diferentes patologías vasculares (Brea y cols. 2010; Jaffré y cols. 2009). Estos receptores participan en el desarrollo del sistema cardiovascular (Nebigil y cols. 2000), regulan el desarrollo y crecimiento de los cardiomiocitos (Jaffré y cols. 2004), y su activación se ha relacionado con la hipertrofia cardíaca (Jaffré y cols. 2009; Jaffré y cols. 2004) y con la hipertensión pulmonar (Zopf y cols. 2011). Su activación junto con la inhibición del transportador de serotonina juega un papel importante en la patogénesis de las valvulopatías inducidas por 5-HT (Elangbam y cols. 2008; Hutcheson y cols. 2011; Roth 2007).

A finales de la década de 1990, la fenfluramina y la dexfenfluramina, se asociaron con anomalías valvulares características de pacientes que presentaban daño cardíaco causado por tumores cancerígenos secretores de 5-HT (Connolly y cols. 1997). En el año 2000, se comprobó que la norfenfluramina, un agonista de los receptores 5-HT_{2B} (Fitzgerald y cols. 2000; Rothman y cols. 2000), también puede inducir valvulopatías. En 2007, dos grandes estudios epidemiológicos europeos (Schade y cols. 2007; Zanettini y cols. 2007) estudiaron la relación entre anomalías en las válvulas mitral, aórtica y tricúspide y el uso de los agonistas dopaminérgicos con efecto antiparkinsoniano pergolida y carbegolida, que también son potentes agonistas del receptor 5-HT_{2B}. Ambos estudios concluyeron que el tratamiento con estos fármacos se asocia con un riesgo significativamente mayor de insuficiencia valvular cardíaca.

Estos descubrimientos han hecho que se evalúe la actividad en receptores 5-HT_{2B} de los candidatos a fármaco y sus principales metabolitos antes de avanzar en las etapas de desarrollo y llegar a ensayos clínicos (Cosyns y cols. 2012; Elangbam

2010; Huang y cols. 2009; Hutcheson y cols. 2011). Sin embargo, no es frecuente llevar a cabo estudios que evalúen mecanismos indirectos de activación de estos receptores, tales como modulación alostérica o selectividad funcional.

Los recientes avances en receptores acoplados a proteínas G han desafiado las definiciones farmacológicas tradicionales de agonismo, antagonismo, afinidad y eficacia, ya que recientemente se han detectado numerosas interacciones ligando-receptor que no pueden ser explicadas adecuadamente por la teoría clásica de los receptores. El descubrimiento de la selectividad funcional y del alosterismo ha abierto nuevos caminos para el diseño y el descubrimiento de nuevos fármacos. Por ello, estas “nuevas” formas de interacción ligando-receptor también deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar la seguridad de candidatos a fármaco, pudiendo ser las responsables de reacciones adversas de diversos compuestos hasta ahora sin explicación mecanística.

A la luz del papel que se atribuye al receptor 5-HT_{2B} en la patogénesis de la valvulopatía cardíaca, en la presente Tesis Doctoral se estudiaron los efectos de compuestos que potencialmente interaccionarían con este receptor sobre la farmacología del mismo.

Inhibidores selectivos de la COX-2

Los fármacos inhibidores selectivos de la COX-2, comúnmente conocidos como coxibs, se desarrollaron en los años 90 con el objeto de obtener analgésicos con una menor incidencia de efectos adversos gastrointestinales (Meade y cols. 1993; Seibert y cols. 1994; Silverstein y cols. 2000; Vane y cols. 1998). Sin embargo, entre otras razones, el incremento en la incidencia de efectos adversos cardiovasculares severos (Bombardier y cols. 2000; Bresalier y cols. 2005; Kearney y cols. 2006; Layton y cols. 2008; Roumie y cols. 2009; Silverstein y cols. 2000; Solomon y cols. 2008; Spalding y cols. 2007; Trelle y cols. 2011), llevó a la retirada voluntaria del mercado de varios de estos fármacos, tal es el caso de rofecoxib (Ceoxx[®], Recox[®], Vioxx[®]), valdecoxib (Bextra[®]) y Lumiracoxib (Prexige[®], Stellige[®]).

Distintos experimentos y ensayos clínicos permitieron proponer que estos efectos adversos cardiovasculares se deben principalmente a un desequilibrio entre las concentraciones plasmáticas de TXA_2 , sintetizado por la COX-1 en las plaquetas, y de PGI_2 , un producto del metabolismo del ácido araquidónico mediado por la COX-2 en las paredes vasculares. El bloqueo permanente de las prostaglandinas dependientes de la COX-2, incluyendo PGE_2 y PGI_2 , sin un cambio concomitante en los niveles de TXA_2 , podrían inclinar el “balance” tromboxano/ prostaciclina, dando lugar a una predisposición a la trombosis, la hipertensión y la aterosclerosis (Funk y FitzGerald 2007).

Sin embargo, considerando las afinidades relativas de los coxibs por la COX-1 y COX-2 (FitzGerald y Patrono 2001), esta explicación no parece completamente coherente (Warner y Mitchell 2008). Los AINEs sin riesgo cardiovascular son también potentes inhibidores de la COX-2 con diferente selectividad para COX-1 o COX-2. Este es el caso, por ejemplo, del ketorolaco, un AINE típico utilizado para tratar el dolor. Este AINE ha mostrado en ensayos *in vitro* que, a pesar de ser selectivo para la COX-1, es también un potente inhibidor de la COX-2, incluso más que muchos de los inhibidores selectivos de la COX-2 (Hawkey 2006). Por todo esto no se deberían descartar otros posibles mecanismos que podrían contribuir a la toxicidad cardíaca asociada con estos compuestos.

Un estudio quimiogenómico realizado en el marco del proyecto EU-ADR (FP7/2007-2013) (EU-ADR Project Website) predijo que el celecoxib y el valdecoxib, podrían interactuar con los receptores 5-HT_{2B} . Por otra parte, se ha descrito la interacción directa de valdecoxib con este receptor (Roth National Institute of Mental Health's Psychoactive Drug Screening Program (NIMH PDSP)). A la vista de estos datos propusimos la hipótesis de que los efectos cardiovasculares adversos asociados con los inhibidores de la COX-2 pueden ser, al menos en parte, debidos a la interacción entre estos compuestos y los receptores 5-HT_{2B} .

Para probar esta hipótesis inicialmente evaluamos el efecto de celecoxib y valdecoxib en estudios funcionales *in vitro* sobre receptores 5-HT_{2B} de fundus de

estómago de rata. Estos estudios en tejidos aislados de animales de experimentación tienen la ventaja de que permiten una cuantificación precisa de la respuesta evitando la interacción con otros órganos y sistemas así como interferencias de procesos farmacocinéticos. El tejido utilizado para estos estudios fue el fundus de estómago de rata, puesto que es el tejido de elección para la evaluación funcional de los receptores 5-HT_{2B} (Brea y cols. 2010; Vane 1957).

Se llevaron a cabo CCRA's (Van Rossum 1963) de 5-HT, observándose una contracción concentración-dependiente del tejido con una potencia compatible con la presencia de receptores 5-HT_{2B} ($EC_{50}=141$ nM, descrito 120 nM; (Villazón y cols. 2003)). También se realizaron las CCRA's de celecoxib y valdecoxib, comprobándose que estos compuestos no activan los receptores 5-HT_{2B} por sí mismos, observándose únicamente una pequeña estimulación a las concentraciones más altas ensayadas (1 - 3 μ M) (8.1 % del efecto de la 5-HT para celecoxib y 13.9 % del efecto de la 5-HT para valdecoxib).

Para discernir si el celecoxib y el valdecoxib podrían interactuar indirectamente con los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata, se llevaron a cabo CCRA's de 5-HT, en ausencia y en presencia de los mismos. Los datos obtenidos muestran que ambos compuestos incrementan tanto la potencia como la eficacia de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de forma concentración-dependiente, llegando a valores de E_{max} superiores a 130 % de la E_{max} de la 5-HT ($P < 0.01$, t test). En el caso de valdecoxib se observa una potenciación de la respuesta del receptor para todas las concentraciones de 5-HT de la CCRA, mientras que en el caso de celecoxib tan sólo se observa a concentraciones altas del agonista endógeno. Estos resultados revelan que los dos compuestos median una modulación indirecta del efecto de la 5-HT en este receptor. Estos resultados descartan una modulación cinética como explicación de este fenómeno puesto que la modulación ejercida por celecoxib y valdecoxib se observa tras una preincubación de 30 min de los compuestos antes de la construcción de las CCRA de 5-HT.

Como se ha comentado anteriormente (ver Introducción) no se conoce exactamente el mecanismo por el cual la 5-HT media la contracción del fundus de estómago de rata, con lo que la potenciación observada podría deberse a la propia inhibición de la COX-2 ejercida por estos compuestos. La inhibición de la COX-2 por parte de los coxibs podría favorecer una acumulación de AA. Por otra parte, se ha descrito que los receptores 5-HT_{2B} humanos expresados en líneas celulares estimulan la PLA₂ con la consiguiente liberación de AA (Cussac y cols. 2008), por tanto el AA podría estar implicado en el proceso y contribuir a potenciar la contracción del tejido. Para estudiar este posible mecanismo se llevaron a cabo CCRA de 5-HT en ausencia y presencia de ácido aristolóquico, un inhibidor selectivo de la PLA₂ (Moreno 1993). No se observaron diferencias significativas ni en la potencia (EC₅₀) ni en la eficacia (E_{max}) de la 5-HT en presencia y ausencia de ácido aristolóquico, sin embargo, cuando estas curvas se llevaron a cabo en presencia de celecoxib y valdecoxib se observó un incremento de la eficacia y/o de la potencia de la 5-HT en ambos casos. El hecho de que se observe una potenciación del efecto de la 5-HT en ausencia de AA descarta que el efecto observado se deba a la actividad inhibidora de la COX-2, puesto que si así fuera éste vendría mediado por el AA y, en su ausencia, no se observaría.

La potenciación del efecto de la 5-HT mediada por celecoxib y valdecoxib junto con la pequeña estimulación observada en las CCRA de estos compuestos, sería compatible con una modulación alostérica de ambos compuestos en el receptor 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Otra posibilidad sería un comportamiento ago-alostérico de estos compuestos. Los ligandos ago-alostéricos son aquellos que actúan como agonistas (parciales o totales) de los receptores, pero que cuando se coadministran con el ligando endógeno incrementan su eficacia y/o su potencia desplazando la CCRA del agonista ortostérico hacia la izquierda (Kenakin 2001; Langmead y Christopoulos 2006; Schwartz y Holst 2007)

La forma más adecuada para detectar y validar un agonismo alostérico es determinar el efecto de un antagonista ortostérico en las CCRA del agonista en

presencia del modulador alostérico (Langmead y Christopoulos 2006; May y cols. 2007). En esta situación, la capacidad del antagonista ortostérico para inhibir la contracción mediada por el receptor 5-HT_{2B} disminuiría progresivamente a medida que aumenta la concentración del modulador. Por este motivo se realizaron CCRA en presencia de un antagonista conocido del receptor 5-HT_{2B}: rauwolscina (Villazón y cols. 2003). Se observó que el efecto de la 5-HT es antagonizado por la rauwolscina, con un valor pK_B de 7.28 (pA₂ = 7.52; (Villazón y cols. 2003)). Sin embargo, cuando celecoxib o valdecoxib se co-incubaron con rauwolscina, la CCRA de 5-HT en presencia del antagonista se desplazó a la izquierda, mostrando que el efecto observado con ambos compuestos no se debe a interacciones en el sitio de unión ortostérico de la 5-HT. La co-incubación de rauwolscina con celecoxib o valdecoxib condujo a la reducción de la potenciación de la E_{max} de la 5-HT observada en ausencia de rauwolscina. Esto sugiere que las conformaciones inducidas en el receptor 5-HT_{2B} por la unión simultánea de estos compuestos y un antagonista ortostérico son diferentes de las inducidas cuando se administran solos (May y cols. 2007).

Esta modulación puede ser compatible con un comportamiento agoalostérico en los receptores 5-HT_{2B}, puesto que ligandos que actúan en un sitio alostérico son capaces de aumentar la eficacia del agonista endógeno y también de ejercer un efecto por sí mismos (Smith y cols. 2011). Esta acción se atribuye a un cambio conformacional en los receptores después de la unión alostérica, que promovería un aumento de la población de receptores en conformaciones activas, incrementándose en presencia del agonista ortostérico que, al unirse a las conformaciones activas, desplazaría aún más el equilibrio (May y cols. 2007).

Actualmente existen diversas teorías acerca del lugar de unión de los agonistas alostéricos ya que, de momento, se han caracterizado los lugares de unión de pocos moduladores que actúen como agonistas alostéricos. De todas formas, en todos los casos se ha comprobado que existe un importante solapamiento con el sitio de unión ortostérico del agonista. Por ejemplo el agonista

selectivo por el receptor M_1 AC-42 se describió como un ligando alostérico (Spalding y cols. 2006) que comparte varias posibles interacciones con el agonista carbacol en la parte interna del dominio transmembrana III (Schwartz y Holst 2007). Este solapamiento concuerda con las actividades agonistas, pero el hecho de que además se comporten como moduladores alostéricos no concuerda con la existencia de sitios de unión comunes con el ligando ortostérico, ya que generalmente se propone que un modulador alostérico se una al receptor simultáneamente al ligando ortostérico pero en un sitio de unión distinto para modular la afinidad y/o la función de éste último (Neubig y cols. 2003).

Una posible explicación para este fenómeno (Schwartz y Holst 2007) sería que el modulador ago-alostérico pueda presentar distintos modos de unión al receptor, es decir, cuando se administra solo interacciona con residuos del sitio de unión ortostérico, lo que explicaría su ligera actividad agonista. Sin embargo, en presencia del agonista endógeno, que ocuparía el lugar de unión ortostérico con alta afinidad, el ligando alostérico adoptaría un segundo modo de unión, que sería compatible con el descrito para los moduladores alostéricos. Este modelo se ha propuesto para enlazar los sitios de unión alostéricos y ortostéricos del receptor M_2 (Steinfeld y cols. 2007).

Con el fin de determinar si esta modulación puede ocurrir en el uso terapéutico de estos fármacos, se trataron ratas Sprague-Dawley con celecoxib durante 21 días. La dosis utilizada (30 mg/kg/día) fue seleccionada en base al rango de dosificación (entre la dosis mínima y máxima eficaz en el *paw swelling test*), que es 10-50 mg/kg/día (Niederberger y cols. 2001). Se ha descrito que 24 horas después de la administración el 80-90 % del celecoxib es excretado en ratas macho (Paulson y cols. 2000). En el presente estudio, las ratas se sacrificaron 24 horas después de la administración de la dosis final el día 21, para descartar la posible interferencia de cualquier resto de celecoxib circulante.

El tratamiento indujo un aumento significativo (56 %) en la E_{max} de la 5-HT en los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago en las ratas tratadas respecto a las

ratas control, sin alterar significativamente la EC_{50} . La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes seriados mostró que el tratamiento con celecoxib aumentó la inmunorreactividad y funcionalidad de los receptores 5-HT_{2B} en el fundus de estómago de las ratas tratadas con celecoxib respecto a los controles, lo que sugiere un aumento en la expresión del receptor después de tratamiento con celecoxib, que puede explicar el aumento en la E_{max} de la 5-HT, en base a un fenómeno de *up-regulation* de estos receptores.

Al evaluar inmunohistoquímicamente las válvulas aórtica y mitral, se obtuvieron resultados análogos, la inmunorreactividad en las válvulas de las ratas tratadas fue superior a la presente en las de las ratas control, lo que sugiere que un aumento similar en la sensibilidad de los receptores 5-HT_{2B} puede ocurrir en las válvulas del corazón y por lo tanto refuerza la hipótesis de que estos receptores pueden contribuir a las reacciones adversas asociadas a los inhibidores de la COX-2.

Cuando estas válvulas se estudiaron histológicamente, se comprobó que, pese a no haber diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de tratamiento y el grupo control, el tratamiento con celecoxib fue capaz de promover cambios morfológicos en las válvulas de algunas de las ratas tratadas, similares a los observados en la valvulopatía cardíaca (Bhattacharyya y cols. 2009), básicamente, engrosamiento de la válvula acompañado de un mayor depósito de GAGs, lo que podría llevar a una mala coadaptación de las valvas y los consiguientes problemas de regurgitación valvular.

La *up-regulation* farmacológica se atribuye a una población conformacional de los receptores inducida por el modulador, que sería menos sensible a la internalización y, por lo tanto, el equilibrio entre la internalización y el reciclado se desplaza hacia un aumento en la expresión del receptor (May y cols. 2005). Se han descrito resultados similares a los mostrados aquí en receptores muscarínicos M₂ humanos, en los que la exposición prolongada a los moduladores alostéricos causó la *up-regulation* de la expresión de los mismos en la superficie y aumentó la respuesta celular (May y cols. 2005). May y cols observaron que la exposición

durante 24 horas al modulador alostérico positivos galamina cambió las propiedades de señalización de los receptores mACh M₂ mediante un mecanismo que puede implicar una modificación en las propiedades de internalización de los mismos, lo que se traduciría en una *up-regulation* de estos receptores en la membrana celular.

Con el fin de evaluar si los efectos observados podían ser debidos a un aumento de la 5-HT circulante, se cuantificó su concentración en plasma libre de plaquetas. Los resultados mostraron que el tratamiento con celecoxib no alteró los niveles de 5-HT plasmática.

Para determinar si tendría lugar una modulación similar en los receptores humanos, se evaluaron los efectos de celecoxib y valdecoxib en receptores 5-HT_{2B} humanos recombinantes. En primer lugar se evaluó la afinidad de celecoxib y valdecoxib sobre los receptores 5-HT_{2B} humanos mediante estudios de unión de radioligandos, comprobándose que los compuestos evaluados poseen muy baja afinidad por estos receptores (% de desplazamiento de la unión del radioligando a 10 µM en torno a 20 %).

La elevada homología estructural existente entre los receptores del subtipo 5-HT₂ (Hoyer y cols. 2002), hizo que resultase de interés el evaluar su afinidad por los receptores 5-HT_{2A}. Estos receptores se encuentran en el músculo liso vascular mediando la contracción de los vasos sanguíneos (Roth y cols. 1998), con lo que una activación concomitante de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} aumentaría considerablemente el riesgo de efectos adversos cardiovasculares. Sin embargo, ni celecoxib ni valdecoxib mostraron afinidad por el sitio de unión de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2A}.

Sin embargo, cuando estos compuestos se administraron a las concentraciones plasmáticas terapéuticas (EMA 2005; FDA 2001) en presencia de concentraciones fisiológicas de 5-HT (Kema y cols. 2000), la unión de la 5-HT a los receptores 5-HT_{2B} aumentó significativamente ($P < 0.01$ t test), mostrando que, a

estas dosis, estos compuestos aumentan la afinidad del agonista endógeno por los receptores 5-HT_{2B}.

Estudios cinéticos mostraron que la velocidad de disociación de la 5-HT de los receptores 5-HT_{2B} humanos es muy rápida ($K_{off} = 1,718$ a $1,836 \text{ min}^{-1}$). La tecnología utilizada en los ensayos de unión de radioligandos hace difícil detectar pequeñas variaciones en este rango de tiempos, sin embargo, aunque no significativa, se observó una tendencia de estos compuestos a ralentizar la disociación de la 5-HT. Este efecto cinético es consistente con el perfil de unión observado en los ensayos de unión en el equilibrio, puesto que un mayor tiempo de unión al receptor, puede explicar la potenciación observada.

Para evaluar la repercusión funcional que podría tener la modulación observada, se procedió a la realización de estudios funcionales en la línea celular CHO-5-HT_{2B} humana. Se midió la acumulación de inositol-fosfato después del tratamiento de las células con celecoxib o valdecoxib, observándose que, mientras que el valdecoxib a una concentración equivalente a su dosis terapéutica ($1 \mu\text{M}$) no dio lugar a una estimulación significativa de la acumulación de IP₁, el tratamiento con concentraciones más altas ($10 \mu\text{M}$) activó los receptores en un 5 %. La estimulación de los receptores 5-HT_{2B} por una concentración equivalente a la dosis terapéutica de celecoxib ($10 \mu\text{M}$) fue del 25 % del efecto máximo de la 5-HT. Cuando estos compuestos se co-incubaron con 5-HT, tanto celecoxib como valdecoxib ejercieron un efecto concentración-dependiente potenciando concentraciones bajas de 5-HT ($0.01 - 0.1 \text{ nM}$). Celecoxib ($10 \mu\text{M}$) fue capaz de aumentar la respuesta de bajas concentraciones de 5-HT un 75 %, mientras que el valdecoxib indujo un aumento menor (25 %) a concentraciones superiores a la dosis terapéutica ($10 \mu\text{M}$). Estos datos, junto con la escasa unión observada, sugieren que ambos compuestos podrían estar ejerciendo una modulación del efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} a través de un mecanismo consistente con un alosterismo.

A pesar de la alta homología que presenta este receptor entre diferentes especies (79 % con los receptores de rata), las diferencias observadas entre los receptores 5-HT_{2B} humanos y los receptores 5-HT_{2B} de rata se pueden atribuir a la selectividad interespecie. Sin embargo, se ha descrito que los moduladores alostéricos son capaces de influir en la señalización del receptor mediante la selección de poblaciones conformacionales que son selectivas para una vía efectora con respecto a otra (Kenakin 2009; Keov y cols. 2011; Smith y cols. 2011), lo que proporcionaría más pruebas del posible comportamiento alostérico de estos compuestos. Esto debe ser tenido en cuenta en la interpretación de los resultados mostrados anteriormente, ya que la función en el receptor 5-HT_{2B} humano se caracterizó a través de la medida de la formación de inositol fosfato, mientras que la vía efectora de la contracción inducida por el receptor 5-HT_{2B} en fundus de estómago de rata no está claramente definida (Brea y cols. 2010).

Así, el estudio de inhibidores selectivos de la COX-2 permitió observar que la potenciación indirecta ejercida tanto por celecoxib como por valdecoxib en la respuesta de 5-HT en receptores 5-HT_{2B} tanto de rata como humanos, es compatible con una modulación ago-alostérica. Esto tuvo una correspondencia *ex vivo* puesto que la administración diaria de celecoxib a ratas Sprague Dawley indujo una *up-regulation* de estos receptores tanto en fundus de estómago como en las válvulas cardíacas que, en algunos individuos, vino acompañada de cambios morfológicos en las válvulas similares a los descritos en valvulopatías cardíacas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que esta modulación puede contribuir, al menos en parte, al aumento del riesgo cardiovascular descrito para estos compuestos.

Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT

La fluoxetina inhibe la recaptación de 5-HT y aumenta su biodisponibilidad, además, estudios recientes han demostrado que la fluoxetina, a concentraciones terapéuticas (1 – 2 µM), actúa como agonista del receptor 5-HT_{2B} en cultivos de

astrocitos de ratón. En ellos, la fluoxetina promueve una *up-regulation* de estos receptores e induce los efectos mediados por los mismos: estimulación de la glucogenolisis y aumento del Ca^{+2} libre citosólico (Kong y cols. 2002; Zhang y cols. 2010). Dado que estos cultivos no expresan SERT y cualquier 5-HT presente en el suero añadido al medio de cultivo se metaboliza rápidamente por la elevada actividad monooxidasa en las células, estos resultados no pueden ser causados por la inhibición de la recaptación de 5-HT, sino que deben ser un efecto directo de la fluoxetina (Li y cols. 2008).

Como se ha explicado anteriormente, la activación de los receptores 5-HT_{2B} es crítica para el desarrollo de valvulopatías cardíacas. Se ha demostrado que varios compuestos que activan este receptor causan mitogénesis en células valvulares *in vitro* y provocan valvulopatías en la clínica. En base a todo lo expuesto proponemos la hipótesis de que la interacción de la fluoxetina con los receptores de 5-HT_{2B} podría provocar los efectos cardiovasculares adversos asociados a la activación de este receptor.

Para probar esta hipótesis, en primer lugar, se caracterizó el efecto de la fluoxetina en los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Se comprobó que, en este sistema, la fluoxetina tiene una eficacia pobre por sí misma, incluso a concentraciones muy elevadas, su respuesta máxima es menor que la de la 5-HT (en torno al 35 % a concentraciones superiores a 10 μM).

De acuerdo con la teoría clásica de receptores, un agonista parcial se define como aquel que, en un determinado tejido, no es capaz de provocar un efecto de igual magnitud (incluso a concentraciones elevadas, a las cuales todos los receptores estarían ocupados) que el de un agonista total que actúa a través de los mismos receptores en el mismo tejido. Esto se traduce en que a concentraciones bajas del agonista total, el agonista parcial potenciaría su efecto, sin embargo, a mayores concentraciones, desplazaría la CCRA hacia la derecha actuando como un antagonista, con la consiguiente pérdida de potencia (Kenakin 2001).

Así, los agonistas parciales podrían activar los receptores de forma submaximal cuando están presentes pequeñas cantidades del ligando endógeno, o reducir la sobreestimulación de los mismos cuando éste está en exceso. Como se ha comentado anteriormente esta situación ya ha sido descrita con otros fármacos, las propiedades como agonista parcial del aripiprazol le hacen competir con la dopamina cuando existen altas concentraciones extracelulares de la misma, como por ejemplo en el sistema límbico de pacientes esquizofrénicos, causando un antagonismo parcial con el consiguiente beneficio clínico. Por el contrario, en situaciones en las que la concentración extracelular de dopamina es baja, como por ejemplo en la corteza frontal de los mismos pacientes, el fármaco puede ocupar receptores adicionales y causar una activación parcial (Mailman y Murthy 2010).

Para evaluar esta posibilidad se construyeron CCRA de 5-HT en presencia de fluoxetina. La familia de curvas resultante fue consistente con un comportamiento de la fluoxetina como un agonista parcial, mostrando el punto de corte típico correspondiente a la máxima eficacia de la actividad agonista ($E = 0.20$), y comportándose como un antagonista por encima del punto de corte. De esta forma se revela el carácter dual (agonista-antagonista) de los agonistas parciales, comportamiento ya puesto de manifiesto por otros fármacos que actúan en el SNC como la buspirona o el aripiprazol (Yocca y Altar 2006).

Con el fin de evaluar si esta pequeña activación a bajas concentraciones de 5-HT podría tener repercusiones en el uso terapéutico de la fluoxetina, se realizó un tratamiento de 21 días en ratas Sprague-Dawley con fluoxetina, utilizando dosis (10 mg/kg/día) que simulan la administración diaria típica del tratamiento en humanos (véase Material y Métodos). Se ha descrito que 24 horas después de la administración subcutánea el 90 – 100 % de la fluoxetina ya ha sido excretada en ratas macho (Qu y cols. 2009). En nuestros ensayos las ratas fueron sacrificadas 24 horas después de la última administración para descartar posibles interferencias debidas a fluoxetina circulante.

A diferencia de la situación anteriormente descrita en astrocitos, el bloqueo de la recaptación de 5-HT en plaquetas inducido por fluoxetina sí podría conducir a un aumento en la 5-HT circulante, que podría alcanzar un nivel lo suficientemente alto como para ser capaz de activar, entre otros, los receptores 5-HT_{2B}. Sin embargo, el análisis cuantitativo de la 5-HT en plasma libre de plaquetas mostró que no hay cambios significativos en los niveles de 5-HT plasmática después del tratamiento con fluoxetina. Este resultado concuerda con la idea de que los niveles plasmáticos de 5-HT se autoregulan mediante la modulación de las propiedades cinéticas del SERT en las plaquetas (Brenner y cols. 2007). Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo no pueden explicarse en base a las propiedades inhibitorias de la recaptación de 5-HT ejercidas por la fluoxetina, deben ser atribuidos a un efecto directo de ésta sobre el receptor 5-HT_{2B}.

Cuando se evaluó la respuesta de los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago, se comprobó que, el tratamiento con fluoxetina administrada a dosis equivalentes a las usuales en la terapéutica humana (10 mg/kg/día), indujo un claro desplazamiento de la curva a la derecha en ratas tratadas en comparación con las control (EC₅₀ en los animales tratados 8 veces mayor que en los control). Esta regulación del receptor 5-HT_{2B} podría ser debida a la desensibilización inducida por el agonista, en base al efecto potenciador a dosis bajas observado en los estudios previos al tratamiento.

Por otra parte, este tratamiento aumentó la inmunorreactividad de los receptores 5-HT_{2B} tanto en fundus de estómago como en las válvulas aórtica y mitral. El fenómeno de sobre expresión de receptores 5-HT_{2B} tras el tratamiento con fluoxetina ya ha sido descrito en astrocitos de ratones, en los que se observó que los efectos mediados por el receptor 5-HT_{2B} son inicialmente disminuidos y posteriormente incrementados por la fluoxetina en un periodo de tiempo similar al requerido para obtener respuesta clínica con este fármaco (Kong y cols. 2002). También se observó una mayor inmunorreactividad de los receptores 5-HT_{2B} en las válvulas aórtica y mitral del corazón de los animales tratados en comparación con

los del grupo control, lo que sugiere que un aumento similar en la sensibilidad de estos receptores podría tener lugar en las válvulas cardíacas.

Cuando se estudió la morfología de las válvulas, se detectó que, en comparación con las de los animales del grupo control, las valvas de las válvulas de los animales del grupo sometido a tratamiento mostraron áreas correspondientes a GAGs (zonas blancas) sustancialmente mayores con diversos grados de engrosamiento. Este engrosamiento valvular fue principalmente debido a un mayor contenido en GAGs en las zonas afectadas de la valva de la válvula, no se observaron fibrosis valvular ni infiltración de células inflamatorias. Esta combinación de alteraciones, engrosamiento de la valva acompañado de la correspondiente pérdida de movilidad, puede producir una mala coaptación de las valvas y la consiguiente regurgitación valvular (Bhattacharyya y cols. 2009).

Con el fin de saber si una modulación similar podría tener lugar en los seres humanos, se evaluó el efecto de la fluoxetina en receptores 5-HT_{2B} recombinantes humanos expresados de forma estable en células CHO. En primer lugar, se evaluó su perfil de unión, comprobándose que la fluoxetina se une a los receptores 5-HT_{2B} humanos con baja afinidad. Cuando se llevaron a cabo CCRs de 5-HT en presencia de fluoxetina, se observó que, cuando ésta se administra en concentraciones plasmáticas terapéuticas (EMA 2003; Amsterdam y cols. 1997) en presencia de concentraciones fisiológicas de 5-HT (Kema y cols. 2000), las diferencias en la unión del radioligando parecen corresponder al desplazamiento de éste por parte de la propia fluoxetina, sin observarse ningún desplazamiento adicional que implicara un cambio en la afinidad de la 5-HT.

Para determinar la relevancia funcional del comportamiento observado, se midió la acumulación de inositol-fosfato después del tratamiento de las células CHO-K1 5-HT_{2B} con fluoxetina. La fluoxetina mostró una potenciación concentración-dependiente del efecto máximo de 5-HT, estimulando los receptores 5-HT_{2B} en un 20 % con respecto al efecto máximo de 5-HT a dosis muy cercanas al umbral superior de su intervalo de concentración plasmática (2 µM).

Como se comentó anteriormente, las diferencias en la potencia en los receptores humanos y en los de rata, no sólo deben ser atribuidas a una selectividad interespecies, sino también al hecho de que algunos fármacos son capaces influir en la señalización del receptor mediante la selección de poblaciones conformacionales selectivas para una vía efectora con respecto a otra (Mailman y Murthy 2010). Fenómenos de selectividad funcional ya se han descrito para los receptores 5-HT_{2B}, con ligandos agonistas de estos receptores mostrando diferentes grados de eficacia en función de la vía de señalización evaluada (Cussac y cols. 2008). Al igual que en el caso de los inhibidores de la COX-2, esto debe ser tenido en cuenta en nuestros ensayos porque en los receptores 5-HT_{2B} humanos se caracterizó la función a través de la medida de la formación de inositol-fosfatos, mientras que la vía efectora en la contracción del tejido inducida por los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata sigue sin estar completamente definida (Brea y cols. 2010).

Así, la fluoxetina se comportó como un agonista parcial débil tanto de receptores 5-HT_{2B} de rata como humanos. Esto se tradujo en una regulación de los mismos tras una administración diaria de fluoxetina a ratas Sprague-Dawley tanto a nivel de fundus como de válvulas cardíacas. En este modelo animal, los resultados establecen la relación entre la concentración de fluoxetina y la posible estimulación del receptor 5-HT_{2B}, sin embargo es necesario destacar la importancia de controlar la dosis de fluoxetina para evitar llegar a ese límite en la concentración plasmática (2 µM) durante el tratamiento antidepresivo. Esto puede ser más relevante a dosis elevadas y en los pacientes que presenten algún tipo de deficiencia en el citocromo CYP2D6 (metabolizadores pobres) (Alfaro y cols. 2000; Bertilsson y cols. 2002).

En resumen: i) el estudio de inhibidores selectivos de la COX-2 permitió observar que la potenciación indirecta ejercida tanto por celecoxib como por valdecoxib en la respuesta de 5-HT en receptores 5-HT_{2B} tanto de rata como humanos, es compatible con una modulación ago-alostérica que puede contribuir, al menos en parte, al aumento del riesgo cardiovascular descrito para estos compuestos; ii) la fluoxetina se comportó como un agonista parcial débil tanto de receptores 5-HT_{2B} de rata como humanos, esto puede ser más relevante a dosis elevadas y en los pacientes que presenten algún tipo de deficiencia en el citocromo CYP2D6 (metabolizadores pobres).







CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Celecoxib y valdecoxib, mostraron baja eficacia en los receptores 5-HT_{2B} de rata (8.1 y 13.9 % de la E_{max} de la 5-HT respectivamente) y humanos (26 y 4 % de la E_{max} de la 5-HT respectivamente).
2. Celecoxib y valdecoxib, a las concentraciones terapéuticas, incrementaron tanto la potencia (EC₅₀) como la eficacia (E_{max}) de la 5-HT en los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata. Esta potenciación se mantuvo tanto en presencia de un antagonista ortostérico del receptor, rauwolscina, como en presencia de un inhibidor de la PLA₂, ác. aristolóquico.
3. Celecoxib, a concentraciones terapéuticas, y valdecoxib, a altas concentraciones, incrementaron de forma significativa la afinidad de la 5-HT por los receptores 5-HT_{2B} humanos y potenciaron el efecto de bajas concentraciones de la misma.
4. La modulación observada del efecto de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} de rata y humano, es compatible con un comportamiento ago-alostérico de celecoxib y valdecoxib en este receptor.
5. El tratamiento con celecoxib durante 21 días incrementó la inmunorreactividad y modificó la funcionalidad del receptor 5-HT_{2B} en fundus de estómago de rata, potenciando significativamente la eficacia de la 5-HT. Un incremento similar en la inmunorreactividad también se observó en las válvulas cardíacas tras el tratamiento.
6. Se observaron cambios estructurales en las válvulas de las ratas tratadas con celecoxib similares a los descritos en las valvulopatías cardíacas inducidas por fármacos.
7. La fluoxetina activa los receptores 5-HT_{2B} de rata con baja eficacia (35 % de la E_{max} de la 5-HT).
8. La fluoxetina potenció el efecto de concentraciones bajas de 5-HT en los receptores 5-HT_{2B} de fundus de estómago de rata, mostrando un punto de

corte con la curva de 5-HT ($\epsilon = 0.20$), y, por encima de él, un comportamiento antagonista desplazando las curvas a la derecha.

- 9.** La fluoxetina, a pesar de su afinidad por estos receptores ($K_i = 2514$ nM), mostró muy baja eficacia en los receptores 5-HT_{2B} humanos, observándose únicamente una ligera activación a 100 μ M.
- 10.** El comportamiento observado con fluoxetina en el receptor 5-HT_{2B} de rata y humano es compatible con un agonismo parcial débil.
- 11.** El tratamiento con fluoxetina durante 21 días incrementó la inmunorreactividad y modificó la funcionalidad del receptor 5-HT_{2B} en fundus de estómago de rata, disminuyendo su respuesta a 5-HT. Un incremento similar en la inmunorreactividad también se observó en las válvulas cardíacas tras el tratamiento.
- 12.** Se observaron cambios estructurales en las válvulas de las ratas tratadas con fluoxetina similares a los descritos en las valvulopatías cardíacas inducidas por fármacos. Estas alteraciones fueron significativas en el caso de las válvulas aórticas.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios AEMPS - Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA).
<http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>.
- Aikawa E, Whittaker P, Farber M, Mendelson K, Padera RF, Aikawa M, et al. (2006) Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation* 113:1344–52.
- Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100:158–73.
- Alderman CP, Moritz CK, Ben-Tovim DI (1992) Abnormal platelet aggregation associated with fluoxetine therapy. *Ann Pharmacother* 26:1517–9.
- Alfaro CL, Lam YW, Simpson J, Ereshefsky L (2000) CYP2D6 inhibition by fluoxetine, paroxetine, sertraline, and venlafaxine in a crossover study: intraindividual variability and plasma concentration correlations. *J Clin Pharmacol* 40:58–66.
- Alvarez JC, Gluck N, Fallet a, Grégoire a, Chevalier JF, Advenier C, et al. (1999) Plasma serotonin level after 1 day of fluoxetine treatment: a biological predictor for antidepressant response? *Psychopharmacology (Berl)* 143:97–101.
- Amsterdam JD, Fawcett J, Quitkin FM, Reimherr FW, Rosenbaum JF, Michelson D, et al. (1997) Fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations in major depression: a multicenter study. *Am J Psychiatry* 154:963–9.
- Anderson IM (2000) Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 58:19–36.
- Andrade R, Barnes NM, Baxter G, Bockaert J, Branchek T, Cohen ML, et al. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{2B} receptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB). <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR>.
- Bass A, Kinter L, Williams P (2004) Origins, practices and future of safety pharmacology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49:145–51.

- Baxter GS, Murphy OE, Blackburn TP (1994) Further characterization of 5-hydroxytryptamine receptors (putative 5-HT_{2B}) in rat stomach fundus longitudinal muscle. *Br J Pharmacol* 112:323–31.
- Berg K a, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 54:94–104.
- Berg KA, Clarke WP (2006) Development of functionally selective agonists as novel therapeutic agents. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3:421–428.
- Bertilsson L, Dahl M-L, Dalén P, Al-Shurbaji A (2002) Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 53:111–22.
- Bhattacharyya S, Schapira AH, Mikhailidis DP, Davar J (2009) Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet* 374:577–85.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, et al. (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520–8.
- Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, et al. (1995) The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br J Pharmacol* 115:622–8.
- Borman RA, Burleigh DE (1997) 5-HT_{1D} and 5-HT_{2B} receptors mediate contraction of smooth muscle in human small intestine. *Ann N Y Acad Sci* 812:222–3.
- Borman RA, Burleigh DE (1995) Functional evidence for a 5-HT_{2B} receptor mediating contraction of longitudinal muscle in human small intestine. *Br J Pharmacol* 114:1525–7.
- Borman RA, Tilford NS, Harmer DW, Day N, Ellis ES, Sheldrick RLG, et al. (2002) 5-HT_{2B} receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *Br J Pharmacol* 135:1144–51.
- Bowes J, Brown AJ, Hamon J, Jarolimek W, Sridhar A, Waldron G, et al. (2012) Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat Rev Drug Discov* 11:909–22.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54.
- Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, et al. (1986) Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25:563–76.
- Brea J, Castro-Palomino J, Yeste S, Cubero E, Párraga A, Domínguez E, et al. (2010) Emerging opportunities and concerns for drug discovery at serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Curr Top Med Chem* 10:493–503.
- Brenner B, Harney JT, Ahmed B a, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, et al. (2007) Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem* 102:206–15.
- Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. (2005) Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 352:1092–102.
- Bridges TM, Lindsley CW (2008) G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol* 3:530–41.
- Brink CB, Harvey BH, Bodenstein J, Venter DP, Oliver DW (2004) Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 57:373–87.
- Bunting S, Moncada S, Vane JR (1983) The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull* 39:271–6.
- Cadavid MI (2013) Contestación al discurso de ingreso en la Academia de Farmacia de Galicia de la Ilma. Sra. Dña. María Isabel Loza García.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–108.
- Choi DS, Colas JF, Kellermann O, Loric S, Launay JM, Rosay P, et al. (1994) The mouse 5-HT_{2B} receptor: possible involvement in trophic functions of serotonin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40:403–11.
- Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323–74.

- Clineschmidt B V, Reiss DR, Pettibone DJ, Robinson JL (1985) Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors in rat stomach fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 235:696–708.
- Cohen ML, Wittenauer LA (1987) Serotonin receptor activation of phosphoinositide turnover in uterine, fundal, vascular, and tracheal smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 10:176–81.
- Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD, et al. (1997) Valvular heart disease associated with fenfluramine-phentermine. *N Engl J Med* 337:581–8.
- Costa T, Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7321–5.
- Cosyns B, Droogmans S, Rosenhek R, Lancellotti P (2012) Drug-induced valvular heart disease. *Heart*. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302239Heart
- Cox D a, Cohen ML (1996) 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C. *Behav Brain Res* 73:289–92.
- Cox DA, Blase DK, Cohen ML (1999) Bradykinin and phorbol ester but not 5-HT_{2B} receptor activation stimulate phospholipase D activity in the rat stomach fundus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23:697–704.
- Cox DA, Cohen ML (1995) 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 272:143–50.
- Cussac D, Boutet-Robinet E, Ailhaud M-C, Newman-Tancredi A, Martel J-C, Danty N, et al. (2008) Agonist-directed trafficking of signalling at serotonin 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C}-VSV receptors mediated Gq/11 activation and calcium mobilisation in CHO cells. *Eur J Pharmacol* 594:32–8.
- Dahlström A, Fuxe K (1964a) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–9.
- Dahlström A, Fuxe K (1964b) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 232:1–55.
- Daubert EA, Condrón BG (2010) Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci* 33:424–34.

- Doly S, Valjent E, Setola V, Callebert J, Hervé D, Launay JM, et al. (2008) Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hyperlocomotion and 5-HT release in vivo and in vitro. *J Neurosci* 28:2933–40.
- Donnelly KB (2008) Cardiac valvular pathology: comparative pathology and animal models of acquired cardiac valvular diseases. *Toxicol Pathol* 36:204–17.
- Droogmans S, Cosyns B, D'haenen H, Creten E, Weytjens C, Franken PR, et al. (2007) Possible association between 3,4-methylenedioxymethamphetamine abuse and valvular heart disease. *Am J Cardiol* 100:1442–5.
- Elangbam CS (2010) Drug-induced valvulopathy: an update. *Toxicol Pathol* 38:837–48.
- Elangbam CS, Job LE, Zadrozny LM, Barton JC, Yoon LW, Gates LD, et al. (2008) 5-hydroxytryptamine (5HT)-induced valvulopathy: compositional valvular alterations are associated with 5HT_{2B} receptor and 5HT transporter transcript changes in Sprague-Dawley rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 60:253–62.
- Elangbam CS, Wehe JG, Barton JC, Krull DL, Nyska A, Crabbs T, et al. (2006) Evaluation of glycosaminoglycans content and 5-hydroxytryptamine 2B receptor in the heart valves of Sprague-Dawley rats with spontaneous mitral valvulopathy--a possible exacerbation by dl-amphetamine sulfate in Fischer 344 rats? *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 58:89–99.
- EMA (2005) Celecoxib Scientific Discussion.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000466/WC500044630.pdf.
- EMA (2003) EMEA/CPMP/3263/03 Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP).
http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Prozac_30/WC500009447.pdf.
- Enguix MJ, Sánchez L, Villazón M, Brea J, Tristán H, Caruncho HJ, et al. (2003) Differential regulation of rat peripheral 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptor systems: influence of drug treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:79–90.
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800–1.

EU-ADR Project. EU-ADR Project website. <http://www.eu-adr-project.com/>.

Fabre V, Beaufour C, Evrard A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, et al. (2000) Altered expression and functions of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 12:2299–310.

FDA Fluoxetine Hydrochloride Approved Labeling Enclosure (NDA 18-936/S-064). http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/018936s064lbl.pdf.

FDA (2001) Valdecoxib Evaluation. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2001/21-341_Bextra_biopharmr_P1.pdf.

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1–24.

File SE, Ouagazzal AM, Gonzalez LE, Overstreet DH (1999) Chronic fluoxetine in tests of anxiety in rat lines selectively bred for differential 5-HT_{1A} receptor function. *Pharmacol Biochem Behav* 62:695–701.

Fitzgerald GA, Catella F, Oates JA (1987) Eicosanoid biosynthesis in human cardiovascular disease. *Hum Pathol* 18:248–52.

FitzGerald GA, Patrono C (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345:433–42.

Fitzgerald LW, Burn TC, Brown BS, Patterson JP, Corjay MH, Valentine P a, et al. (2000) Possible role of valvular serotonin 5-HT_{2B} receptors in the cardiopathy associated with fenfluramine. *Mol Pharmacol* 57:75–81.

Friedman EH (1991) Fluoxetine-induced bradycardia. *J Clin Psychiatry* 52:477.

Fryer RM, Muthukumarana A, Chen RR, Smith JD, Mazurek SN, Harrington KE, et al. (2012) Mitigation of off-target adrenergic binding and effects on cardiovascular function in the discovery of novel ribosomal S6 kinase 2 inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 340:492–500.

Fu L-W, Longhurst JC (2002) Activated platelets contribute to stimulation of cardiac afferents during ischaemia in cats: role of 5-HT₃ receptors. *J Physiol* 544:897–912.

Fundació Institut Català de Farmacologia (2002) Las supuestas ventajas de celecoxib y rofecoxib: fraude científico. *butlletí Groc* 15:13–15.

- Funk CD, FitzGerald GA (2007) COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:470–9.
- Gardner SF, Rutherford WF, Munger MA, Panacek EA (1991) Drug-induced supraventricular tachycardia: a case report of fluoxetine. *Ann Emerg Med* 20:194–7.
- Gerhardt CC, Van Heerikhuizen H (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 334:1–23.
- Golan M, Schreiber G, Avissar S (2009) Antidepressants, beta-arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions. *Curr Pharm Des* 15:1699–708.
- Goldstein DJ, Roon KI, Offen WW, Ramadan NM, Phebus LA, Johnson KW, et al. (2001) Selective serotonin 1F (5-HT_{1F}) receptor agonist LY334370 for acute migraine: a randomised controlled trial. *Lancet* 358:1230–4.
- Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V, Wight TN, Hascall VC, Vesely I (2004) Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordae: association with regions of tensile and compressive loading. *Glycobiology* 14:621–33.
- Graudins A, Vossler C, Wang R (1997) Fluoxetine-induced cardiotoxicity with response to bicarbonate therapy. *Am J Emerg Med* 15:501–3.
- Gunzberger DW, Martinez D (1992) Adverse vascular effects associated with fluoxetine. *Am J Psychiatry* 149:1751.
- Gupta V, Barzilla JE, Mendez JS, Stephens EH, Lee EL, Collard CD, et al. (2009) Abundance and location of proteoglycans and hyaluronan within normal and myxomatous mitral valves. *Cardiovasc Pathol* 18:191–7.
- Gurwitz JH, Avorn J, Bohn RL, Glynn RJ, Monane M, Mogun H (1994) Initiation of antihypertensive treatment during nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *JAMA* 272:781–6.
- Gustafsson BI, Tømmerås K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligård E, et al. (2005) Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* 111:1517–22.
- Hansen MB, Arif F, Gregersen H, Bruusgaard H, Wallin L (2008) Effect of serotonin on small intestinal contractility in healthy volunteers. *Physiol Res* 57:63–71.

- Hawkey CJ (2006) NSAIDs, coxibs, and the intestine. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 1:S72–5.
- Hegde SS, Eglén RM (1996) Peripheral 5-HT₄ receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10:1398–407.
- Heitzler D, Crépieux P, Poupon A, Clément F, Fages F, Reiter E (2009) Towards a systems biology approach of G protein-coupled receptor signalling: challenges and expectations. *C R Biol* 332:947–57.
- Helton LA, Thor KB, Baez M (1994) 5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, and 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor mRNA expression in the spinal cord of rat, cat, monkey and human. *Neuroreport* 5:2617–20.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–54.
- Huang X, Setola V, Yadav PN, Allen JA, Rogan SC, Hanson BJ, et al. (2009) Parallel functional activity profiling reveals valvulopathogens are potent 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor agonists: implications for drug safety assessment. *Mol Pharmacol* 76:710–22.
- Hutcheson JD, Setola V, Roth BL, Merryman WD (2011) Serotonin receptors and heart valve disease—it was meant to be. *Pharmacol Ther* 132:146–57.
- Jaffré F, Bonnin P, Callebert J, Debbabi H, Setola V, Doly S, et al. (2009) Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ Res* 104:113–23.
- Jaffré F, Callebert J, Sarre A, Etienne N, Nebigil CG, Launay JM, et al. (2004) Involvement of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor- α cytokine production by ventricular fibroblasts. *Circulation* 110:969–74.
- Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273:17299–302.
- Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, et al. (2002) Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor- β 1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 161:2111–21.

- Jockers R, Angers S, Da Silva A, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M, et al. (1999) Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* 274:28900–8.
- Johnson AG (1997) NSAIDs and increased blood pressure. What is the clinical significance? *Drug Saf* 17:277–89.
- Jones N, King SM, Duxon MS (2002) Further evidence for the predictive validity of the unstable elevated exposed plus-maze, a behavioural model of extreme anxiety in rats: differential effects of fluoxetine and chlordiazepoxide. *Behav Pharmacol* 13:525–35.
- Kantor S, Jakus R, Balogh B, Benko A, Bagdy G (2004) Increased wakefulness, motor activity and decreased theta activity after blockade of the 5-HT_{2B} receptor by the subtype-selective antagonist SB-215505. *Br J Pharmacol* 142:1332–42.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, et al. (1996) Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 111:445–54.
- Kaumann AJ, Levy FO (2006) 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 111:674–706.
- Kaumann AJ, Parsons AA, Brown AM (1993) Human arterial constrictor serotonin receptors. *Cardiovasc Res* 27:2094–103.
- Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C (2006) Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 332:1302–8.
- Kelly CR, Sharif NA (2006) Pharmacological evidence for a functional serotonin-2B receptor in a human uterine smooth muscle cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 317:1254–61.
- Kema IP, De Vries EG, Muskiet F a (2000) Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 747:33–48.
- Kenakin T (1995) Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16:232–8.
- Kenakin T (2005) New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 4:919–27.

- Kenakin T (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:407–15.
- Kenakin T (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:598–611.
- Kenakin T (2009) Biased agonism. *F1000 Biol Rep* 1:87.
- Kennett GA, Bright F, Trail B, Baxter GS, Blackburn TP (1996) Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br J Pharmacol* 117:1443–8.
- Kennett GA, Trail B, Bright F (1998) Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT_{2B} receptor mediated. *Neuropharmacology* 37:1603–10.
- Keov P, Sexton PM, Christopoulos A (2011) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. *Neuropharmacology* 60:24–35.
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768:794–807.
- Kola I, Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3:711–5.
- Kong EKC, Peng L, Chen Y, Yu ACH, Hertz L (2002) Up-regulation of 5-HT_{2B} receptor density and receptor-mediated glycogenolysis in mouse astrocytes by long-term fluoxetine administration. *Neurochem Res* 27:113–20.
- Kujubu DA, Herschman HR (1992) Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 267:7991–4.
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Baez M (1994) Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor. *Mol Pharmacol* 46:227–34.
- Langmead CJ (2012) Ligand properties and behaviours in an allosteric age. *Trends Pharmacol Sci* 33:621–2.
- Langmead CJ, Christopoulos A (2006) Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox. *Trends Pharmacol Sci* 27:475–81.

- Lauder JM, Wilkie MB, Wu C, Singh S (2000) Expression of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors in the mouse embryo. *Int J Dev Neurosci* 18:653–62.
- Launay J, Hervé P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, et al. (2002) Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 8:1129–35.
- Launay JM, Schneider B, Loric S, Da Prada M, Kellermann O (2006) Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1843–54.
- Layton D, Souverein PC, Heerdink ER, Shakir SAW, Egberts ACG (2008) Evaluation of risk profiles for gastrointestinal and cardiovascular adverse effects in nonselective NSAID and COX-2 inhibitor users: a cohort study using pharmacy dispensing data in The Netherlands. *Drug Saf* 31:143–58.
- Leach K, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 28:382–9.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512–7.
- Leysen JE (2004) 5-HT₂ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:11–26.
- Li B, Zhang S, Li M, Hertz L, Peng L (2009) Chronic treatment of astrocytes with therapeutically relevant fluoxetine concentrations enhances cPLA₂ expression secondary to 5-HT_{2B}-induced, transactivation-mediated ERK1/2 phosphorylation. *Psychopharmacology (Berl)* 207:1–12.
- Li B, Zhang S, Zhang H, Nu W, Cai L, Hertz L, et al. (2008) Fluoxetine-mediated 5-HT_{2B} receptor stimulation in astrocytes causes EGF receptor transactivation and ERK phosphorylation. *Psychopharmacology (Berl)* 201:443–58.
- Loza MI (2013) Hacia la innovación abierta en descubrimiento temprano de fármacos.
- Lummis SCR (2012) 5-HT(3) receptors. *J Biol Chem* 287:40239–45.
- Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39:239–64.

- Mahimkar R, Nguyen A, Mann M, Yeh C-C, Zhu B-Q, Karliner JS, et al. (2009) Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression induces myxomatous valve degeneration: a potential model of mitral valve prolapse disease. *Cardiovasc Pathol* 18:253–61.
- Mailman RB, Murthy V (2010) Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? *Curr Pharm Des* 16:488–501.
- Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368–76.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P (1990) Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 86:1375–9.
- May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1–51.
- May LT, Lin Y, Sexton PM, Christopoulos A (2005) Regulation of M2 muscarinic acetylcholine receptor expression and signaling by prolonged exposure to allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther* 312:382–90.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini I a, Kapoor S, Lawson J a, FitzGerald G a (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:272–7.
- McDonald PC, Wilson JE, Gao M, McNeill S, Spinelli JJ, Williams OD, et al. (2002) Quantitative analysis of human heart valves: does anorexigen exposure produce a distinctive morphological lesion? *Cardiovasc Pathol* 11:251–62.
- Meade EA, Smith WL, DeWitt DL (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268:6610–4.
- Meier CR, Schlienger RG, Jick H (2001) Use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of developing first-time acute myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol* 52:179–84.
- Mercado CP, Kilic F (2010) Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* 10:231–41.
- Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C (2008) Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* 29:454–64.

- Mohr B, Bom AH, Kaumann AJ, Thämer V (1987) Reflex inhibition of efferent renal sympathetic nerve activity by 5-hydroxytryptamine and nicotine is elicited by different epicardial receptors. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 409:145–51.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663–5.
- De Montigny C, Pineyro G, Chaput Y, Blier P (1992) Electrophysiological studies on the effect of long-term 5-HT reuptake inhibition on the function of 5-HT neurons. *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1:440A–441A.
- Moreno JJ (1993) Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and in vivo models of inflammation. *Immunopharmacology* 26:1–9.
- Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, et al. (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9508–13.
- Neely JL (1998) Tonic clonic seizures and tachycardia induced by fluoxetine (Prozac) overdose. *W V Med J* 94:283–5.
- Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskowitz MA (1986) Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:674–8.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 55:597–606.
- Nic Dhonnchadha BA, Ripoll N, Clénet F, Hascoët M, Bourin M (2005) Implication of 5-HT₂ receptor subtypes in the mechanism of action of antidepressants in the four plates test. *Psychopharmacology (Berl)* 179:418–29.
- Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev* 108:1614–41.
- Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidt A, Schmidt H, Euchenhofer C, et al. (2001) Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF- κ B. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:1622–4.
- Oldham WM, Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39:117–66.

- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5:993–6.
- Pacher P, Kecskemeti V (2004) Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? *Curr Pharm Des* 10:2463–75.
- Pacher P, Ungvari Z, Nanasi PP, Furst S, Kecskemeti V (1999) Speculations on difference between tricyclic and selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants on their cardiac effects. Is there any? *Curr Med Chem* 6:469–80.
- Pak Y, O'Dowd BF, Wang JB, George SR (1999) Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274:27610–6.
- Pakala R, Willerson JT, Benedict CR (1994) Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* 90:1919–26.
- Paranya G, Vineberg S, Dvorin E, Kaushal S, Roth SJ, Rabkin E, et al. (2001) Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *Am J Pathol* 159:1335–43.
- Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G (2004) Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126:234S–264S.
- Patrono C, Rocca B (2009) Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. *Pharmacol Res* 59:285–9.
- Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, et al. (2000) Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 28:514–21.
- Peretti S, Judge R, Hindmarch I (2000) Safety and tolerability considerations: tricyclic antidepressants vs. selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 403:17–25.
- Poole D, Bertolini G, Garattini S (2009) Errors in the approval process and post-marketing evaluation of drotrecogin alfa (activated) for the treatment of severe sepsis. *Lancet Infect Dis* 9:67–72.

- Porter RH, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, et al. (1999) Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 128:13–20.
- Pritchett AM, Morrison JF, Edwards WD, Schaff H V, Connolly HM, Espinosa RE (2002) Valvular heart disease in patients taking pergolide. *Mayo Clin Proc* 77:1280–6.
- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M (2011) Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60:15–25.
- Qu Y, Aluisio L, Lord B, Boggs J, Hoey K, Mazur C, et al. (2009) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 92:469–73.
- Qu Y, Chang L, Klaff J, Seemann R, Greenstein D, Rapoport SI (2006) Chronic fluoxetine upregulates arachidonic acid incorporation into the brain of unanesthetized rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:561–71.
- Rapport MM (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem* 180:961–9.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948b) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243–51.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948a) Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem* 174:735–41.
- Raymond JR, Mukhin Y V, Gelasco a, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, et al. (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92:179–212.
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115–26.
- Van Rossum J (1963) Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 143:299–330.
- Roth BL (2007) Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* 356:6–9.
- Roth BL National Institute of Mental Health's Psychoactive Drug Screening Program (NIMH PDSP). <http://pdsp.med.unc.edu/indexR.html>.

- Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK (1998) 5-Hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol Ther* 79:231–57.
- Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, et al. (2000) Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* 102:2836–41.
- Roumie CL, Choma NN, Kaltenbach L, Mitchel EF, Arbogast PG, Griffin MR (2009) Non-aspirin NSAIDs, cyclooxygenase-2 inhibitors and risk for cardiovascular events-stroke, acute myocardial infarction, and death from coronary heart disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 18:1053–63.
- Sandén N, Thorlin T, Blomstrand F, Persson PA, Hansson E (2000) 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* 36:427–34.
- Sauer WH, Berlin J a., Kimmel SE (2001) Selective serotonin reuptake inhibitors and myocardial infarction. *Circulation* 104:1894–8.
- Schade R, Andersohn F, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E (2007) Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Engl J Med* 356:29–38.
- Schmuck K, Ullmer C, Engels P, Lübbert H (1994) Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Lett* 342:85–90.
- Schoen FJ (1997) Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination. *J Heart Valve Dis* 6:1–6.
- Schoen FJ (2005) Cardiac valves and valvular pathology: update on function, disease, repair, and replacement. *Cardiovasc Pathol* 14:189–94.
- Schoen FJ (2006) New frontiers in the pathology and therapy of heart valve disease: 2006 Society for Cardiovascular Pathology, Distinguished Achievement Award Lecture, United States-Canadian Academy of Pathology, Atlanta, GA, February 12, 2006. *Cardiovasc Pathol* 15:271–9.
- Schwartz TW, Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci* 28:366–73.

- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, et al. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12013–7.
- Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:381–416.
- Setola V, Roth BL (2005) Screening the receptorome reveals molecular targets responsible for drug-induced side effects: focus on “fen-phen”. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1:377–87.
- Sghendo L, Mifsud J (2012) Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *J Pharm Pharmacol* 64:317–25.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284:1247–55.
- Smith NJ, Bennett K a, Milligan G (2011) When simple agonism is not enough: emerging modalities of GPCR ligands. *Mol Cell Endocrinol* 331:241–7.
- Snodin DJ (2002) An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. *Toxicol Lett* 127:161–8.
- Solomon DH, Glynn RJ, Levin R, Avorn J (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 162:1099–104.
- Solomon SD, Wittes J, Finn P V, Fowler R, Viner J, Bertagnolli MM, et al. (2008) Cardiovascular risk of celecoxib in 6 randomized placebo-controlled trials: the cross trial safety analysis. *Circulation* 117:2104–13.
- Spalding TA, Ma J-N, Ott TR, Friberg M, Bajpai A, Bradley SR, et al. (2006) Structural requirements of transmembrane domain 3 for activation by the M1 muscarinic receptor agonists AC-42, AC-260584, clozapine, and N-desmethylclozapine: evidence for three distinct modes of receptor activation. *Mol Pharmacol* 70:1974–83.
- Spalding WM, Reeves MJ, Whelton A (2007) Thromboembolic cardiovascular risk among arthritis patients using cyclooxygenase-2-selective inhibitor or nonselective cyclooxygenase inhibitor nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Ther* 14:3–12.

- Steinfeld T, Mammen M, Smith JAM, Wilson RD, Jasper JR (2007) A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 72:291–302.
- Sun Y, McGarrigle D, Huang X-Y (2007) When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst* 3:849–54.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520:97–101.
- Tournois C, Mutel V, Manivet P, Launay JM, Kellermann O (1998) Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 273:17498–503.
- Trejo J, Hammes SR, Coughlin SR (1998) Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13698–702.
- Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, et al. (2011) Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ* 342:c7086.
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175:157–61.
- Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lübbert H (1995) Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett* 370:215–21.
- Urban JD, Clarke WP, Von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1–13.
- Vane JR (1957) A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother* 12:344–9.
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232–5.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97–120.
- Verheggen R, Meier A, Werner I, Wienekamp A, Kruschat T, Brattelid T, et al. (2004) Functional 5-HT receptors in human occipital artery. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 369:391–401.

- Villazón M, Enguix MJ, Tristán H, Honrubia MÁ, Brea J, Maayani S, et al. (2003) Different pharmacological properties of two equipotent antagonists (Clozapine and Rauwolscine) for 5-HT_{2B} receptors in rat stomach fundus. *Biochemical Pharmacology* 66:927–937.
- Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 95:253–60.
- Wang J, Urban L (2004) The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery World* 73–86.
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7563–8.
- Warner TD, Mitchell JA (2008) COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 371:270–3.
- Watson DJ, Rhodes T, Cai B, Guess HA (2002) Lower risk of thromboembolic cardiovascular events with naproxen among patients with rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med* 162:1105–10.
- Wheeler DL, Iida M, Dunn EF (2009) The role of Src in solid tumors. *Oncologist* 14:667–78.
- Whigham LD, Dhurandhar N V, Rahko PS, Atkinson RL (2007) Comparison of combinations of drugs for treatment of obesity: body weight and echocardiographic status. *Int J Obes (Lond)* 31:850–7.
- Wight TN (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14:617–23.
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57:411–41.
- Wong DT, Horng JS, Bymaster FP, Hauser KL, Molloy BB (1974) A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci* 15:471–9.

- Wouters MM, Gibbons SJ, Roeder JL, Distad M, Ou Y, Strege PR, et al. (2007) Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of Cajal in mouse jejunum through 5-HT_{2B} receptors. *Gastroenterology* 133:897–906.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2692–6.
- Yocca F, Altar CA (2006) Partial agonism of dopamine, serotonin and opiate receptors for psychiatry. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3:429–435.
- Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesei S, Pezzoli G (2007) Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 356:39–46.
- Zhang S, Li B, Lovatt D, Xu J, Song D, Goldman S a, et al. (2010) 5-HT_{2B} receptors are expressed on astrocytes from brain and in culture and are a chronic target for all five conventional "serotonin-specific reuptake inhibitors". *Neuron Glia Biol* 6:113–25.
- Zhang X, Peng L, Chen Y, Hertz L (1993) Stimulation of glycogenolysis in astrocytes by fluoxetine, an antidepressant acting like 5-HT. *Neuroreport* 4:1235–8.
- Zopf DA, Das Neves LAA, Nikula KJ, Huang J, Senese PB, Gralinski MR (2011) C-122, a novel antagonist of serotonin receptor 5-HT_{2B}, prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* 670:195–203.





RESUMEN

Algunos inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina presentan un mayor riesgo de eventos adversos cardiovasculares, sin embargo, el mecanismo concreto subyacente es aún desconocido. En este trabajo se plantea la hipótesis de que la modulación de los receptores 5-HT_{2B} de serotonina podría ser la responsable, al menos en parte, de estos efectos. Observamos que celecoxib y valdecoxib presentan un comportamiento compatible con una modulación alostérica de la 5-HT en el receptor 5-HT_{2B} humano y de rata, mientras que la fluoxetina es un agonista parcial débil de estos receptores. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la modulación del efecto de la 5-HT en el receptor 5HT_{2B} podría contribuir al aumento del riesgo cardiovascular asociado a los coxibs y los ISRS.

