

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 346**

51 Int. Cl.:

A61K 31/138 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2016 PCT/EP2016/066948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17013031**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2016 E 16739465 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 3324952**

54 Título: **Agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B para utilizarse como un promotor de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite**

30 Prioridad:

17.07.2015 US 201562193714 P

15.04.2016 EP 16305444

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (25.0%)

28 rue du Docteur Roux

75015 Paris, FR;

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%);

GROUPE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE PARIS -

PSYCHIATRIE ET NEUROSCIENCES (25.0%) y

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (25.0%)

72 Inventor/es:

CHRETIEN, FABRICE, BRUNO;

GAILLARD, RAPHAEL;

ROCHETEAU, PIERRE y

MIR, OLIVIER

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 862 346 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B para utilizarse como un promotor de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite

5

Introducción

La presente invención se refiere al campo de la regeneración de músculos y más en particular a la reposición del conjunto de células madre musculares *in vivo*. Se refiere más específicamente a un agente que estimula, directa o indirectamente, el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B, y a una composición que comprende dicho agente, para la utilización como i) un promotor de autorrenovación y/o diferenciación de células satélite, y/o ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite. La invención comprende además métodos terapéuticos y de cribado.

10

Las células satélite son células madre musculares que se encuentran entre una miofibra y su lámina basal, y que participan en el desarrollo y la regeneración del tejido muscular.

15

En los músculos maduros, las células satélite suelen ser inactivas, pero pueden reclutarse según sea necesario, después de un traumatismo muscular sutil o masivo. Cuando el daño muscular es mínimo, las células satélite y/o su progenie se fusionan con las miofibras existentes; en contraste, ante el daño muscular masivo, las células satélite se fusionan entre sí para formar nuevas miofibras (Grounds y Yablonka-Reuveni, 1993, Hawke y Garry, 2001). Sin embargo, dado que las lesiones sutiles de miofibra ocurren rutinariamente durante la actividad muscular normal, la necesidad de una reparación continua es esencial para el mantenimiento muscular. Esta reparación es posible gracias a una autorrenovación continua de las células satélite que implica un proceso complejo que comprende no sólo la proliferación de estas células, sino también su almacenamiento y diferenciación en miocitos maduros.

20

25

La proliferación de células satélite típicamente se activa con lesiones menores o mayores o con la rotura de la lámina muscular basal, lo que finalmente lleva a que algunas de estas células se diferencien en nuevas células miogénicas y algunas otras a restablecer una reserva residual *in vivo* de células quiescentes que presentan la capacidad de soportar rondas de regeneración adicionales (Moss y Leblond, 1971; Schulz y Jaryszak, 1985; Bischoff, 1994). Este proceso de "dos destinos" se produce más específicamente de acuerdo con las siguientes etapas, que se pueden rastrear mediante el seguimiento del transcriptoma y el perfil molecular de los biomarcadores expresados en estas células: en la regeneración muscular, el conjunto de células satélite contiene células Pax7+ heterogéneas, más particularmente distinguidas sobre la base de la expresión de Myf5 en algún punto de su linaje. Las células Pax7+/Myf5- (es decir, las células que nunca han expresado Myf5 y tampoco han tenido ancestros que expresaron Myf5) representan una población capaz de autorrenovación y diferenciación en las células Pax7+/Myf5+. Una vez que la expresión de Myf5 ha ocurrido en una célula, dicha célula y su progenie están comprometidas con la proliferación y la diferenciación (Kuang, Kuroda et al. 2007). Estas diferencias se logran a través de la división celular asimétrica que se rige por las propiedades físicas del conjunto de células satélite. Cada célula satélite presenta un lado basal en contacto con la lámina basal y un lado apical en contacto con la miofibra del huésped. Cuando una célula satélite se divide, la célula hija junto a la lámina basal experimenta una autorrenovación, mientras que la célula hija en contacto con la miofibra sufrirá una amplificación y diferenciación transitorias. A medida que progresa la ruta miogénica, MyoD también se expresa en células activadas Pax7+/Myf5+ (es decir, células autorrenovadoras). Sin embargo, se ha observado que existe una población de células MyoD autorrenovadoras que expresan Myf5 cuando las células satélite se ven obligadas a diferenciarse: estas células en realidad desdiferencian y reponen el nicho de la célula satélite (Baroffio, Hamman et al., 1996; Beauchamp, Helsop et al., 2000). Junto con una expresión continua de MyoD y Myf5, la expresión de miogenina y MRF4 (entre otros) se regula positivamente en las células de diferenciación, mientras que la expresión de Pax7 disminuye (Smith, Janney et al., 1994; Yablonka-Reuveni, 1994; Cornelison y Wold, 1997). Esto conduce a la detención del ciclo celular mediante la activación de p21 y la expresión de proteínas específicas de músculo como la cadena pesada de miosina (Charge y Rudnicki, 2004), seguida de una regulación positiva de la expresión de M-cadherina, m-caplaína y proteínas intermedias de filamentos tales como desmina y vimentina para formar una miofibra madura multinucleada (Kuch et al., 1997, Kwak et al., 1993, Smythe et al, 2001, Vaitinen et al., 2001). Por lo tanto, la regeneración muscular es un proceso complejo de varias etapas iniciado por la activación de células satélite, que impulsa tanto su autorrenovación como su diferenciación en miofibras maduras.

30

35

40

45

50

55

No obstante, la capacidad regenerativa de las celdas satélite no es ilimitada. De hecho, una disminución en la abundancia y/o función de las células satélite con la edad puede limitar aún más la reparación de la miofibra y contribuir a la pérdida muscular asociada con la edad (Bentzinger et al., 2014; Cosgrove et al., 2014; Bernet et al., 2014; Goodell et al., 2015). Se han informado de miopatías relacionadas con la edad, como la sarcopenia, tanto en humanos como en animales, y se caracterizan por una disminución de la masa, fuerza y resistencia de los músculos esqueléticos, lo que a su vez puede aumentar la susceptibilidad al daño muscular inducido por la contracción. También se ha establecido que el agotamiento de la población de células satélite es un factor importante en el deterioro y la desaparición de los pacientes afectados por miopatías congénitas como la distrofia muscular de Duchenne. Kudryashova et al. (2012) informaron de que la vejez de las células satélite es una

60

65

característica subyacente de las miopatías en un modelo de distrofia muscular en roedores. Sin embargo, la implicación precisa de las células satélite en miopatías congénitas y adquiridas no se comprende completamente.

Por lo tanto, existe una demanda continua de células satélites funcionales durante toda la vida, ya sea que la disminución en su conjunto *in vivo* resulte de una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales (relacionados con la edad) o patológicos (congénitos o relacionados con una lesión) del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s). En este contexto, el documento WO 2012/174537 divulga unos procedimientos de cribado que se dirigen a identificar agentes proliferativos que son activos en las células satélite. Se han seleccionado algunas moléculas a este respecto, pero existe todavía necesidad en la técnica de nuevos agentes proliferativos.

La presente invención aborda la necesidad expuesta anteriormente en la técnica.

En particular, los inventores han descubierto de manera sorprendente e inesperada que la fluoxetina y la vortioxetina promueven la proliferación de células satélite, incrementando particularmente su tasa de división. Aumentan particularmente el diámetro de la fibra muscular en un modelo *in vivo* de distrofia muscular de Duchenne, y también mejora la regeneración muscular de una manera sostenible, incluso después de múltiples rondas de lesiones. Los presentes resultados demuestran así que estos agentes antidepresivos se pueden usar para inducir la regeneración muscular y ralentizar la progresión de las distrofias musculares. Los inventores descubrieron además que estos efectos sorprendentes estaban mediados por el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B expresado en el tejido muscular, lo que sugiere que cualquier agente (selectivo o no selectivo) que estimula el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B, directa o indirectamente, ejercería una acción ventajosa similar en las células satélite.

Por lo tanto, la presente solicitud divulga un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B, y a una composición que comprende dicho agente, para la utilización como:

- i) un promotor de autorrenovación y/o diferenciación de células satélite, y/o
- ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite.

La invención divulga además las utilizaciones *in vitro*, así como métodos terapéuticos y de cribado.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que los expertos en la materia entienden comúnmente. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, las nomenclaturas usadas en la presente memoria y las técnicas de biología molecular, cultivo celular y farmacología son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Tales técnicas están completamente explicadas en la literatura (véase, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Eds., John Wiley & Sons, Inc. New York, 2013; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2012).

Sin embargo, con respecto al uso de diferentes términos a lo largo de la presente memoria, se aplican más particularmente las siguientes definiciones.

En el contexto de la presente solicitud, el término "receptor de 5-hidroxitriptamina", "receptor de 5-HT", "5-HT R" o "receptor de serotonina", se refiere a una superfamilia de receptores transmembrana de polipéptido único 7, encontrados en los sistemas nerviosos central y periférico de casi todos los animales, que actúan a través de la activación de las vías de señalización de la proteína G y/o como canales iónicos activados por ligando. Los receptores de 5-hidroxitriptamina son activados por su ligando natural, serotonina, con el fin de modular la liberación de muchos neurotransmisores, tales como el glutamato, GABA, la dopamina, la epinefrina/norepinefrina, y la acetilcolina, así como muchas hormonas como la oxitocina, prolactina, vasopresina, cortisol, corticotropina y sustancia P, entre otros.

Los receptores de 5-hidroxitriptamina se clasifican adicionalmente en 7 grupos de acuerdo con su acoplamiento de proteína G, entre los que se encuentra el grupo 5-HT₁, que es de particular interés en el contexto de la presente solicitud.

El "grupo receptor de 5-HT₁" comprende los subtipos 5-HT_{1A}, B, D, E y F, que comparten en humanos entre 40 y 63% de homología estructural, y se acopla preferentemente a las proteínas G_{i/o}. La activación de los subtipos del receptor de 5-HT₁ típicamente provoca una neurotransmisión inhibitoria a través de la activación de los canales de potasio, lo que disminuye la producción intracelular de cAMP.

Entre el grupo de receptores 5-HT₁, el "receptor de 5-HT_{1B}" ("receptor de 5-hidroxitriptamina 1B", "receptor de 5-hidroxitriptamina 1B", "5-HT-1B", "5-HT-1D-beta", "receptor beta 1D de serotonina" o "receptor 1B de serotonina") ha sido identificado y caracterizado en 1992 por Jin et al. En humanos, está codificado por el gen *HTB1R* (Números de adhesión RefSeq y versión de NCBI NM_000863.1 y GI: 4504532; proteína codificada correspondiente:

Números de versión y acceso NCBI RefSeq NP_000854.1 y GI: 4504533), que se localiza en el cromosoma 6 en la posición 6q13. La secuencia de este receptor está muy conservada en humanos, chimpancés, monos Rhesus, perros, vacas, ratones, ratas, pollos, peces cebra, *C.elegans*, y rana; y hasta el momento es conocido que 135 organismos presentan ortólogos con el gen humano *HTR1B*.

Por "agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR)", o "agente estimulador de 5-HT1 BR", se entiende en la presente memoria un agente activo capaz de estimular, directa o indirectamente, la actividad del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B, o es decir, capaz de imitar o potenciar los efectos que normalmente ejerce el ligando natural de dicho receptor (es decir, serotonina). Una estimulación directa requiere la unión del agente a dicho receptor, mientras que una estimulación indirecta no implica la unión de dicho agente a dicho receptor (es decir, actúa sobre el receptor a través de otro mecanismo de acción). La capacidad de un agente candidato para activar dicho receptor puede evaluarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, sobreexpresando 5-HT1 BR en células y midiendo la producción de cAMP intracelular antes y después del contacto de las células recombinantes con dicho agente candidato. Se han descrito en la técnica otros métodos para medir la actividad de 5-HT1 BR, e incluyen, entre otros, una cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa acoplada a un detector electroquímico (HPLC-ED) usando un detector amperométrico. En el contexto de la presente solicitud, dicho agente puede ser selectivo para el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B, o puede actuar no sólo sobre el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B sino también sobre otros receptores tales como otros receptores de 5-HT. En cualquier caso, la promoción de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite, y/o la prevención y/o inhibición del agotamiento del conjunto de células satélite, tal como se propone en la presente memoria, está mediada por la estimulación directa o indirecta del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B por los agentes de la solicitud.

De acuerdo con los diferentes aspectos y formas de realización de la invención descritos en la presente memoria, un "sujeto" o "huésped" se refiere a un sujeto que posee un sistema serotoninérgico, comprendiendo dicho sistema más particularmente receptores de 5-hidroxitriptamina, que incluyen notablemente el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B. Por lo tanto, dicho sujeto preferentemente incluye animales y humanos.

Además, por "células satélite", se entienden en la presente memoria pequeñas células madre mononucleares que están localizadas naturalmente debajo de la lámina basal de la miofibra, y que son capaces de autorrenovación y de formar nuevas células musculares esqueléticas (es decir, miogénicas). El marcador más definitivo de células satélite es Pax7, que está presente en todas las células satélite de los músculos posnatales y se expresa en la proliferación de mioblastos hasta que comienzan a diferenciarse. Otros factores de transcripción comunes a las células satelitales quiescentes incluyen Foxk1 y Pax3. Los marcadores de superficie celular también se pueden usar para distinguir las células satélite del tejido circundante, incluyendo CD56 (la molécula de adhesión celular neural o NCAM), el receptor del factor de crecimiento hepático (HGF) y c-Met. La M-cadherina (Cdh15) también está presente típicamente en las células satélite en reposo y se regula positivamente una vez que se activan. Otros marcadores incluyen CD106 (VCAM-1), CD34, sindecan 3 y 4, Sox8 y Sox15. La expresión de MyoD, Myf6 y Myf5 comienza una vez que las células satélite se activan, seguida por la expresión de miogenina (MyoG), Desmin y MRF4 que indica que las células se están diferenciando en miotubos. Los principales marcadores celulares expresados en cada etapa del proceso de regeneración muscular se resumen en las figuras 1A y 1B. Está comprendido dentro de la habilidad del experto en la materia evaluar la presencia o ausencia de dichos marcadores celulares mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como FACS (clasificación celular activada por fluorescencia).

Por "conjunto de células satélite", se entiende en la presente memoria la reserva o existencia natural *in vivo* de células satélite existentes en un sujeto, que se encuentra entre el plasmalema y la lámina basal de la fibra muscular. Este conjunto sólo consiste en células satélite quiescentes (es decir, latentes), cuyo fenotipo celular es Pax7+ y/o Pax3+. Particularmente, dicho fenotipo puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+, Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5-, Myf6-, MyoD-, Desmin-, MyoG-, y MRF4-. Más particularmente, el fenotipo celular de células satélite quiescentes (es decir, latentes) puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+, Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5-, Myf6-, MyoD-, Desmin-, MyoG-, MRF4-, CD56+, y MyHC-.

El "agotamiento de la conjunto de células satélite" se refiere por lo tanto al agotamiento o disminución de dichas células quiescentes. La expresión "autorrenovación de células satélite" significa en la presente memoria que dichas células proliferan o se dividen a fin de generar una progenie, que o bien se pondrá en reposo o experimentará una diferenciación celular. En consecuencia, el fenotipo celular de células satélite proliferativas o autorrenovables es Pax7+, Myf5+, MyoD+, Desmin-, MyoG-, y MRF4-. Particularmente, dicho fenotipo puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+, Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin-, MyoG-, y MRF4-. Más particularmente, el fenotipo celular de células proliferativas o satélite de autorrenovación puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+, Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin-, MyoG-, MRF4-, CD56+, y MyHC-.

El término "diferenciación de células satélite" se refiere en la presente memoria al proceso celular mediante el cual dichas células cambian de un fenotipo celular a otro para formar fibras musculares maduras, más particularmente desde un fenotipo celular autorrenovable a un fenotipo de mioblastos, a continuación a un fenotipo miotubo. En

consecuencia, el fenotipo celular de las células satélite diferenciadoras es Desmin +, MyoG + y MRF4 +, mientras que el fenotipo celular de las células satélite completamente diferenciadas es MyHC +. Particularmente, el fenotipo de diferenciación de las células satélite puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+ Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin+, MyoG+, y MRF4+ (es decir, fenotipo de mioblastos), mientras que el fenotipo celular de células satélite completamente diferenciadas puede ser CD34-, Cdh15-, Foxk1-, Met-, Pax3-, Pax7-, Sdc3/4-, Sox8-, Sox15-, VCAM1-, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin+, MyoG+, y MRF4+ y MyHC+ (es decir, el fenotipo miotubo). Más particularmente, el fenotipo celular de células satélite de diferenciación puede ser CD34+, Cdh15+, Foxk1+, Met+, Pax3+, Pax7+/-, Sdc3/4+, Sox8+, Sox15+, VCAM1+, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin+, MyoG+, MRF4+, CD56+/-, y MyHC+/- (es decir, fenotipo de mioblastos), mientras que el fenotipo celular de células satélite completamente diferenciadas puede ser CD34-, Cdh15-, Foxk1-, Met-, Pax3-, Pax7-, Sdc3/4-, Sox8-, Sox15-, VCAM1-, Myf5+, Myf6+, MyoD+, Desmin+, MyoG+, MRF4+, CD56-, y MyHC+ (es decir, el fenotipo miotubo).

Se proporcionan unas definiciones adicionales a lo largo de la memoria.

La presente invención se puede entender más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, que incluye formas de realización preferidas de la invención, y los ejemplos incluidos en la presente memoria.

Los presentes inventores han descubierto que, al contacto con fluoxetina o vortioxetina, inhibidores bien conocidos de la recaptación de serotonina que aumentan los niveles de serotonina y a su vez estimulan 5-HT1 BR (la fluoxetina que actúa indirectamente sobre 5-HT1 BR y la vortioxetina que actúa indirectamente así como directamente en 5-HT1 BR como un agonista parcial de dicho receptor), las células satélite presentes en el músculo lesionado experimentan una división celular más activa y más rápida en comparación con los animales no tratados, lo que conduce a la diferenciación de las células satélite en miotubos maduros y la aparición de nuevas células satélite quiescentes de reserva. También demostraron que la fluoxetina mejoró el fenotipo muscular en un modelo de ratón muscular de Duchenne (Mdx), reduciendo notablemente la necrosis de las miofibras, aumentando el tamaño de las miofibras y disminuyendo los marcadores de inflamación.

Por lo tanto, la presente invención propone utilizar agentes que estimulen la actividad de 5-HT1 BR como nuevos fármacos para favorecer la proliferación y diferenciación de células satélite y prevenir su agotamiento *in vivo*, promoviendo la regeneración muscular.

Por lo tanto, la presente solicitud divulga un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR), para la utilización como:

- i) un promotor de autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o
- ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite.

Como se expone anteriormente, dicho agente puede actuar directa o indirectamente sobre dicho 5-HT1 BR.

Más precisamente, la solicitud divulga la utilización de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) como se describe en la presente memoria, para i) promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite y/o ii) prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite.

Dicha utilización puede ser una utilización *in vivo* o una utilización *in vitro*, preferentemente una utilización *in vivo*.

Más particularmente, la solicitud divulga la utilización de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) como se describe en la presente memoria, para fabricar un medicamento para i) promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite y/o ii) prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite.

Es decir, la solicitud divulga un método para i) promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite y/o ii) prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) como se describe en la presente memoria, a un sujeto que lo necesite.

La solicitud divulga asimismo la utilización *in vitro* de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) como se describe en la presente memoria, para promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite.

Es decir, la solicitud divulga un método *in vitro* para promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) como se describe en la presente memoria a una muestra biológica aislada que comprende células satélite, en particular un conjunto de células satélite. Dicha muestra biológica puede ser en la presente memoria una muestra de músculo.

Por "cantidad eficaz", en la presente memoria se entiende que el agente de la invención se administra en una cantidad suficiente para proporcionar el efecto para el que está indicado, es decir, la promoción de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite, y/o prevención y/o inhibición del agotamiento del conjunto de células satélite.

La autorrenovación y/o diferenciación y reposición de los conjuntos de células satélite pueden evaluarse analizando el fenotipo de las células satélite como se describió anteriormente.

El agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) se utiliza en la presente invención en un sujeto afectado por una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) esquelético(s) muscular(es).

El término "pérdida y/o daño y/o deterioro naturales del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s)" comprende en la presente memoria el proceso natural de envejecimiento muscular, que da como resultado la pérdida progresiva del músculo esquelético. Incluye, por ejemplo, sarcopenia y sus complicaciones relacionadas, como disminución de la fuerza muscular (es decir, debilidad muscular), fracturas óseas y pérdida de movilidad y función física. Típicamente, cantidades modestas de masa muscular comienzan a disminuir a los 30 años en humanos, pero la pérdida de fuerza resultante aumenta exponencialmente con la edad. Es conocido que la prevalencia de pérdida muscular aumenta de 15 a 25% en personas menores de 70 años a más de 50% en personas mayores de 80 años. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, dicho sujeto afectado por una pérdida natural y/o daño y/o deterioro del tejido del músculo esquelético es un sujeto adulto, preferentemente de por lo menos 30 años de edad, más preferentemente de por lo menos 70 años de edad, y aún más preferentemente de por lo menos 80 años de edad. Con respecto a la sarcopenia, la sarcopenia de clase I ha sido definida en la literatura por Messier et al. (2009) como un índice de masa corporal magra apendicular (ALBMI) $\leq 6.44 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ (masa/altura corporal magra apendicular), que se puede identificar al examinar las piernas y/o los brazos para determinar la masa muscular. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, dicho sujeto afectado por una pérdida natural y/o daño y/o deterioro del tejido muscular esquelético presenta una ALBMI inferior o igual a aproximadamente $6 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, preferentemente inferior o igual a aproximadamente $6.3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, más preferentemente inferior o igual a aproximadamente $6.4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, e incluso más preferentemente inferior o igual a aproximadamente $6.44 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$. La sarcopenia también puede identificarse midiendo las mediciones antropométricas, como la circunferencia del músculo del brazo y la circunferencia de la pantorrilla para determinar una cantidad inferior a la normal del músculo esquelético de las extremidades (Bauer et al., 2008). Baumgartner et al. (1998) identificaron además sarcopenia cuando la masa de músculo esquelético en un sujeto mayor es más de 2 desviaciones estándar por debajo de la media para adultos jóvenes sanos.

Por "pérdida y/o daño y/o deterioro patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético", se entiende en la presente memoria cualquier degeneración, debilidad, disfunción y/o pérdida muscular congénita o adquirida que afecte al(a los) músculo(s) esquelético(s). Las patologías congénitas típicas que afectan al músculo esquelético incluyen, por ejemplo, miopatías tales como distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofias muscular de cinturas (LGMD), distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Por el contrario, las patologías adquiridas que afectan al(a los) músculo(s) esquelético(s) no se heredan y pueden ser inducidas por inflamación (miopatía inflamatoria), fármacos (miopatía inducida por fármacos), traumatismo o lesión (miopatía inducida por traumatismo o miopatía inducida por cirugía), tejido conectivo e isquemia muscular (enfermedad de Buerger), cáncer (sarcopenia inducida por cáncer) o incluso dieta (miopatía inducida por la dieta).

El agente estimulador de 5-HT1 BR divulgado en la presente solicitud se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes antidepresivos y fármacos antimigrañosos, derivados, análogos, isómeros, metabolitos farmacéuticamente aceptables, sales, solvatos, clatratos, polimorfos y cocristales de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Por "derivado", se entiende en la presente memoria un compuesto que deriva directamente de un compuesto químico de interés (es decir, un agente estimulador de 5-HT1 BR) y es estructuralmente similar aunque no idéntico a dicho compuesto, y que retiene la misma actividad biológica y/o propiedades fisicoquímicas.

Por "análogo", o "análogo funcional", se entiende en la presente memoria un compuesto que no deriva directamente de un compuesto químico de interés y, por lo tanto, es estructuralmente diferente, pero exhibe la misma actividad biológica y/o propiedades fisicoquímicas, tales como isoésteres.

"Derivados" y "análogos" de los agentes estimuladores 5-HT1 BR comprenden en la presente memoria los compuestos que retienen la actividad estimuladora de 5-HT1 BR como se definió anteriormente, pero que no atraviesan la barrera hematoencefálica, como se describe a continuación.

Por "isómero", en la presente memoria se entiende un compuesto que presenta la misma fórmula química que un

compuesto de interés, pero una estructura química diferente. Este término comprende isómeros y estereoisómeros estructurales. Si el isómero de la invención es un estereoisómero, los estereoisómeros individuales (enantiómeros y diastereoisómeros) y mezclas de los mismos pueden utilizarse. Algunos de los compuestos pueden existir en formas tautoméricas (un tipo de isómero estructural).

Por "metabolito" como se usa en la presente memoria, se entiende cualquier compuesto que es un intermedio y/o un producto del metabolismo. Un metabolito de un compuesto químico generalmente se forma como parte del proceso bioquímico natural de degradación y eliminación del compuesto de interés en un sujeto al que se administra. Los ejemplos de metabolitos de agentes antidepresivos se proporcionan adicionalmente a continuación.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" como se usa en la presente memoria se refiere a una sal que es fisiológicamente tolerada (es decir, no tóxica) cuando se usa de manera apropiada en el contexto de la presente solicitud, particularmente cuando se usa en mamíferos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfúrico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfúrico, bencenosulfónico, glucónico, glutámico, bis-metilenosalicílico, etanodisulfónico, propiónico, p-amino-benzoico, málico, mandélico, cinámico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico y ácido sulfámico, así como los ácidos acéticos teofilina y 8-haloteofilinas como la 8-bromoteofilina. Otros ácidos, tales como ácido oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables por sí mismos, se pueden utilizar en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen metal alcalino (por ejemplo, sodio), metal alcalinotérreo, (por ejemplo, magnesio), sales de amonio y N-(alquilo de C1-C4)₄⁺.

El término "solvato" como se utiliza en la presente memoria debe entenderse que significa cualquier forma del agente activo de acuerdo con la solicitud (es decir, el agente estimulador 5-HT1 BR), en el que dicho compuesto está unido mediante interacciones no covalentes a otra molécula (normalmente un disolvente polar), que incluye especialmente hidratos y alcoholatos, como el metanolato. Los métodos de solvatación son bien conocidos en la materia.

Por "clatrato", se entiende en la presente memoria una sustancia química que consiste en una red o jaula que atrapa o contiene un segundo tipo de molécula/compuesto de interés, y que puede usarse para aumentar la estabilidad y la solubilidad en agua de la molécula/compuesto de interés. Los clatratos son típicamente poliméricos

El término "polimorfos" significa en la presente memoria formas cristalinas diferentes de un compuesto de interés en el que las moléculas presentan diferentes disposiciones y/o una diferente conformación molecular. Incluye forma líquida cristalina o forma sólida cristalina de un compuesto de interés. Los hidratos y clatratos pueden ser polimorfos.

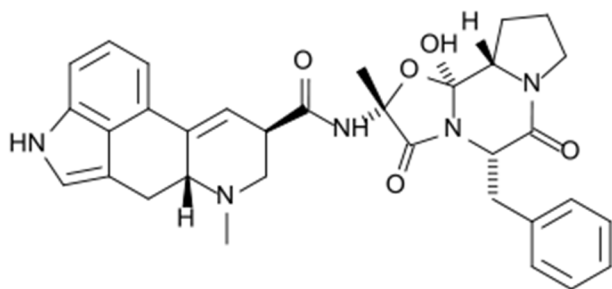
Por "cocrystal", se entiende en la presente memoria una estructura cristalina que se compone de por lo menos dos componentes, en la que los componentes pueden ser átomos, iones o moléculas. Los solvatos y clatratos pueden ser cocrystal en ciertas condiciones.

En el contexto de la presente solicitud, los derivados, análogos, isómeros, metabolitos, sales, solvatos, clatratos, polimorfos y cocrystal farmacéuticamente aceptables como se definieron anteriormente son activos, es decir, exhiben una actividad estimulante de 5-HT1 BR. Dicha actividad puede evaluarse como se describió anteriormente.

Se debe entender además que los agentes estimuladores de 5-HT1 BR como se describen en la presente memoria, o sus derivados, análogos, isómeros, metabolitos, sales, solvatos, clatratos, polimorfos y cocrystal están preferentemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable, se pretende hacer referencia, *entre otras cosas*, a que presenta un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable, es decir, que excluye aditivos farmacéuticos normales, tales como diluyentes y portadores y cualquier material tóxico considerado en niveles de dosis normal. En el contexto de la presente solicitud, los niveles de pureza están preferentemente por encima de 98%, más preferentemente por encima de 99%, e incluso más preferentemente por encima de 99.9%. En una forma de realización preferida, dicho nivel de pureza es 99.9%.

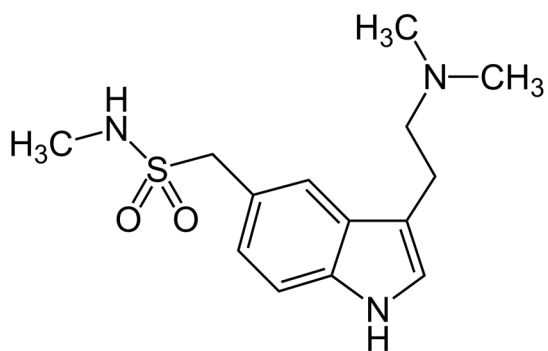
Como se expone anteriormente, los agentes estimuladores de 5-HT1 BR divulgados en la solicitud pueden seleccionarse de entre fármacos antimigrañosos, tales como triptanos o ergotamina. Los triptanos son bien conocidos en la técnica como los medicamentos a base de triptamina utilizados en el tratamiento de migrañas y cefaleas en racimos, debido a sus efectos agonistas sobre 5-HT1 BR y 5-HT1 DR. Los ejemplos de triptanos de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, sumatriptán, rizatriptán, zolmitriptán, eletriptán, almotriptán, frovatriptán, naratriptán, avitriptán y donitriptán. Los ejemplos no limitativos de sales de dichos compuestos son hidrocloreto de donitriptán, hidrobromuro de eletriptán y benzoato de rizatriptán.

Ergotamina:



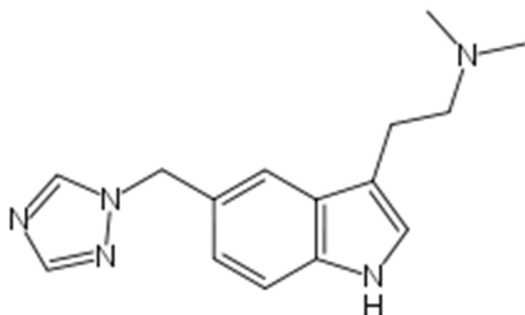
;

5 Sumatriptán:



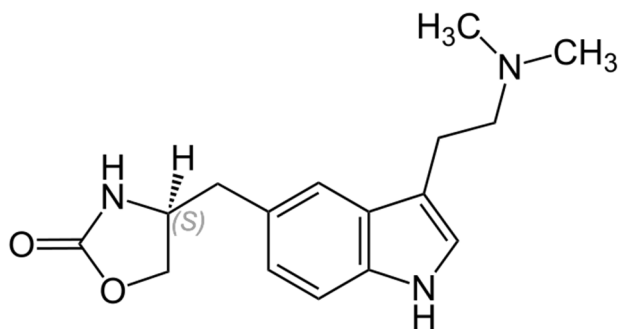
;

10 Rizatriptán:



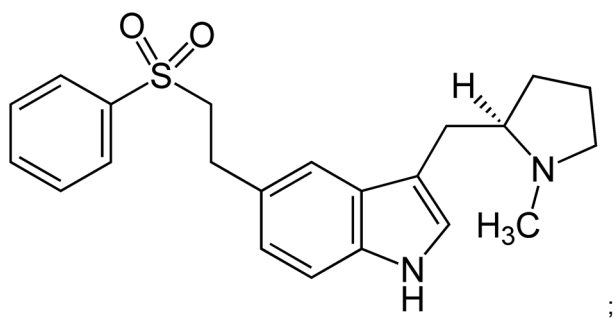
;

Zolmitriptán:

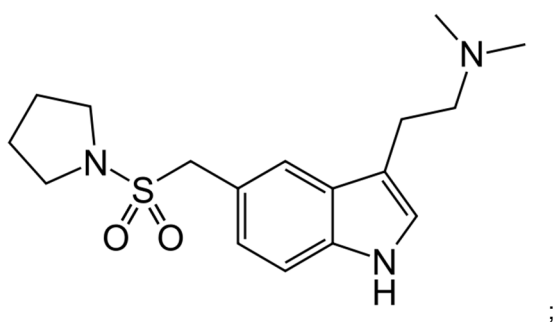


;

Eletriptán:

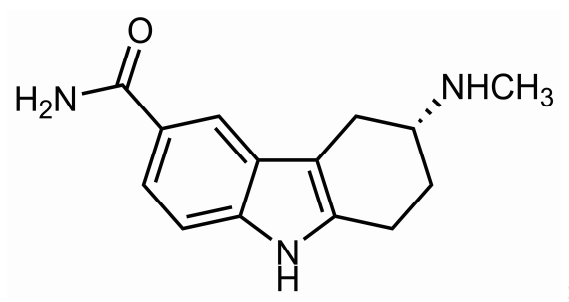


5 Almotriptán

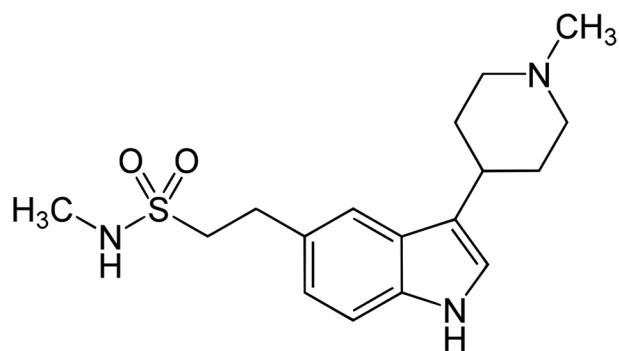


Frovatriptán:

10

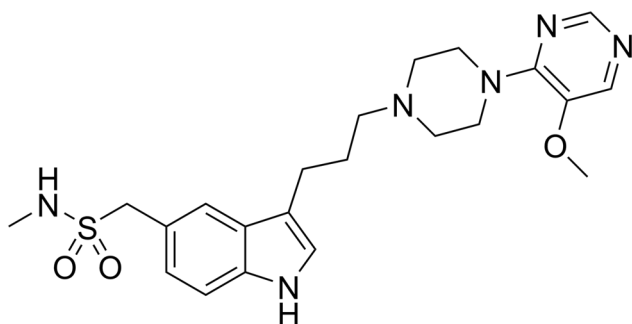


Naratriptán:

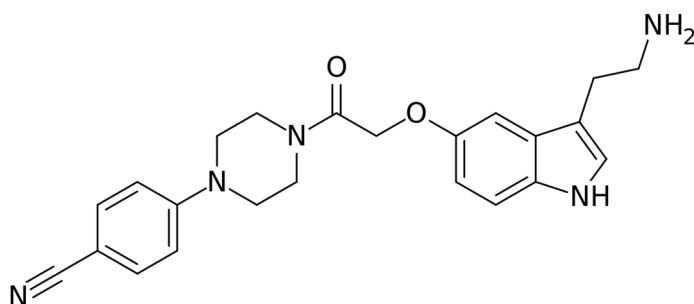


15

Avitriptán:



5 Donitriptán:



10 Los triptanos de acuerdo con la solicitud pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en sumatriptán, rizatriptán, zolmitriptán, eletriptán, almotriptán y frovatriptán.

Los agentes estimuladores de 5-HT₁ BR divulgados en la solicitud se pueden seleccionar alternativamente de entre los agentes antidepresivos.

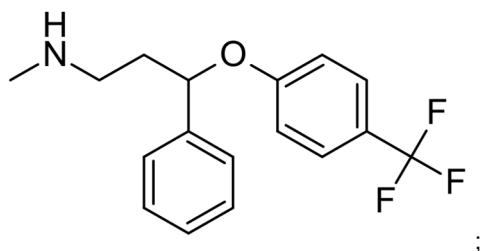
15 Por "agente antidepresivo", se entiende en la presente memoria un agente activo que es capaz de tratar trastornos del estado de ánimo, tales como depresión (incluyendo depresión grave) y/o distimia. Los agentes antidepresivos incluyen, por ejemplo, inhibidores de la recaptación de serotonina (SRI); antidepresivos tricíclicos (TCA); inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO); antidepresivos serotoninérgicos y noradrenérgicos específicos (NaSSA); antidepresivos atípicos o potenciadores antidepresivos.

20 Los inhibidores de la recaptación de serotonina (SRI) designan una clase de compuestos que típicamente actúan inhibiendo la recaptación del neurotransmisor de la serotonina en el terminal presináptico, aumentando así el nivel extracelular de serotonina y, por lo tanto, la transmisión serotoninérgica. Dichos compuestos pueden actuar de forma selectiva o no selectiva sobre la serotonina neurotransmisora. Los SRI también pueden mostrar varios grados de selectividad hacia los otros sistemas de recaptación de monoaminas, en particular los transportadores de norepinefrina y dopamina. Los SRI generalmente incluyen inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (SNRI) y el inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (SNDRI).

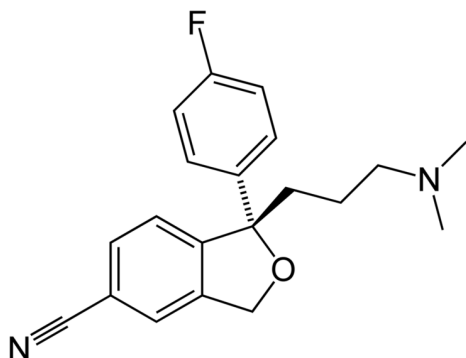
30 Los ejemplos de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) incluyen, por ejemplo, fluoxetina, citalopram, escitalopram, sertralina, norsertralina, paroxetina, fluvoxamina, femoxetina, indalpina, alaproclato, cericilamina, ifoxetina, zimelidina, dapoxetina y etoperidona, preferentemente fluoxetina, citalopram, escitalopram, sertralina, norsertralina, paroxetina, fluvoxamina, femoxetina, indalpina, alaproclato, cericilamina, ifoxetina y zimelidina.

35

Fluoxetina:



5 Citalopram:



10 Los ejemplos de metabolitos de SSRI activos incluyen, por ejemplo, desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram y seproxetina (es decir, (S)-norfluoxetina).

Los ejemplos de inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (SNRI) incluyen, sin limitación, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina, milnaciprán, levominalciprán y sibutramina.

15 Los ejemplos de inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (SNDRI) (también conocido como inhibidor triple de la recaptación o TRI) incluyen, por ejemplo, bicifadina, brasofensina, tesofensina y nomifensina, preferentemente bicifadina.

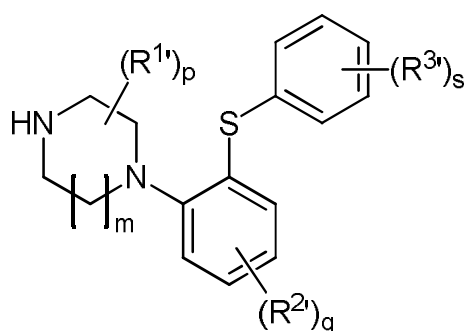
20 Los ejemplos de antidepresivos tricíclicos (TCA) incluyen, sin limitación, clomipramina, amoxapina, nortriptilina, maprotilina, trimipramina, imipramina, desipramina y protriptilina.

Los ejemplos de inhibidores de monoaminoxidasa (MAO) según la invención incluyen, sin limitación, iproniazida, fenelzina, tranilcipromina, moclobemida, selegilina y rasagilina.

25 Los ejemplos de antidepresivos serotoninérgicos y noradrenérgicos específicos (NaSSA), que actúan preferentemente bloqueando los receptores alfa-2 adrenérgicos presinápticos, incluyen, entre otros, mirtazapina, mianserina, aptazapina, esmirtazapina, setiptilina y S32212 (también conocido como N-[4-metoxi-3-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]-1,2-dihidro-3H-benzo[e]indol-3-carboxamida), preferentemente mirtazapina y mianserina.

30 Los ejemplos de antidepresivos atípicos (definidos como tales que no pertenecen a ninguna de las clases anteriores de antidepresivos) o potenciadores antidepresivos incluyen, por ejemplo, bisarilsulfanil aminas tales como vortioxetina, así como tianeptina, agomelatina, nefazodona, trazodona, buspirona, tandospirona y ketamina, preferentemente vortioxetina, tianeptina, agomelatina, nefazodona, trazodona, buspirona, tandospirona y ketamina.

35 Las bisarilsulfanil-aminas se han divulgado en la solicitud de patente WO 2003/029232. Dichos compuestos se pueden describir de acuerdo con la siguiente fórmula general (A):

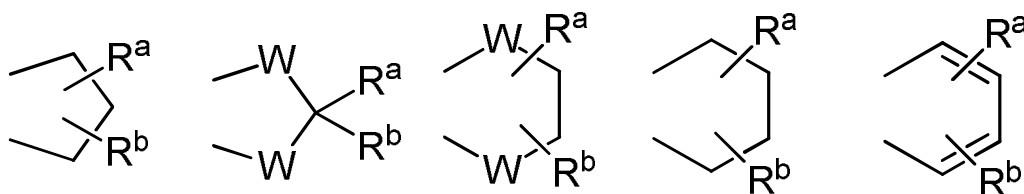


(A)

en la que

- m es 1 o 2;
- p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8;
- q es 0, 1, 2, 3 o 4;
- s es 1 o 2;
- cada R^{1'} se selecciona independientemente de entre el grupo representado por alquilo C₁₋₆, o dos R^{1'} unidos al mismo átomo de carbono pueden formar un cicloalquilo espiro-unido de 3 a 6 miembros;
- cada R^{2'} se selecciona independientemente de entre los grupos representados por halógeno, ciano, nitro, C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₁₋₆-alqu(en/in)ilsulfanilo, hidroxilo, hidroxilo-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₃₋₈-cicloalqu(en)ilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)il-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, acilo, C₁₋₆-alqu(en/in)iloxicarbonilo, C₁₋₆-alqu(en/in)ilsulfonilo, o -NR^xR^y; -NR^xCO-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo;
- cada R^{3'} se selecciona independientemente de entre un grupo representado por halógeno, ciano, nitro, C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₁₋₆-alqu(en/in)ilsulfanilo, hidroxilo, hidroxilo-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₃₋₈-cicloalqu(en)ilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)il-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, C₁₋₆-alqu(en/in)ilsulfonilo, arilo, C₁₋₆-alqu(en/in)iloxicarbonilo, acilo, -NR^xCO-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, CONR^xR^y o NR^xR^y;

o dos sustituyentes R^{3'} adyacentes juntos forman un heterociclo fusionado al anillo fenilo seleccionado de entre el grupo que consiste en



en el que W es O o S, y R^a y R^b son hidrógeno o C₁₋₆-alquilo; o dos sustituyentes R^{3'} adyacentes forman juntos un sistema heteroaromático fusionado que contiene uno, dos o tres heteroátomos,

en el que cada R^x y R^y se selecciona independientemente de entre el grupo representado por hidrógeno, C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)ilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)il-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, o arilo; o R^x y R^y junto con el nitrógeno al que se unen forman un anillo de 3 a 7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional;

o su sal farmacéuticamente aceptable.

La síntesis de los compuestos de la fórmula general (A) se describe totalmente en el documento WO 2003/029232 y por lo tanto, no necesita detallarse en la presente memoria.

Una alternativa preferida de la fórmula general (A) es en la que p es 0.

Una alternativa preferida de la fórmula general (A) es en la que m es 1 o 2.

Una alternativa preferida de fórmula general (A) es en la que $R^{2'}$ es trifluorometilo, o C_{1-6} -alquilo.

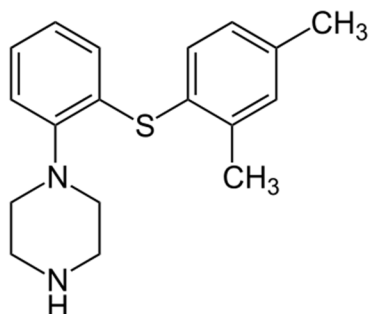
Una alternativa preferida de la fórmula general (A) es en la que $R^{3'}$ se selecciona de entre el grupo que consiste en halógeno, C_{1-6} -alcoxi, C_{1-6} -sulfanilo, C_{1-6} -alquil hidroxilo y trifluorometilo.

Una alternativa más preferida de la fórmula general (A) es en la que $m=1$, $p=0$, $q=0$, $R^{3'}$ es metilo y $s=2$.

La alternativa particularmente preferida de la fórmula general (A) es en la que el compuesto de fórmula (A) es cualquiera de los siguientes:

1-[2-(2-Trifluorometilfenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-[2-(4-Bromofenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-{2-[4-(Metilsulfanil)fenilsulfanil]fenil}piperazina,
 1-[2-(4-Hidroxifenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-[2-(2,4-Dimetilfenilsulfanil)fenil]piperazina, también conocida como vortioxetina

Vortioxetina:



1-[2-(3,5-Dimetilfenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-[2-(2,6-Dimetilfenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-[2-(2,5-Dimetilfenilsulfanil)fenil]piperazina,
 1-[2-(2-Trifluorometilfenilsulfanil)fenil][1,4]diazepan,
 1-[2-(3-Metilfenilsulfanil)fenil]-[1,4]-diazepan,
 2-(4-Metilfenilsulfanil)fenil-1-piperazina,
 1-[2-(4-Clorofenilsulfanil)fenil]-piperazina,
 1-[2-(4-Metoxifenilsulfanil)-4-clorofenil]piperazina,
 1-[2-(4-Metoxifenilsulfanil)-4-metilfenil]piperazina,
 1-[2-(4-Metoxifenilsulfanil)-5-metilfenil]piperazina,
 1-[2-(4-Fluorofenilsulfanil)-5-metilfenil]piperazina,
 1-[2-(4-Metoxifenilsulfanil)-5-trifluorometilfenil]piperazina,
 1-[2-(4-Clorofenilsulfanil)fenil]-3-metilpiperazina,
 1-[2-(4-Clorofenilsulfanil)fenil]-3,5-dimetilpiperazina,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

“Halógeno” significa en la presente memoria fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I).

“Alquilo”, “alquenilo”, “alquinilo”, y “arilo” se definen adicionalmente a continuación.

La expresión C_{1-6} -alqu(en/in)ilo significa un grupo C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo o C_{2-6} -alquinilo.

La expresión C_{3-8} -cicloalqu(en)ilo significa un grupo C_{3-8} -cicloalquilo o cicloalquenilo.

El término C_{1-6} alquilo se refiere a un grupo alquilo ramificado o no ramificado que presenta de uno a seis átomos de carbono que incluyen por ejemplo metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo y 2-metil-1-propilo.

De manera similar, C_{2-6} alquenilo y C_{2-6} alquinilo, respectivamente, designan tales grupos que presentan de dos a seis átomos de carbono, que incluyen uno doble enlace y un triple enlace respectivamente, incluyendo por ejemplo etenilo, propenilo, butenilo, etinilo, propinilo y butinilo.

El término C_{3-8} cicloalquilo designa un carbocilo monocíclico o bicíclico que presenta tres a ocho átomos de C que

incluyen por ejemplo ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

El término C₃₋₈ cicloalquenilo designa un carbocilo monocíclico o bicíclico que presenta tres a ocho átomos de C y que incluye un doble enlace.

5 En el término C₃₋₈-cicloalqu(en)il-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)il y C₁₋₆-alqu(en/in)ilo son como se define anteriormente.

10 Los términos C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₁₋₆ alqu(en/in)ilsulfanilo, hidroxi-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)ilo, halo-C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi, C₁₋₆-alqu(en/in)ilsulfonilo etc. designan tales grupos en los que C₁₋₆-alqu(en/in)ilo son como se definen anteriormente.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término C₁₋₆-alqu(en/in)iloxicarbonilo se refiere a grupos de la fórmula C₁₋₆-alqu(en/in)ilo -O-CO-, en los que C₁₋₆-alqu(en/in)ilo son como se define anteriormente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término acilo se refiere a formilo, C₁₋₆-alqu(en/in)ilcarbonilo, arilcarbonilo, aril-C₁₋₆-alqu(en/in)ilcarbonilo, C₃₋₈-cicloalqu(en)ilcarbonilo o un grupo C₃₋₈-cicloalqu(en)il-C₁₋₆-alqu(en/in)il-carbonilo.

20 El término anillo de 3 a 7 miembros que contiene opcionalmente un heteroátomo adicional como se utiliza en la presente memoria se refiere a sistemas de anillos tales como 1-morfolinilo, 1-piperidinilo, 1-azepinilo, 1-piperazinilo, 1-homopiperazinilo, 1-imidazolilo, 1-pirrolilo o pirazolilo, los cuales pueden sustituirse adicionalmente como C₁₋₆-alquilo.

25 Los heterociclos formados por dos sustituyentes R^{3'} adyacentes y fusionados al anillo origen pueden formar juntos anillos tales como anillos monocíclicos de 5 miembros tales como 3*H*-1,2,3-oxatiazola, 1,3,2-oxatiazola, 1,3,2-dioxazola, 3*H*-1,2,3-ditiazota, 1,3,2-ditiazola, 1,2,3-oxadiazola, 1,2,3-tiadiazola, 1*H*-1,2,3-triazola, isoxazola, oxazola, isotiazola, tiazola, 1*H*-imidazola, 1*H*-pirazola, 1*H*-pirrola, furano o tiofeno y anillos monocíclicos de 6 miembros tales como 1,2,3-oxatiazina 1,2,4-oxatiazina 1,2,5-oxatiazina 1,4,2-oxatiazina 1,4,3-oxatiazina 1,2,3-dioxazina 1,2,4-dioxazina 4*H*-1,3,2-dioxazina 1,4,2-dioxazina 2*H*-1,5,2-dioxazina 1,2,3-ditiazina 1,2,4-ditiazina 4*H*-1,3,2-ditiazina 1,4,2-ditiazina 2*H*-1,5,2-ditiazina 2*H*-1,2,3-oxadiazina, 2*H*-1,2,4-oxadiazina 2*H*-1,2,5-oxadiazina, 2*H*-1,2,6-oxadiazina, 2*H*-1,3,4-oxadiazina, 2*H*-1,3,4-triazina, 1,2,4-triazina, 2*H*-1,2-oxazina, 2*H*-1,3-oxazina, 2*H*-1,4-oxazina, 2*H*-1,2-tiazina, 2*H*-1,3-tiazina, 2*H*-1,4-tiazina, pirazina, piridazina, pirimidina, 4*H*-1,3-oxatina, 1,4-oxatina, 4*H*-1,3-dioxina, 1,4-dioxina, 4*H*-1,3-ditiina, 1,4-ditiina, piridina, 2*H*-pirano o 2*H*-tiina.

Además, los compuestos de la fórmula general (A) puede existir tanto en formas no solvatadas como solvatadas con solventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares,

40 Algunos de los compuestos de la fórmula general (A) contienen centros quirales y tales compuestos existen en forma de isómeros (es decir, enantiómeros). Dichos isómeros y cualquier mezcla de los mismos que incluyen las mezclas racémicas son asimismo útiles.

45 La forma de realización más preferida de la presente invención es en la que el compuesto de fórmula (A) es 1-[2-(2,4-dimetilfenilsulfanil)fenil]piperazina (es decir, vortioxetina).

50 Otros agentes antidepresivos divulgados en la solicitud pueden ser seleccionados de entre el grupo que consiste en bisarilsulfanilaminas como se describió anteriormente tales como vortioxetina y fluoxetina, citalopram, escitalopram, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, femoxetina, indalpina, alaproclato, zimelidina, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina, milnacipran, levominalcipran, sibutramina, bicifadina, clomipramina, amoxapina, maprotilina, imipramina, desipramina, moclobemida, selegilina, mirtazapina, mianserina, tianeptina, agomelatina, trazodona, buspirona, tandospirona y ketamina.

55 Otros agentes estimuladores de 5-HT₁ BR adecuados divulgados en la solicitud pueden ser: clorhidrato de anpirtolina, CGS-12066A, dimaleato CGS 12066B, oximetazolina, 5-carboxamidotriptamina, CP-93129 y sus sales tales como dihidrocloruro CP-93129, CP-94253 y sales de éstos, tales como clorhidrato de CP-94253, CP-122,288, CP-135,807, RU-24969 y sales de los mismos tales como hemisuccinato RU-24969, ziprasidona, asenapina, oxalato de 5-niloxitriptamina, pindolol y (S)-(-)-pindolol.

60 No obstante, en el caso de que el agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT₁ BR) de la presente invención ejerza efectos adversos no deseados relacionados con el SNC, es particularmente ventajoso limitar los efectos de dicho agente sobre el sistema periférico de serotonina. Los agentes antidepresivos son particularmente conocidos por ejercer tales efectos secundarios. Los efectos secundarios pueden prevenirse modificando químicamente la estructura de dicho agente, e injertando particularmente una porción química cargada para evitar atravesar la barrera hematoencefálica.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el agente estimulador de 5-HT1 BR divulgado en la presente solicitud se modifica para que comprenda por lo menos una porción química cargada, preferentemente cargada positivamente. Particularmente, la carga positiva se puede retener en un amplio intervalo de pH, en particular a un pH fisiológico.

En un primer aspecto, la presente solicitud divulga por lo tanto vortioxetina o un derivado de la misma, para la utilización como:

- i) un promotor de la autorrenovación y/o diferenciación de las células satélite; y/o
- ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite,

en un sujeto afectado por una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s), en la que dicho derivado de vortioxetina es vortioxetina que es modificada para comprender por lo menos una porción química cargada.

En otros términos, dichos agentes estimuladores de 5-HT1 BR modificados de acuerdo con la invención no son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Los agentes antidepresivos modificados de esta manera son, por lo tanto, antidepresivos desactivados.

Dichas modificaciones químicas se han descrito ampliamente en la solicitud de patente WO 2007/148341, , y pueden realizarse para retener la actividad estimuladora del 5-HT1 BR de los compuestos, al tiempo que evitan que crucen la barrera hematoencefálica.

El término "porción química cargada", "porción cargada", "grupo químico cargado" o "grupo cargado", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un átomo o un grupo de átomos que forma parte de una molécula orgánica, y que se caracteriza por una carga electrostática positiva o negativa.

Por "porción química cargada positivamente", "porción cargada positivamente", "grupo químico cargado positivamente" o "grupo cargado positivamente", se entiende en la presente memoria una porción química cargada como se definió anteriormente, que se caracteriza por una carga electrostática positiva. Los compuestos que incluyen una o más porciones cargadas positivamente son iones moleculares a menudo denominados cationes moleculares. Un grupo de átomos con carga positiva presenta por lo menos un electrón menos que el número de protones en estos átomos. Las porciones químicas cargadas positivamente incluyen, por ejemplo, grupos amonio y sulfonio.

Un grupo cargado positivamente que retiene su carga a pH fisiológico es un grupo que no es capaz de participar en interacciones de intercambio de protones en un intervalo de pH que es típico del entorno fisiológico en el cuerpo donde el agente estimulador 5-HT1-BR está activo. Típicamente, el pH fisiológico es aproximadamente 7.4; por lo tanto, un grupo cargado positivamente que retiene su carga a pH fisiológico se refiere a un grupo químico cargado positivamente que permanece ionizado en un intervalo de pH de aproximadamente 5-8. Se observa que incluso en el GI, donde el nivel de pH es extremadamente bajo en términos de pH fisiológico, la porción química cargada positivamente según la invención permanece cargada positivamente y, por lo tanto, los agentes estimuladores de 5-HT1-BR modificados de acuerdo con la presente invención, no son afectados negativamente por los niveles de pH GI.

Sin embargo, todavía de acuerdo con una forma de realización preferida adicional, dicha porción química cargada positivamente es un grupo de amonio cuaternario o un grupo de sulfonio terciario.

Por "amonio cuaternario", se entiende en la presente memoria un átomo de nitrógeno que forma parte de una molécula (una amina) que está unida a cuatro sustituyentes que no son hidrógeno y, por lo tanto, está cargada positivamente. El término "amina" describe un grupo -NR'R'' en el que cada uno de R' y R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalíclico, arilo o heteroarilo.

Por "grupo sulfonio terciario", se entiende en la presente memoria un átomo de azufre que forma parte de una molécula (un sulfonio) que está unida a tres sustituyentes que no son hidrógeno y, por lo tanto, está cargada positivamente. El término "sulfonio" se refiere a un -S⁺R'R'' en el que R' y R'' son cada uno independientemente alquilo, cicloalquilo, heteroalíclico, arilo o heteroarilo.

De acuerdo con la invención, el término "grupo alquilo" se refiere a un grupo alifático saturado lineal o ramificado. Preferentemente, el grupo alquilo presenta de 1 a 20 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 10 átomos de carbono, y aún más preferentemente entre 1 y 6 átomos de carbono. Siempre que un intervalo numérico; por ejemplo, "1-10", se indique en la presente memoria, implica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, butilo, terc-butilo e isopropilo. El grupo alquilo puede estar sustituido adicionalmente. Cuando está sustituido, el sustituyente puede

ser, por ejemplo, un alquilo, un alqueno, un alquino, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un haluro, un hidróxido, un alcoxi y un hidroxialquilo. El término "alquilo", como se usa en la presente memoria, comprende además hidrocarburo saturado o insaturado, por lo tanto, este término comprende además alqueno y alquino.

- 5 El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo alifático monocíclico o bicíclico que presenta de 3 a 8 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

10 El término "alqueno" describe un alquilo insaturado, como se define en la presente memoria, que presenta por lo menos dos átomos de carbono y por lo menos un doble enlace carbono-carbono, y que puede estar sustituido con uno o más sustituyentes, como se describió anteriormente. El término "alquino" es un alquilo no saturado que presenta por lo menos dos átomos de carbono y por lo menos un enlace triple carbono-carbono y que puede sustituirse con uno o más sustituyentes, como se describe anteriormente.

15 El término "arilo" describe grupos monocíclicos de carbono o policíclicos de anillo fusionado (es decir, anillos que comparten los pares adyacentes de átomos de carbono) que presentan un sistema pi-electrón conjugado completamente.

20 Por "grupo arilo o heteroarilo" se entiende en la presente memoria un grupo aromático mono- o policíclico que comprende preferentemente entre 4 y 15 átomos de carbono, preferentemente entre 5 y 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, por ejemplo, fenilo, naftilo, etc. El grupo arilo de acuerdo con la invención puede además sustituirse por uno o más sustituyentes, como se describe anteriormente. Los grupos heteroarilo comprenden comúnmente por lo menos un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno y azufre - un heteroátomo es cualquier átomo que no es carbono o hidrógeno. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido adicionalmente con uno o más sustituyentes, como se describió anteriormente; los ejemplos representativos son tiadiazol, piridina, pirrol, oxazol, indol, purina y similares.

En una forma de realización más preferida, dicho grupo de amonio cuaternario presenta la fórmula (I)



en la que

35 Z es un anión orgánico o inorgánico, tal como NO_3^- , $H_2PO_4^{2-}$, Br^- , HSO_4^- , $CH_3SO_3^-$, o anión de ácido tartárico; y

R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y cicloalquilo;

40 Preferentemente, R_1 , R_2 y R_3 son cada uno un alquilo que presenta de 1 a 4 átomos de carbono y más preferentemente, R_1 , R_2 y R_3 son cada uno metilo, que dan como resultado el grupo cargado positivamente o el grupo amonio cuaternario $-(NMe_3)^+$.

En otra forma de realización preferida, dicho grupo de sulfonio terciario presenta la fórmula (II)



en la que

Z es un anión orgánico o inorgánico, tal como NO_3^- , $H_2PO_4^{2-}$, Br^- , HSO_4^- , $CH_3SO_3^-$, o anión de ácido tartárico; y

50 R_4 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y cicloalquilo.

55 Preferentemente, R_4 y R_5 son cada uno un alquilo que presenta de 1 a 4 átomos de carbono y más preferentemente, R_4 y R_5 son cada uno metilo, que da como resultado el grupo cargado positivamente, o el sulfonio $-(SMe_2)^+$.

60 El grupo cargado positivamente se puede formar en la vortioxetina a partir de un grupo existente que forma parte de la vortioxetina, es decir, convirtiendo un grupo parcialmente cargado o sin carga en un grupo con carga positiva, o al convertir un grupo con carga positiva existente que puede participar en la interacción de intercambio de protones en uno que no puede participar en dicha interacción, convirtiéndolo en una carga positiva irreversible o una carga positiva permanente, modificando así la vortioxetina.

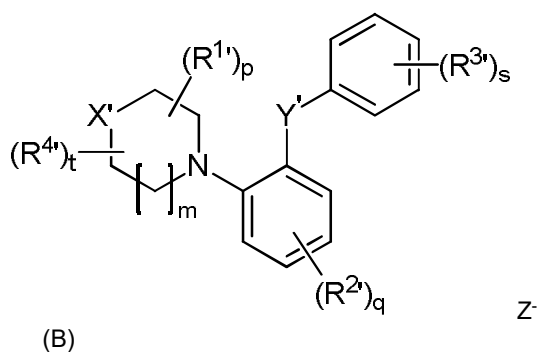
65 Alternativamente, el grupo cargado positivamente se puede agregar a la vortioxetina mediante la sustitución de uno o más átomos de carbono por un grupo cargado positivamente, por ejemplo, reemplazando un átomo de hidrógeno o cualquier otro sustituyente por un amonio cuaternario o un grupo sulfonio terciario.

Los ejemplos de otros agentes estimuladores de 5-HT₁ BR a partir de los cuales pueden derivar los compuestos descritos incluyen, sin limitación, bisarilsulfanilaminas como se describe anteriormente tales como vortioxetina, así como fluoxetina, citalopram, alaproclato, dapoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, venlafaxina, zimelidina, etoperidona, densvalafaxina, duloxetina, minalcipran, nefazodona, venlafaxina, brasofensina, tesofensina y nomifensina, preferentemente vortioxetina, fluoxetina, citalopram, alaproclato, dapoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, venlafaxina y zimelidina. De hecho, todos estos agentes ya comprenden por lo menos un grupo amina, que se puede convertir fácilmente en un amonio cuaternario, es decir, un grupo cargado positivamente tal como se definió anteriormente. En particular, dichos agentes se pueden modificar para que comprendan por lo menos un grupo de amonio cuaternario de fórmula (I) como se describió anteriormente.

Un ejemplo de derivado de citalopram que comprende dicho grupo de amonio cuaternario es el n-metil-citalopram (NMC), cuya síntesis se detalla completamente en la solicitud de patente WO2007/128341.

Las bisarilsulfanil aminas de fórmula (A) comprenden no sólo un grupo amina, sino también un grupo azufre, que puede convertirse fácilmente en un grupo de amonio cuaternario y/o en un grupo de sulfonio terciario, respectivamente. Las porciones cargadas positivamente también se pueden unir al(a los) átomo(s) de carbono del grupo piperazina de dichos compuestos.

Los derivados de dichas bisarilsulfanilaminas son compuestos de fórmula (B) como sigue:



en la que

- Z es un anión orgánico o inorgánico como se define anteriormente, tal como NO₃⁻, H₂PO₄²⁻, Br⁻, HSO₄⁻, CH₃SO₃⁻, o anión de ácido tartárico, o una mezcla de aniones orgánicos o inorgánicos, cuya carga global es tal que el compuesto de fórmula (B) es neutro;
- R¹, R², R³, m, p, q y s son como se definen anteriormente, en la que R³ puede ser opcionalmente un grupo C₁₋₆-alqu(en/in)iloxi sustituido por grupo amonio o sulfonio como se define anteriormente, preferentemente R³ es colina;
- t es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, preferentemente 0 o 1, más preferentemente 0, con la condición de que t+p ≤ 8;
- cada R⁴ es por lo menos una porción química cargada, idéntica o diferente, preferentemente cargada positivamente, como se definió anteriormente, tal como un grupo sulfonio o amonio;
- X' se selecciona de entre el grupo que consiste en:
 - -(NR⁵R⁶)⁺ - en la que
 - R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente de entre el grupo representado por hidrógeno, alquilo, arilo y cicloalquilo como se define en la presente memoria, preferentemente por un hidrógeno, un C₁₋₆-alquilo y un C₃₋₈-cicloalquilo ; o
 - R⁵R⁶ forman junto con el nitrógeno al que están unidos un cicloheteroalquilo, preferentemente un cicloheteroalquilo de 3-8 miembros, más preferentemente un cicloheteroalquilo de 3-6 miembros;
 - -NH-;
 - -NR⁷- en la que R⁷ es un C₁₋₆-alquilo;
 - -N⁺(O⁻)R⁸- en la que R⁸ es un C₁₋₆-alquilo;

- $-\text{NC(O)R}^9-$ en la que R^9 es un aminoácido, estando dicho aminoácido preferentemente cargado positivamente tal como histidina, arginina o lisina, o un derivado de aminoácido, estando dicho derivado preferentemente cargado positivamente tal como colina o carnitina, o C_{1-6} -alquilo fosfonio;

- Y' se selecciona de entre el grupo que consiste en:

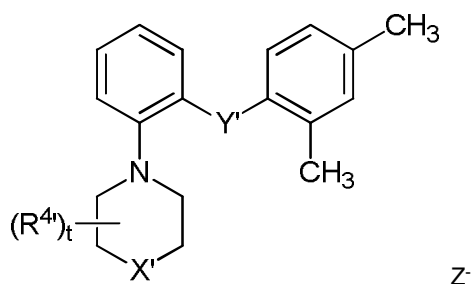
- $-\text{S}-$;
- $-(\text{SR}^{10})^+$ en la que R^{10} se selecciona de entre el grupo representado por hidrógeno, alquilo, arilo y cicloalquilo como se define en la presente memoria, preferentemente es un C_{1-6} -alquilo y
- $-\text{S}^+(\text{O})-$.

El experto en la materia entenderá fácilmente que los aniones Z están presentes para contrarrestar las cargas positivas en la molécula. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (B) comprenden tantos aniones Z como sea necesario para neutralizar las cargas positivas de la molécula. El experto en la materia podría entender que cuando $p > 0$ y $t > 0$, R^1 y R^4 están unidos a cualquiera de los átomos de carbono del anillo heterocíclico, aunque a diferentes carbonos.

Únicamente uno de X' , Y' , R^4 (cuando $t > 0$) y R^3 (cuando está sustituido por un grupo de amonio o sulfonio) puede ser una porción química cargada positivamente.

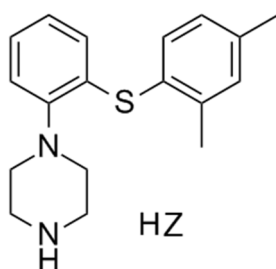
Las formas de realización preferidas con respecto a R^1 , R^2 , R^3 , m , p , q y s son como se definen anteriormente.

Por ejemplo, la vortioxetina puede modificarse químicamente como sigue:

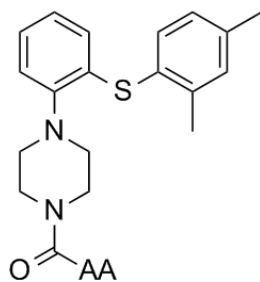


en la que Z , t , R^4 , X' y Y' son como se define anteriormente. Más preferentemente, $t = 0$.

Las sales, derivados y/o análogos de vortioxetina particularmente preferidos, que comprenden por lo menos una porción química cargada, preferentemente cargados positivamente, se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

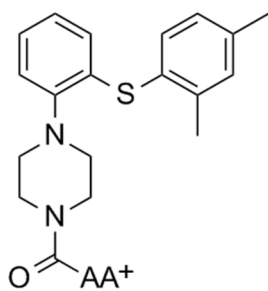


en la que HZ es preferentemente HNO_3 , H_3PO_4 , HBr , H_2SO_4 , $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, o ácidos tartáricos (sales de vortioxetina);



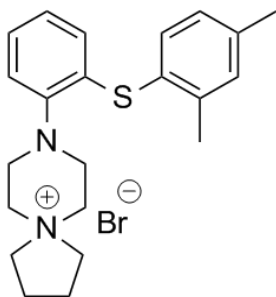
en la que AA es un aminoácido,

5 preferentemente



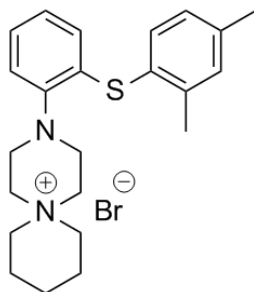
Z^-

en la que AA+ es un aminoácido positivamente cargado tal como histidina, arginina o lisina;



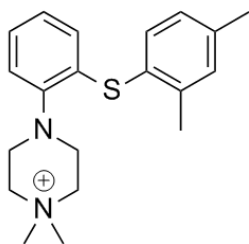
10

(pirrolidinio-vortioxetina);



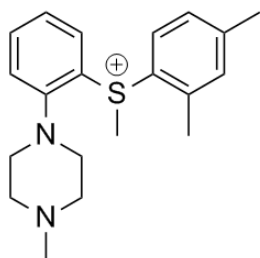
15

(piperazinio-vortioxetina);



Z^{-}

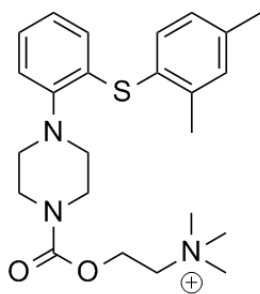
(dimetilamonio-vortioxetina);



Z^{-}

5

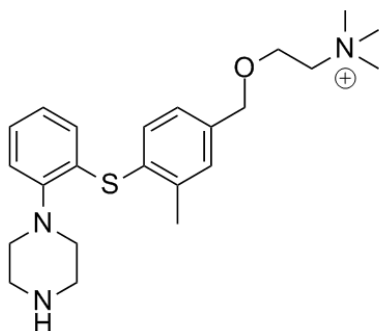
(sulfonio-vortioxetina);



Z^{-}

10

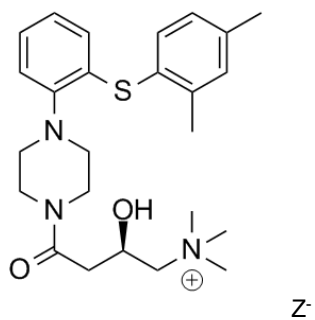
(colina-vortioxetina);



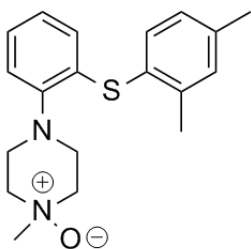
Z^{-}

15

(bencil-colina-vortioxetina);

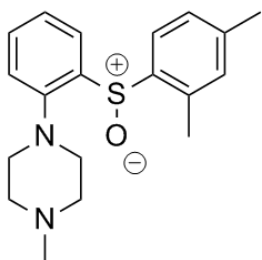


(L-carnitina-vortioxetina);



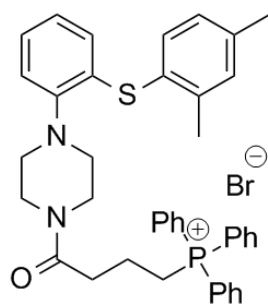
5

(N-óxido-vortioxetina);



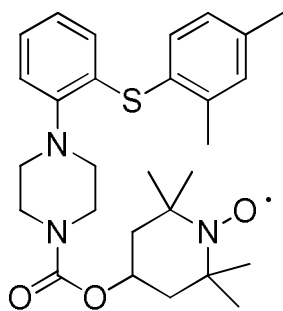
10

(sulfóxido-vortioxetina);



15

(fosfonio-vortioxetina); y



(tempol-carbamato-vortioxetina).

- 5 Preferentemente, dichas sales, derivados y/o análogos de vortioxetina, que comprenden por lo menos una porción química cargada, preferentemente cargada positivamente, se seleccionan de entre el grupo que consiste en:
- sales de vortioxetina como se describió anteriormente;
 - 10 • vortioxetina acoplada a un aminoácido cargado positivamente (preferentemente por lo menos uno) tal como histidina, arginina o lisina, como se describió anteriormente;
 - pirrolidinio-vortioxetina;
 - 15 • piperazinio-vortioxetina;
 - dimetilamonio-vortioxetina;
 - sulfonio-vortioxetina;
 - 20 • N-óxido-vortioxetina;
 - sulfóxido-vortioxetina;
 - 25 • fosfonio-vortioxetina; y
 - tempol-carbamato-vortioxetina.

30 Más preferentemente, dichas sales, derivados y/o análogos de vortioxetina, que comprenden por lo menos una porción química cargada positivamente, se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

- sales de vortioxetina como se describió anteriormente;
- 35 • vortioxetina acoplada a un aminoácido cargado positivamente (preferentemente por lo menos uno) tal como histidina, arginina o lisina, como se describió anteriormente;
- pirrolidinio-vortioxetina;
- piperazinio-vortioxetina;
- 40 • dimetilamonio-vortioxetina;
- sulfonio-vortioxetina;
- 45 • N-óxido-vortioxetina;
- Sulfóxido-vortioxetina; y
- fosfonio-vortioxetina.
- 50

Todavía, incluso más preferentemente, dichas sales, derivados y/o análogos de vortioxetina, que comprenden por lo menos una porción química cargada positivamente, se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

- sales de vortioxetina como se describió anteriormente;

- vortioxetina acoplada a un aminoácido cargado positivamente (preferentemente por lo menos uno) tal como histidina, arginina o lisina, como se describió anteriormente;

5 • pirrolidinio-vortioxetina;

• piperazinio-vortioxetina;

10 • dimetilamonio-vortioxetina;

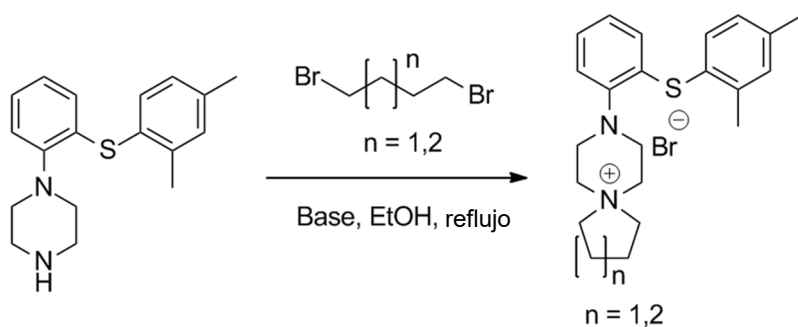
• sulfonio-vortioxetina; y

• fosfonio-vortioxetina.

15 Todavía, incluso más preferentemente, dicha vortioxetina cargada positivamente se selecciona de entre el grupo que consiste en histidina-vortioxetina y pirrolidinio-vortioxetina.

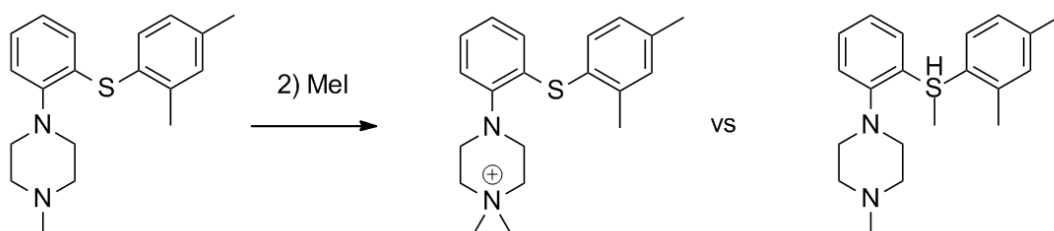
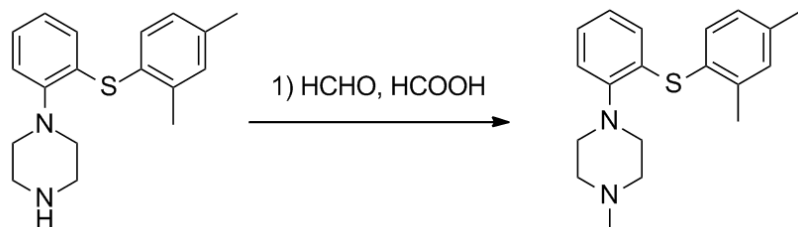
Los compuestos anteriores se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales en la técnica. Dichos métodos se describen con mayor detalle a continuación.

20 Por ejemplo, para sintetizar pirrolidinio-vortioxetina o piperazinio-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:



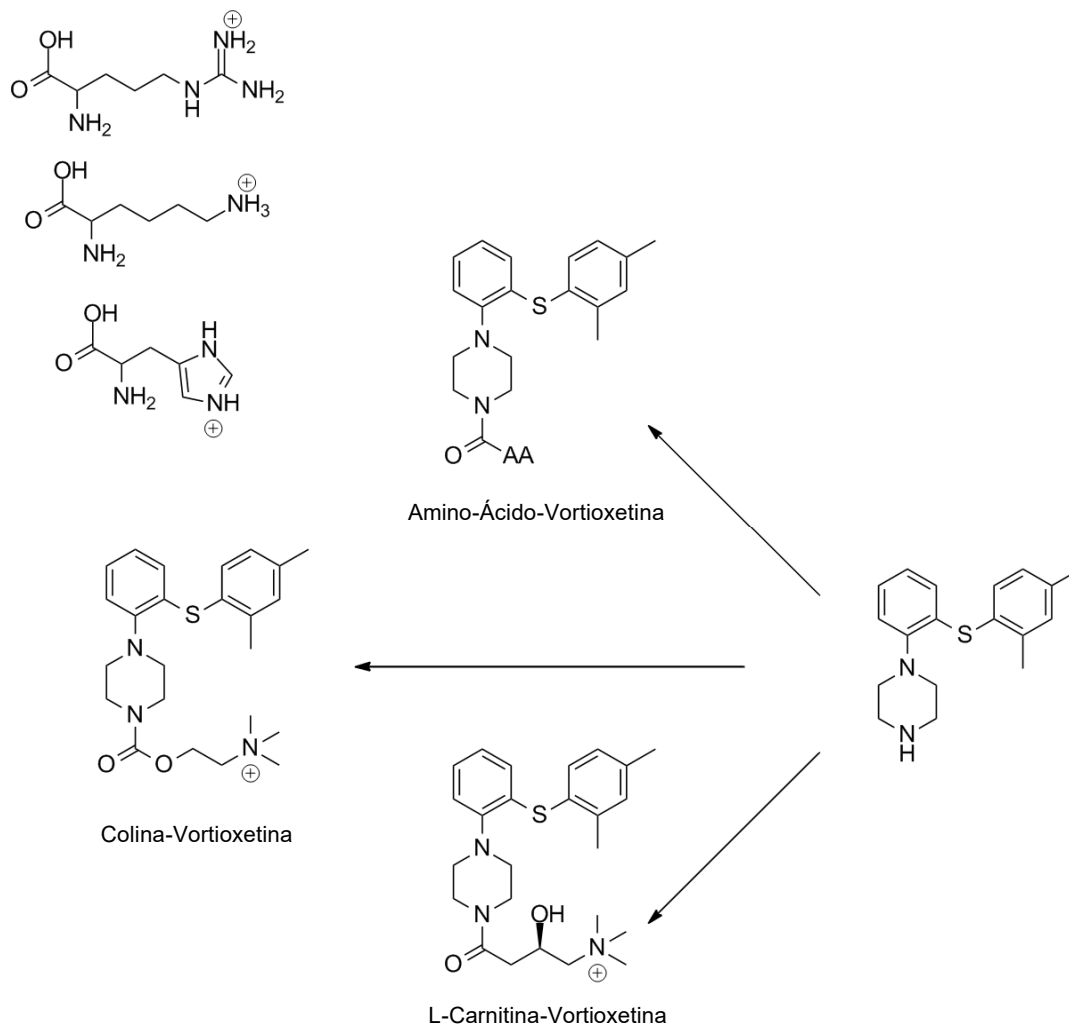
25 Más particularmente, para la formación de pirrolidinio ($n=1$) en 4-arilpiperazina, la reacción puede realizarse usando ya sea K_2CO_3 , etanol (EtOH) y reflujo durante 10h (Mokrosz et al., 1992, incorporada a la presente memoria como referencia), o K_2CO_3 , acetona y reflujo durante 15h (ver el documento WO 2004/9914A1, incorporado a la presente memoria como referencia).

30 Todavía, por ejemplo, para sintetizar dimetilamonio-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:



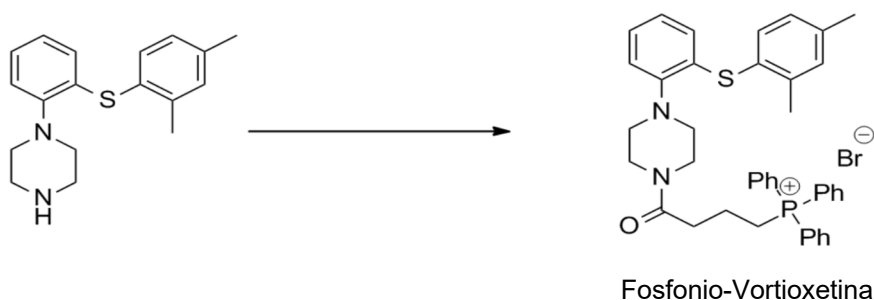
Más particularmente, para la dimetilación de 4-arilpiperazina, puede hacerse referencia a Romanelli et al. (2001) (incorporado a la presente memoria como referencia), la primera etapa es una reacción de Eschweiler-clarke, y la segunda etapa es una metilación.

- 5 Como otro ejemplo ilustrativo, con el fin de sintetizar derivados de aminoácidos de vortioxetina, colina-vortioxetina y carnitina-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:

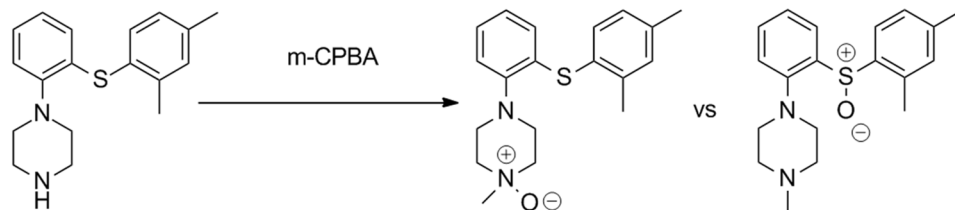


- 10 Más particularmente, para la formación de amida en la carnitina, la reacción puede realizarse con acilhidrazina utilizando piridina, dicloruro de etileno (EDC), dimetilformamida (DMF) y etanol (EtOH) (Kuroda et al., 1996, incorporado a la presente memoria como referencia), o en la amina primaria que usa piridina, dicloruro de etileno (EDC), metanol (MeOH) y acetonitrilo (CH₃CN) (Nakaya et al., 2001, incorporada a la presente memoria como referencia).

- 15 Como otro ejemplo ilustrativo, para sintetizar fosfonio-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:

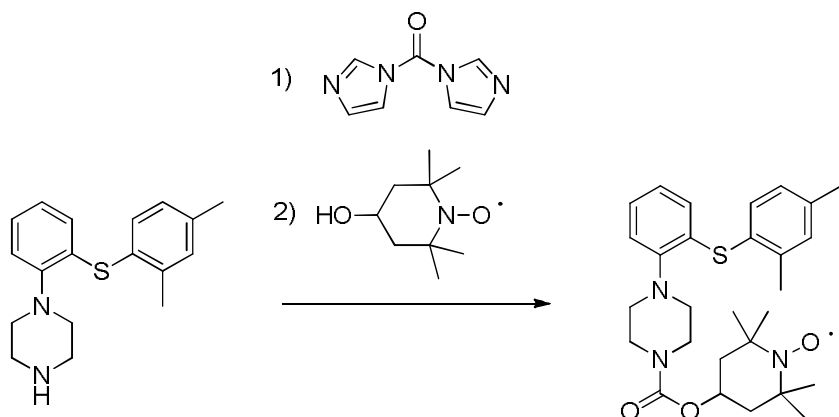


Como otro ejemplo ilustrativo, para sintetizar N-óxido-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:

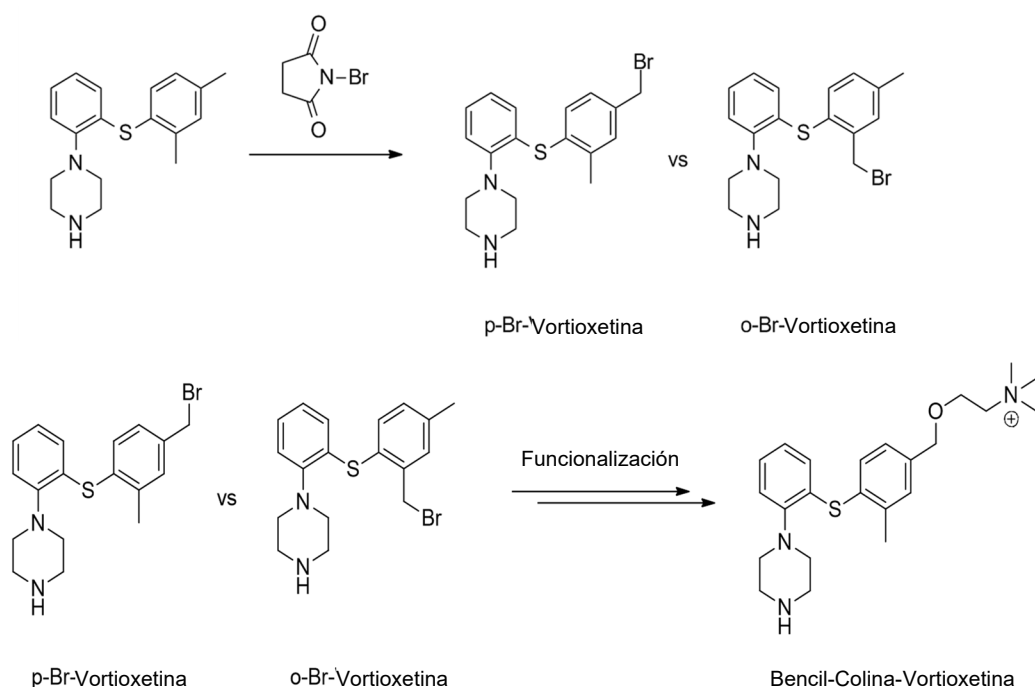


Más particularmente, para la N-oxidación de 4-aril-piperazinas, la reacción puede realizarse usando ácido meta-cloroperoxibenzoico (m-CPBA) y CH_2Cl_2 a 20-45°C (ver los documentos US 2008/153812A1, WO 2011/162515A2 o WO 2004/104007A1, incorporados a la presente memoria como referencia).

Como otro ejemplo ilustrativo, para sintetizar tempol-carbamato-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:



Como otro ejemplo ilustrativo, con el fin de sintetizar bencil-colina-vortioxetina, un experto en la materia puede proceder de la siguiente manera:



Más particularmente, para la bromación de posición bencílica, la reacción puede realizarse utilizando N-bromosuccinimida, azobisisobutironitrilo (AIBN) y tetraclorometano (CCl₄) (ver el documento US 2010/4159A1, incorporado a la presente memoria como referencia) o N-bromosuccinimida, ácido meta-cloroperoxibenzoico (m-CPBA) y tetraclorometano (CCl₄) (ver Farmaco, 1989, 44, de p.683, incorporado a la presente memoria como referencia).

El agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT₁ BR) como se definió anteriormente puede usarse con fines terapéuticos, en una composición farmacéutica que puede comprender agente(s) activo(s) adicional(es), o en una preparación combinada que puede administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente a un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es proporcionar el agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT₁ BR) como se definió anteriormente, para utilizarse preferentemente como un adyuvante, en un método terapéutico para retrasar la progresión de pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s).

Más precisamente, la solicitud se refiere a la utilización de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT₁ BR) como se describe en la presente memoria, para fabricar un medicamento destinado a retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de las) tejido(s) del músculo esquelético en un sujeto que lo necesita.

Es decir, la solicitud divulga un método terapéutico para retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del tejido muscular esquelético en un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT₁ BR) como se describe en la presente memoria, a dicho sujeto.

Todavía, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la utilización como:

- i) un promotor de autorrenovación de células satélite y/o diferenciación; y/o
- ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite,

en la que dicha composición comprende por lo menos vortioxetina o derivados de la misma como se definió anteriormente y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Más precisamente, la solicitud divulga la utilización de dicha composición farmacéutica, para fabricar un medicamento para i) promover la autorregeneración y/o diferenciación de las células satélite y/o ii) prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite.

Es decir, la invención la solicitud divulga un método para i) promover la autorregeneración y/o diferenciación de células satélite y/o ii) prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de dicha composición, a un sujeto que lo necesite.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable", se entiende en la presente memoria un compuesto de calidad farmacéutica que mejora la administración, estabilidad o biodisponibilidad de un agente activo, y puede metabolizarse y no es tóxico para un sujeto al que se administra. Los excipientes preferidos de acuerdo con la invención incluyen cualquiera de los excipientes comúnmente usados en productos farmacéuticos, tales como, por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, almidón y polvo de soja.

De acuerdo con una forma de realización preferida, dicha composición farmacéutica comprende además por lo menos un agente activo que retrasa, previene o trata una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del tejido del músculo esquelético (aunque con una posible eficacia diferente a la del agente estimulador de 5-HT1 BR de acuerdo con la invención) y/o aumentar o potenciar la acción del agente estimulador de 5-HT1 BR (es decir, aumentar o potenciar la estimulación de la actividad del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B que es ejercida por el agente estimulador de 5-HT1 BR). Dicho agente puede ser un agente terapéutico conocido por ejemplo por retrasar, prevenir o tratar una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético.

Dichos agentes activos son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen por ejemplo células satélite, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, pericitos, mesangioblastos, siendo las células mencionadas anteriormente naturales o genéticamente modificadas, agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides y NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos), agentes miotróficos tales como miostatina, agentes inmunoterapéuticos, anticuerpos, elementos genéticos tales como CRISPR/Cas9, y combinaciones de los mismos, preferentemente células satélite, células satélite modificadas genéticamente, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, pericitos, mesangioblastos y combinaciones de los mismos. El pindolol y el (S)-(-)-pindolol también son agentes activos adecuados, ya que son conocidos por potenciar la acción de los antidepresivos. De hecho, la preparación combinada del agente estimulador de 5-HT1 BR de acuerdo con la invención y de los agentes activos mencionados anteriormente puede mejorar significativamente la promoción de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o la prevención y/o inhibición del agotamiento del conjunto de células satélite, mejorando de este modo la regeneración muscular.

Está dentro de la experiencia del experto en la materia seleccionar la combinación apropiada de agente estimulador de 5-HT1 BR y agente activo que retrasa, previene o trata una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético y/o aumentar o potenciar la acción del(de los) agente(s) estimulador(es) de 5-HT1 BR, entre los agentes activos anteriores, para los fines de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede estar preferentemente en una forma adecuada para los fines de la invención. Por ejemplo, dicha composición puede estar en una forma adecuada para administración parenteral, oral o tópica, tal como una suspensión líquida, una forma de dosificación sólida (gránulos, píldoras, cápsulas o comprimidos), o una pasta o gel. El término parenteral como se utiliza en la presente memoria incluye inyección subcutánea, inyección intravenosa o intramuscular. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para administración intramuscular.

La composición anterior se puede utilizar más particularmente para retrasar la progresión de la pérdida y/o el daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético.

Por lo tanto, en una forma de realización particular, la invención proporciona la composición farmacéutica como se define anteriormente, para la utilización en un método terapéutico para retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético.

Más precisamente, la solicitud divulga la utilización de dicha composición farmacéutica, para fabricar un medicamento destinado a retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético en un sujeto que lo necesite.

Es decir, la solicitud divulga un método terapéutico para retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s) en un sujeto que lo necesita, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de dicha composición farmacéutica a dicho sujeto.

Como se indicó anteriormente, es particularmente ventajoso combinar un agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) según la invención con un agente activo que retrasa, previene o trata una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético y/o aumenta o potencia la acción de los agentes estimuladores de 5-HT1 BR convencionalmente utilizados en la técnica.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es proporcionar vortioxetina o derivados de la misma y un agente activo

que retrasa, previene o trata una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) del músculo esquelético, y/o aumentar o potenciar la acción de agentes estimuladores de 5-HT1 BR, como una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en un sujeto que lo necesite.

5 Los agentes activos preferidos de acuerdo con la invención que retrasan, previenen o tratan una pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del tejido del músculo esquelético y/o aumentan o potencian la acción de los agentes estimuladores de 5-HT1 BR son como se describió anteriormente.

10 El experto en la materia puede adaptar la dosis y el esquema de administración del agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) o de la composición farmacéutica según la invención, dependiendo de la edad, peso y gravedad de los síntomas del sujeto que debe ser tratado.

15 Por lo tanto, en otro aspecto, el receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) o la composición según la invención se pueden administrar una vez al día, preferentemente durante un período de aproximadamente 6 semanas (en particular para agentes estimuladores de 5-HT1 BR de acción lenta tal como fluoxetina) o durante un período de aproximadamente 12 días (en particular para agentes estimuladores de 5-HT1 BR de acción rápida tales como vortioxetina).

20 Todavía, en una forma de realización preferida, el agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B (5-HT1 BR) o la composición según la invención se administra en una dosificación comprendida entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, preferentemente entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, más preferentemente entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg y preferentemente a 18 mg/kg.

25 La invención se refiere asimismo a la utilización *in vitro* de la vortioxetina o los derivados de la misma como se describe en la presente memoria, para promover la autorrenovación y/o la diferenciación de las células satélite.

30 Es decir, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para promover la autorrenovación y/o la diferenciación de células satélite, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de vortioxetina o derivados de la misma como se describe en la presente memoria a una muestra biológica aislada que comprende células satélite, en particular un conjunto de células satélite. Dicha muestra biológica puede ser en la presente memoria una muestra de músculo.

35 En otro aspecto, el agente estimulador del receptor de 5-hidroxitriptamina 1B de acuerdo con la invención se puede usar para fines de cribado de fármacos. En particular, pueden proporcionarse nuevos ensayos de fármacos que identifiquen los agentes terapéuticos que interfieren eficazmente con la autorrenovación y/o diferenciación de las células satélite y/o con la reposición del conjunto de células satélite *in vivo*.

40 En este aspecto, la invención se refiere más particularmente a un método de cribado *in vitro* para identificar un agente o una combinación de agentes que promueven la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto células satélite aisladas con un agente candidato o una combinación de agentes candidatos;

45 b) evaluar el fenotipo celular de dichas células;

50 c) comparar el fenotipo celular en la etapa b) con el fenotipo de las células satélite en ausencia de dicho agente o combinación de agentes, y/o con el fenotipo de las células satélite puestas en contacto con vortioxetina o derivados de la misma, como se describe anteriormente, o comparar el fenotipo celular en la etapa b) con el fenotipo de las células satélite en ausencia de dicho agente o combinación de agentes, y con el fenotipo de las células satélite puestas en contacto con vortioxetina o derivados de la misma, como se describe anteriormente.

55 Preferentemente, las células satélite aisladas de la etapa a) son células satélite inactivas.

El fenotipo celular puede evaluarse analizando la expresión de marcadores celulares que son característicos de células satélite inactivas de autorrenovación y/o diferenciación, como se describió anteriormente.

60 La presente invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada de los experimentos, que incluyen ejemplos. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que la presente descripción detallada no es limitativa y que pueden realizarse diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios sin apartarse del alcance de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Marcadores del gen clave expresados en células satélite (MSC) y células progenitoras (MPC) del músculo esquelético adulto (de Shi et al., 2006).

Figura 2. La fluoxetina aumenta el número de vasos y el número de células satélite (SC) en el músculo esquelético

(a) Representación esquemática de suministro de fluoxetina y puntos temporales de sacrificio. (b) Número de células satélite por mm² en sección. (c-d) Sección histológica de la *tibialis anterior* de un ratón tratado con placebo (c) y ratón *TgPax7nGFP* tratado con fluoxetina (d). Las flechas señalan las células satélite. (e) Número de vasos por mm² después de la administración *intra-peritoneal* (IP) o *per os* de fluoxetina en diferentes puntos temporales. (f-g) Sección histológica de *tibialis anterior* de un ratón tratado con placebo (f) y fluoxetina (g) *Flk1^{GFP/+}*. La imagen muestra GFP endógeno. (h) Número de células CD31+ en tapones Matrigel injertados subcutáneamente en ratones tratados con placebo y fluoxetina. (i-j) Imagen representativa de un tapón Matrigel después de 6 semanas en ratón C57Bl/6 tratado con placebo (i) o fluoxetina (j). (k-l) Imagen representativa de un vaso (flechas) en el tapón Matrigel detectado por tinción HE en ratones tratados con placebo (k) o fluoxetina (l). (m) Longitud de los vasos 4 días después del sembrado en placas de perlas cytodex® cubiertas con HUVEC. (n) Imagen representativa de una perla cytodex® 4 días después del sembrado en placas en presencia de plasma placebo. (o) Imagen representativa de una perla cytodex® 4 días después del sembrado en placas en presencia de plasma en ratones tratados con fluoxetina.

Utilización de inmunotinción y clasificación celular FACS en las figuras (p) a (v):

(p) Número de células que expresan Pax7GFP por TA digerido (expresado como un número absoluto) contado por FACS. (q) Perfil de FACS representativa de TA digerido de ratón *TgPax7nGFP*. (r) Número acumulativo de BrdU+ SC. Los ratones *Tg:Pax7nGFP* (n=3 por punto temporal) recibieron BrdU en agua potable junto con fluoxetina o placebo desde el principio del tratamiento hasta el final. El músculo TA se digirió y las células se aislaron mediante FACS girada sobre un portaobjetos e inmunoteñida contra BrdU. (s) Porcentaje de células BrdU+ en ratones *Tg:Pax7nGFP* (n=3 por punto temporal). Los ratones *Tg:Pax7nGFP* recibieron el tratamiento con fluoxetina *vía oral* y se inyectaron con BrdU dos veces (12h y 4h antes de la muerte) el músculo TA se digirió y las células se aislaron mediante FACS girado en un portaobjetos y se inmunotifieron contra BrdU. (t) Número de vasos por mm² contados en la sección histológica usando immunoetiquetado de CD31 en animales tratados con placebo y fluoxetina. (u-v) Secciones histológicas representativas de laminina e inmunotinción CD31+ en ratones tratados con placebo (u) y fluoxetina (v)

Para las figuras (a) a (o): n=8 ratones usados por condición, excepto por los experimentos *in vivo* las células donde n=6. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100µm.

Para las figuras (p) a (v): n=7 ratones usados por condición, excepto por los experimentos con BrdU n=3 por punto temporal. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. **P < 0.01. La barra de escala representa 100µm.

Figura 3. La fluoxetina mejora la regeneración muscular al aumentar el número de células satélite

(a) Representación esquemática de los puntos temporales de suministro de fluoxetina, lesiones musculares, inyecciones de BrdU y sacrificio. (b) Número de células Pax7GFP+ por mm² 4 días después de la lesión. (c-d) La inmunotinción de las células Pax7GFP+ en la sección después del tratamiento con placebo (c) y fluoxetina (d). (e) Número de diferenciación de células (Miogenina+) 4 días después de la lesión. (f-g) Imágenes representativas de células miogenina y GFP en animales tratados con placebo (f) y fluoxetina (g). (h-i) Tinción de hematoxilina y eosina de TA crioseccionada 14 días después de la lesión en los animales tratados con placebo (h) y fluoxetina (i). (j) Tamaño de fibra en µm² en placebo y fluoxetina 14 días después de la lesión. (k) Porcentaje de área fibrótica 14 días después de la lesión en ratones tratados con placebo y fluoxetina. (l) Tinción de hematoxilina y eosina de AT crioseccionada después de lesiones en serie.

n=7 ratones usados por condición, excepto por el conteo de células GFP+ donde n=9. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100µm.

Figura 4. La regeneración muscular es más rápida y el número de células satélite autorrenovables es mayor después del tratamiento con fluoxetina.

(a) Número de Gr1 inmunitarias (granulocitos) y F4/80 (macrófagos) en los ratones tratados con placebo y con fluoxetina, 4 y 14 días después de la lesión. (b-c) Sección histológica de tinción con sirius red (fibrosis) 14 días después de la lesión en animales tratados con placebo (b) y fluoxetina (c). (d) Depósito de calcio 14 días después de la lesión en animales tratados con placebo vs. con fluoxetina. (e) Número de fibras en los animales tratados con placebo vs. con fluoxetina 14 días después de la lesión. (f) Número de vasos en un ratón *Flk1^{GFP/+}* 28 días

después de la lesión en animales tratados con placebo vs. fluoxetina. (g) Número de SC en un ratón *TgPax7nGFP* 28 días después de la lesión en animales tratados con placebo vs. fluoxetina. (h) Número de SC después de varias rondas de lesión en los animales tratados con placebo en comparación con fluoxetina. (i) Primera división evaluada por videomicroscopía en vivo *in vitro*. Las células se sembraron en placas con plasma procedente de animales C57Bl/6 tratados con placebo o animales C57Bl/6 tratados con fluoxetina. (j) Tasa de división evaluada por videomicroscopía en vivo *in vitro*. Las células se sembraron en placas con plasma procedente de animales C57Bl/6 tratados con placebo o animales C57Bl/6 tratados con fluoxetina. (k) Porcentaje de células diferenciadoras (miogenina +) 4 días después de sembrado en placas. Las células se sembraron en placas con plasma procedente de animales C57Bl/6 tratados con placebo o animales C57Bl/6 tratados con fluoxetina.

n = 7 ratones utilizados por condición. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100 μ m.

Figura 5. El efecto de la fluoxetina sobre las células endoteliales y satélite se logra a través de receptores 5-HT1 B

(a) Esquema de administración de fluoxetina e inhibidor. (b) Cuantificación por RT-qPCR de los diferentes receptores serotoninérgicos mostrados como un doble aumento/placebo en células endoteliales y satélite. (c) Número de células de diferenciación por mm² (miogenina+) en el placebo, fluoxetina y fluoxetina más antagonista GR127935 5-HT1 B 4 días después de la lesión. (d) Tamaño de la fibra 14 días después de la lesión en μ m² en el placebo, fluoxetina y fluoxetina más antagonista GR127935 5-HT1 B. (e) Porcentaje de área fibrótica 14 días después de la lesión. (f) Número de SC por TA de un ratón *Tg:Pax7nGFP* en fluoxetina, fluoxetina e inhibidor GR127935, inhibidor GR127935 solo. (g-h) imágenes representativas del número de células GFP+ en la sección en la fluoxetina (g) y fluoxetina con inhibidor GR127935 5-HT1 B (h). La imagen muestra GFP endógeno. (i) Número de vasos en ratones *Flk1^{GFP/+}* después del tratamiento con fluoxetina y antagonista GR127935 5-HT1 B. (j-k) Sección histológica representativa del número de vasos (contados con GFP endógena de ratón *Flk1^{GFP/+}*) en fluoxetina (j), fluoxetina e inhibidor (k) por mm².

n=7 ratones usados por condición (n=5 para los controles). Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100 μ m.

Figura 6. 5-HT1 BR, y no 5-HT2 BR, está involucrado en el efecto de la fluoxetina.

(a) Cantidad de SC 4 días después de la lesión en el placebo, fluoxetina, fluoxetina y antagonista GR127935 5-HT1 BR y antagonista MDL 100907 5HT2 BR. (b) Depósito de calcio 14 días después de la lesión en el placebo, fluoxetina, fluoxetina y antagonista GR127935 5-HT1 BR. (c) Número de Gr1 inmunitarias (granulocitos) y F4/80 (macrófagos) 4 días después de la lesión en el placebo, fluoxetina, fluoxetina y antagonista GR127935 5-HT1 B y antagonista MDL100907 5-HT2 BR. (d) Número de Gr1 inmunitarias (granulocitos) y F4/80 (macrófagos) 14 días después de la lesión en el placebo, fluoxetina, fluoxetina y antagonista GR127935 5-HT1 BR y antagonista MDL100907 5-HT2 BR. (e) Número de células de diferenciación (miogenina+) 4 días después de la lesión con fluoxetina y fluoxetina y antagonista de 5-HT2 BR. (f) Número de SC de *TgPax7nGFP* después de la inhibición con 5-HT2 BR mediante el antagonista MDL100907. (g) Número de vasos de *Flk1^{GFP/+}* después de la inhibición con 5-HT2 BR mediante el antagonista MDL100907.

n=6 ratones usados por condición (n=5 para los controles). Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100 μ m.

Figura 7. El plasma *in vitro* de ratones tratados con fluoxetina acelera la diferenciación en etapas tempranas y aumenta la autorrenovación en etapas posteriores tanto de células satélite humanas como murinas.

(a) Esquema de suministro de fluoxetina e inhibidor *in vitro*. (b) Porcentaje de células Pax7+ entre el número total de SC ordenadas por FACS a lo largo del tiempo en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor de MDL100907. (c) Número de células SC autorrenovadas (también llamadas células de reserva) (Pax7+/EdU-) 14 días después del sembrado en placas de SC clasificadas con FACS en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con el inhibidor MDL100907. (d) Porcentaje de células MyoD+ entre el número total de SC clasificadas con FACS a través del tiempo en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma con fluoxetina con inhibidor MDL100907. (e) Porcentaje de células miogenina+ entre el número total de SC clasificadas por FACS a lo largo del tiempo en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor MDL100907. (f) Primera división celular evaluada por videomicroscopía en vivo en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor de MDL100907. (g) Velocidad de división evaluada mediante videomicroscopía en vivo en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor de GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor de MDL100907. (h) Porcentaje de células Pax7+ investigadas por inmunofluorescencia *in vitro* cocultivadas con agonista específico de CP94253 5HT1B. (i) Porcentaje de células miogenina+ investigadas por inmunofluorescencia *in vitro* cocultivadas con agonista específico CP94253 5HT1BR. (j) Células de diferenciación

(miogenina+) procedentes de SC humano primarias obtenidas mediante la técnica de presembrado en placas 4 días después de la siembra en placas en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor de MDL100907. (k) Células de autorrenovación (Pax7+/EdU-) procedentes de SC humanas primarias obtenidas mediante la técnica de presembrado en placas 14 días después del sembrado en placas en plasma de placebo, plasma de fluoxetina, plasma de fluoxetina con inhibidor GR127935 *in vitro*, plasma de fluoxetina con inhibidor de MDL100907.

n=6 ratones utilizados por condición, excepto para mioblastos humanos en los que n=4 por condición. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. La barra de escala representa 100 μ m.

Figura 8. La fluoxetina mejora el fenotipo de ratones distróficos

(a) Cuantificación del área necrótica (en mm²) en animales tratados con placebo y fluoxetina. (b) Tamaño de fibra (área) de ratones mdx tratados con placebo y fluoxetina. (c-d) La tinción de hematoxilina y la teiosina de TA crioseccionada de ratones Mdx tratados con placebo (c) o fluoxetina (d). (e) Número de vasos en ratón Mdx ya sea tratado con placebo o con fluoxetina contado por la inmunotinción con CD31 y expresado en número de células por mm². (f) Número de células en reproducción (Células Pax7+ y BrdU+) en ratón Mdx tratado con placebo o con fluoxetina. (g) Ejemplo de Luminex® en Interleucina 6 (IL6) que representa el nivel de expresión de proteínas en picogramo/gramo de plasma en ratones tratados con placebo y fluoxetina. (h) Ejemplo de Luminex® en Interleucina 10 (IL10) que representa el nivel de expresión de proteínas en picogramo/gramo de plasma en ratones tratados con placebo y fluoxetina. (i) Número de células Gr1+ en TA crioseccionado de ratones Mdx tratados con placebo y fluoxetina. Los números se muestran en número absoluto por corte transversal.

Figuras 9. 5HT1B-R antagonista elimina los efectos benéficos de fluoxetina en el fenotipo distrófico

(a) Cuantificación del área necrótica (en mm²) en animales tratados con el placebo, fluoxetina y fluoxetina con inhibidor del GR127935 5HT1BR. (b) Tamaño de fibra (área) de ratones Mdx tratados con placebo, fluoxetina y fluoxetina con inhibidor del GR127935 5HT1BR. (c-e) Tinción de hematoxilina y eosina de TA crioseccionado de ratones Mdx tratados con placebo (c) o fluoxetina (d) o fluoxetina e inhibidor GR127935 (e). (f) Número de vasos en ratón Mdx ya sea tratado con placebo, fluoxetina o fluoxetina y el inhibidor del GR127935 5HT1BR contado por la inmunotinción con CD31 y expresado en número de células por mm². (g) Número de células en reproducción (células Pax7+ y EdU+) en Mdx ya sea tratado con placebo, con fluoxetina o fluoxetina y el inhibidor del GR127935 5HT1BR. (h) Número de células Gr1+ en TA crioseccionado de ratones Mdx tratados con placebo y fluoxetina. Los números se muestran en número absoluto por corte transversal. n=9 ratones por condición. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. *P < 0.05; ***P < 0.001; ns: no importante La barra de escala representa 100 μ m. (i) Prueba de fuerza de agarre. La fuerza total de animales se midió (4 extremidades) en ratones tratados con fluoxetina y placebo. (j) Máxima tensión (6V) de las fibras musculares edl de ratones mdx tratados con fluoxetina o placebo. (k) Tensión de edl aislado a través de diferente voltaje en ratones mdx tratados con placebo y fluoxetina.

Figura 10. La vortioxetina aumenta el número de vasos y el número de células satélite *in vivo*. (a) Representación esquemática de suministro de vortioxetina y tiempo de sacrificio. (b) Número de vasos contado en sección después de inmunotinción CD31 por mm² después del tratamiento I.P. (c) Número de vasos contado en sección después de inmunotinción CD31 por mm² después del tratamiento P.O. (d) Número de células satélite contado por FACS en placebo, ratones *Tg:Pax7nGFP* tratados I.P con vortioxetina 12 días y 3 semanas. (e) Número de células satélite contado por FACS en placebo, ratones *Tg:Pax7nGFP* tratados P.O con vortioxetina 12 días y 3 semanas.

Figura 11. La vortioxetina aumenta el número de vasos y el número de células satélite *in vivo* e *in vitro* por medio del receptor de 5-HT1 B. (a) Número de vasos contado en sección por mm² con inmunotinción CD31 después del tratamiento con vortioxetina del tratamiento I.P del ratón *TgPax7nGFP* por 12 días a 20mg/Kg. (b) Número de células satélite contado por FACS por tibialis anterior después del tratamiento con vortioxetina del tratamiento I.P *Tg:Pax7nGFP* por 12 días a 20mg/Kg. (c-e) Se clasificaron las células por FACS de ratones *Tg:Pax7nGFP* y se sembraron en placas 2000 células por cm². El siguiente día se agregó vortioxetina a 10 μ M. En los tiempos indicados, las células se fijaron y tiñeron para Pax7 (c), Myod (d), MyoG (e).

Figura 12. Los derivados de vortioxetina, la histidina-vortioxetina y pirrolidinio-vortioxetina aumentan el número de vasos y células satélite: (a-b) Se clasificaron las células FACS de ratones *Tg:Pax7nGFP* y se sembraron en placas en 2000 células por cm². El siguiente día, se agregó histidina-vortioxetina o pirrolidinio-vortioxetina a 10 μ M (a) Porcentaje de Pax7+ células en diferentes puntos temporales *in vitro* con PBS o vortioxetina o histidina-vortioxetina o pirrolidinio-vortioxetina. (b) Porcentaje de células MyoG+ en diferentes puntos temporales *in vitro* con PBS o vortioxetina o histidina-vortioxetina o pirrolidinio-vortioxetina (c-d) PBS (n=4) o histidina-vortioxetina (n=5) o pirrolidinio-vortioxetina (n=5) se inyectó IP a ratones *Tg:Pax7nGFP* durante 12 días a 20mg/kg. Se digirió el músculo (TA) y se contó por citometría. (c) muestra histidina-vortioxetina en comparación con inyecciones PBS (d) muestra pirrolidinio-vortioxetina en comparación con PBS. Los datos se representan como media $\pm$ s.d. **P < 0.01.

Ejemplos

Fluoxetina, vortioxetina y sus derivados aumentan el número de células madre musculares y mejoran la capacidad regenerativa del músculo

1. Material y métodos

1.1. Inyección y lesión de ratones

Todos los procedimientos en este estudio fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee en el Institut Pasteur (CETEA 2014-004). A menos que se especifique, se usan ratones macho de 8 semanas de edad en este estudio y se alojan en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 en una instalación libre de patógenos con temperatura y humedad controladas. Se les da alimento y agua *ad libitum*.

Los animales fueron anestesiados con ketamina (Imalgene1000 100 mg/Kg Merial) y xilacina (Rompun2% 20 mg/Kg Bayer) antes de la lesión. Los animales se hidrataron y se trataron con analgésico (buprenorfina Axience 0.3 mg/kg) dos veces al día durante 4 días después de la lesión. Para la lesión, se anestesiaron ratones como se describe anteriormente y se inyectaron 10 µl de 12.5 µg/ml notexina (Lotaxan) en la *Tibialis anterior*. Todos los protocolos fueron revisados por el Institut Pasteur, la autoridad competente, para el cumplimiento con las regulaciones francesas y europeas sobre bienestar animal y con las recomendaciones del servicio de salud pública. Este proyecto ha sido revisado y aprobado (#2013-0044) por el comité de ética del Institut Pasteur (C2EA 89 - CETEA).

Entre los ratones analizados, los ratones *Flik1^{GFP/+}*, en los que la proteína verde fluorescente (GFP) se dirige en el locus del gen VEGF-receptor-2, y que exhibe una señal brillante de GFP en todas las células endoteliales, fueron proporcionados amablemente por Alexander Medvinsky (Institute for Stem Cell Research, University of Edinburgh, Edinburgh, UK).

1.2. Análisis histológico

El tibialis anterior (TA) se diseccionó cuidadosamente y se congeló instantáneamente en isopentano refrigerado con nitrógeno líquido durante unos minutos y se almacenó a -80°C antes de la crio-sección (secciones de 10 µm). Las secciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante la noche antes de la tinción. Las secciones se rehidrataron en PBS durante 10 minutos y se fijaron en formalina al 10% durante 3 minutos. Las secciones se tiñeron rutinariamente con hematoxilina y eosina (HE) usando una máquina de tinción automática o manualmente con sirius rojo.

Las diapositivas se evaluaron por doble ciego y se automatizaron cuando fue posible (diámetro de la fibra, recuento celular, área infartada).

1.3. Inmunotinciones

La inmunotinción se realizó en crio-secciones fijadas con paraformaldehído al 4% (PFA EMS#15710) en PBS frío, se permeabilizó con Triton X-100 al 0.5% durante 20 min a temperatura ambiente, se lavó y se bloqueó con BSA al 10% durante 30 min. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C (ver la tabla 1 a continuación) y con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 1/250 y Hoechst durante 45 minutos. Las secciones se analizaron luego utilizando un axioscan automatizado (Zeiss) o un Observer.Z1 Apotome invertido (Zeiss). Para la evaluación de la apoptosis, las células se recogieron en suero al 2%, se centrifugaron en poliD-lisina (Sigma-Aldrich#P6407) y se fijaron inmediatamente con PFA al 4%.

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados en el estudio

Antígeno	Huésped	Concentración	Referencias
Ly-6C (Gr1)	Rata	0.5 µg/ml	Caltag LabRM3030
CD31	Rata	15 µg/ml	BD Pharmingen 550274
Pax7	Ratón	12 µg/ml	DSHB
Laminina	Conejo	0.69 µg/ml	Sigma-Aldrich L9393
Anticonejo burro secundario (Monoclonal de fracción IgG)	Variable de acuerdo con el huésped Ab primario	0.5 µg/ml	JacksonImmuno #711486152 (Conejo) #200162037 (Ratón)

1.4. Clasificación, conteo y cultivo celular

La disección muscular se realizó como se describió previamente en DMEM frío. Luego se cortaron los músculos con tijeras pequeñas y se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml con collagenasa al 0.1% y tripsina al 0.25% a 37°C con agitación suave. Después de 20 minutos, se recogió el sobrenadante en suero al 20% colocado en hielo, y se añadió la solución de collagenasa/tripsina para continuar la digestión. Una vez que el músculo fue completamente digerido, la solución se filtró usando filtros de células de 40 µm. Las células satélite se cultivaron en DMEM-Glutamax 1:1 (Gibco#41965-039):MCDB201 (Sigma#M6770) que contiene FBS al 20% en suero (Biowest S1860). El medio se filtró usando filtros de 0.22 µm. Las células se sembraron en un recubrimiento de Matrigel (BD Biosciences#354234) y se guardaron en una incubadora (37°C, 5% de CO₂). Para algunos experimentos *in vitro* se extrajo plasma de animales tratados con fluoxetina o vortioxetina después de 6 semanas mediante punción del corazón seguido de centrifugación a 1500 g durante 15 minutos. El sobrenadante así obtenido reemplazó a FBS en el medio de cultivo; el resto del medio no se modificó.

Para el conteo de células satélite, sólo el músculo del *tibialis anterior* se disecó y se digirió como se describió anteriormente, y la totalidad del tubo se analizó para evaluar el número de células satélite por músculo. El análisis FACS se realizó usando un FACSasia (Beckman). Todos los análisis y la cuantificación se realizaron con el software Summit v4.3 de DakoCytomation y el software FloJo. Las células se marcaron con yoduro de propidio 10 µg/ml (Sigma-Aldrich#P4170) para excluir las células muertas y se visualizaron usando el canal PE (ficoeritrina, rojo) en el perfil FACS.

1.5. Videomicroscopía en vivo

Las células aisladas por FACS se colocaron durante la noche en una placa de fondo de vidrio de 24 pocillos (P24G-0-10-F; MatTek) recubiertas con Matrigel (BD Biosciences#354234) y se colocaron en una incubadora en medio preequilibrado (DMEM 1:1 Glutamax: MCDB [Sigma-Aldrich], 20% de FCS (Biowest S1860). La placa se incubó después a 37°C, 5% CO₂ (Zeiss, Pecon). Se usó un Zeiss Observer.Z1 conectado con un objetivo LCI PlnN 10 ×/0.8 W phaseII y una cámara AxioCam pilotada con AxioVision. Las células se filmaron durante hasta 5 días, y las imágenes se tomaron cada 30 minutos con filtros de campo claro y fase y MozaiX 3X3 (Zeiss). Los datos brutos se transformaron y se presentaron como un video.

1.6. Análisis de Imagen

Para el análisis de imágenes (cuantificación de fibrosis), el software ImageJ 1.46r estaba usando entre 10 fotos diferentes tomadas al azar por sección y 3 secciones como mínimo por grupo experimental. Las imágenes se convirtieron en una imagen binaria y luego se recogieron los valores de píxel. Para el tamaño de la fibra, las secciones se inmunotifieron con anti-Laminina de conejo (Sigma-Aldrich#L9393) diluido a 1/200, durante la noche a 4°C. Se utilizaron los anticuerpos de burro secundarios 488 (DL488 JacksonImmuno#711486152) a 1/200 45 minutos a temperatura ambiente. El perímetro de la fibra se realizó automáticamente mediante el uso del software Pixcavator®.

1.7. Luminex®(Inmunoensayo múltiple)

Las muestras de plasma congelado instantáneamente (n=6 por condición) se descongelaron y el sobrenadante se procesó para el análisis de citocina y quimocina Luminex® múltiple (Bio-Plex® Citocina de ratón ProTM Mouse estándar 23-Plex, Grupo I y 9-Plex estándar, Grupo II). La normalización se realizó por peso de muestra de músculo congelado.

1.8. RT-qPCR

Se aisló el ARN total de las células usando el kit RNeasy Micro (Qiagen). El ARN total se transcribió inversamente usando transcriptasa reversa Superscript® III (Invitrogen). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y la velocidad de incorporación del colorante se controló usando el sistema PCR en tiempo real Plus StepOne.™ (Applied Biosystems). Se usaron por lo menos tres réplicas biológicas para cada condición. Los datos fueron analizados por StepOne Plus RT PCR software v2.1 y Microsoft Excel. Los niveles de transcripción de GAPDH se usaron para la normalización de cada objetivo (=ΔCT). Los valores de PCR C_T en tiempo real se analizaron usando el método 2-(ΔΔCt) para calcular la expresión de veces (ΔΔCtmethod, Livak et al., 2001).

1.9. Medición de fuerza

La prueba de fuerza de agarre es un método no invasivo diseñado para evaluar la fuerza muscular del ratón *in vivo*. Un medidor de agarre (Bio-GT3, BIOSEB), conectado a un transductor de fuerza, mide la fuerza máxima generada. Se colocaron ratones mdx placebo y fluoxetina (6 semanas de tratamiento) con las cuatro patas en una rejilla y se tiraron suavemente hacia atrás hasta que soltaron el agarre. Se realizaron cinco ensayos y, antes del análisis estadístico, se calculó un valor medio para cada ratón utilizando los datos de la mediana del árbol. Los resultados se expresan como el resultado de las fuerzas pico del árbol (en g), normalizadas al peso corporal (en g).

1.10. Experimentos de fibras peladas

Los músculos TA se disecaron de ratones tratados con placebo y fluoxetina (6 semanas de tratamiento). Pequeños haces de dos a cinco fibras se aislaron manualmente de los músculos como se describió previamente. El despellejado químico se llevó a cabo usando Triton X-100. Las fibras peladas se montaron en el sistema de medición de desplazamiento KD 2300 (modelo 0.5 SU, Kaman Instrumentation, Colorado Springs, CO, EE.UU.) Para realizar mediciones de fuerza, las preparaciones de fibra sin piel se incubaron durante 1 h en solución relajante (pCa 9.0, bajo contenido de calcio) que contiene 1% de Triton X-100 (v/v) para solubilizar el sarcolema y las membranas del retículo sarcoplásmico y posteriormente se lavaron varias veces en solución relajante sin detergente. Las fibras se ajustaron a la longitud de holgura y luego se estiraron progresivamente hasta que la tensión desarrollada resultó máxima. La tensión isométrica se registró de forma continua utilizando un registrador de gráficos (modelo 1200, Linear, Reno, Nevada, EE.UU.) La tensión obtenida se normalizó al área transversal de la fibra.

1.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism usando pruebas apropiadas (Mann-Whitney no paramétrico a menos que se especifique) y un intervalo mínimo de confianza del 95% para la significación; los valores p indicados en las figuras son < 0.05 (*), < 0.01(**), y < 0.001 (***). Las figuras muestran valores promedio de todos los animales evaluados $\pm$ SD o $\pm$ SEM para RT-qPCR, o como se indicó.

2. Resultados

2.1. Fluoxetina

2.1.1. La fluoxetina aumenta el número de vasos y el número de células satélite en el músculo esquelético

Para investigar el efecto de fluoxetina en el número de vasos, se realizó la administración *intra peritoneal* (I.P) o *per os* (P.O) de 18 mg/kg de fluoxetina durante 3 o 6 semanas al ratón *Flk1^{GFP/+}* o *TgPax7nGFP* (figura 2a), permitiendo la visualización directa de las células endoteliales y células satélite (SC) respectivamente. En todo el estudio, se hizo hincapié en la *tibialis anterior* (TA). En el músculo esquelético, las SC son centrales para la reparación muscular. Mediante el conteo histológico, se observó que el número de SC fue mayor cuando se trató con fluoxetina (9.7 ± 3.1 SC por mm^2 en el placebo vs. 16.3 ± 5.4 SC en el tratado, $p=0.04$) (figuras 2b a 2d y 2p a 2q). Estos resultados se confirmaron al digerir la TA y al contar el número de SC directamente por citometría usando el ratón *Tg:Pax7nGFP* (Sambasivan et al., 2009) ($p=0.02$) (figuras 2p, 2q). Las SC se localizan cerca de los capilares y es conocido que la angiogénesis es crucial para la supervivencia de las SC de la reparación muscular con interacciones celulares entre las células del vaso y las SC. Por lo tanto, se cuantificó el número de vasos. En el ratón *Flk1^{GFP/+}* control (placebo), el número de vasos fue de 870 ± 213.1 vasos por mm^2 y aumentó después de 3 semanas de tratamiento I.P (1103 ± 110.2 vasos por mm^2), e incluso más después de 6 semanas (1384 ± 175.3 vasos por mm^2 , $p=0.008$) (Figura 2e). Los neovasos mostraron una apariencia histológica normal asociada con una lámina basal y un tubo permeable que algunas veces contiene glóbulos rojos. La administración diaria de fluoxetina I.P podría causar inflamación peritoneal no deseada que podría interferir con la angiogénesis, ya que la inflamación y la neovascularización se entrelazan en algunos modelos (Sadat et al., 2014). Por lo tanto, la fluoxetina se administró vía oral durante 6 semanas: se observó un aumento similar en el número de vasos (1256 ± 62.2 vasos por mm^2 , $p=0.008$, figura 2e, 2g). Esos resultados se confirmaron en otro modelo, administrando fluoxetina a ratones C57Bl/6 vía oral durante 6 semanas y realizando inmunoetiquetado de células CD31+ en TA crio-seccionada. 841 ± 137 CD31+ células por mm^2 se contaron en los ratones tratados con placebo vs. 2260 ± 361 CD31+ células por mm^2 en los ratones tratados con fluoxetina, $p=0.008$ (Figuras 2t a 2v), confirmando la observación previa. Después del suministro de fluoxetina 6 semanas *in vivo* los niveles de IL-1a, IL-1b, IL-2, y eotaxina disminuyeron mientras IL-4 y IL-13 aumentaron ($p=0.02$). Las otras citocinas analizadas no mostraron ningún cambio importante (tabla 2).

Tabla 2. La fluoxetina disminuye los niveles basales de las citocinas. El siguiente cuadro representa los niveles plasmáticos de citocinas en picogramos por μl de plasma medidos por el ensayo Luminex® en los ratones tratados con placebo y fluoxetina. El valor p se calcula usando la prueba de Mann-Whitney. n=7 animales usados por condición. *:p:0.05; ns: estadísticamente no importante.

Citocina	Cantidad en placebo (pg/ μm)	Cantidad en fluoxetina tratada (pg/ μm)	Estadísticamente importante	valor p
IL-1a	234.2 $\pm$ 33	150.8 $\pm$ 22.8	*	0.02
IL-1b	1398 $\pm$ 380	756.2 $\pm$ 205	*	0.02
IL-2	48.30 $\pm$ 8.1	82.53 $\pm$ 11.7	*	0.02
IL-4	52.71 $\pm$ 6.7	93.76 $\pm$ 9.9	*	0.02
IL-5	21.13 $\pm$ 16.7	7.2 $\pm$ 3.2	ns	0.06
IL-6	20.54 $\pm$ 8.4	10.68 $\pm$ 1.8	ns	0.11

Citocina	Cantidad en placebo (pg/ μ m))	Cantidad en fluoxetina tratada (pg/ μ m)	Estadísticamente importante	valor p
IL-9	89.02 $\pm$ 15.5	72.54 $\pm$ 14.8	ns	0.11
IL-10	16.10 $\pm$ 7.8	36.60 $\pm$ 27.9	ns	0.34
IL-12(p40)	43.7 $\pm$ 43	59.7 $\pm$ 36	ns	0.48
IL-12(p70)	130.1 $\pm$ 53.7	118.2 $\pm$ 40	ns	0.48
IL-13	626.6 $\pm$ 69.8	875.1 $\pm$ 147	*	0.03
IL-17	48.3 $\pm$ 22.2	29.8 $\pm$ 15.3	ns	0.34
Eotaxina	44.10 $\pm$ 19	18.7 $\pm$ 4.6	*	0.02
G-CSF	3884 $\pm$ 1657	3066 $\pm$ 288	ns	0.8
GM-CSF	29189 $\pm$ 39901	8800 $\pm$ 1438	ns	0.34
IFN-g	32.78 $\pm$ 6.1	28.5 $\pm$ 8.9	ns	0.2
KC	8290 $\pm$ 10202	717 $\pm$ 502	ns	0.11
MCP-1	73.5 $\pm$ 45.9	26.6 $\pm$ 20	ns	0.06
MIP-1a	64.6 $\pm$ 39	34.6 $\pm$ 17.3	ns	0.48
MIP-1b	570.4 $\pm$ 154	442.1 $\pm$ 49	ns	0.11
RANTES	120 $\pm$ 111	53.6 $\pm$ 27.1	ns	0.34
TNF-a	8318 $\pm$ 865	7846 $\pm$ 2171	ns	0.34
FGF-básico	1057 $\pm$ 141.3	1276 $\pm$ 618	ns	0.88
MIG	100 $\pm$ 8.1	83.4 $\pm$ 11	*	0.05
PDGF-bb	653 $\pm$ 256	401 $\pm$ 74	ns	0.34
VEGF	313.44 $\pm$ 91	2554 $\pm$ 1041	*	0.02

Para confirmar adicionalmente los resultados anteriores, se utilizó un ensayo de angiogénesis de Matrigel *ex vivo*. Para hacerlo, se introdujo un Matrigel frío por vía subcutánea, que solidifica y permite la penetración de las células huésped y la formación de nuevos vasos sanguíneos en P.O. tratados con C57Bl/6 durante 6 semanas. El número de células que expresan CD31 fue mayor en los tapones tratados con fluoxetina (72.9 $\pm$ 22.6 CD31+ células por mm²) en comparación con el placebo (25.20 $\pm$ 13.8 CD31+ células por mm², p=0.002) (figuras 2h a 2i); confirmando la observación previa.

Estos datos fueron confirmados por el ensayo HUVEC *in vitro* (células endoteliales humanas). Los ratones C57Bl/6 se trataron con P.O. durante 6 semanas y el plasma se extrajo de la sangre. Después, las células HUVEC se sembraron en placas en microesferas de citodex y se cultivaron en cualquiera de los plasmas. El crecimiento de HUVEC incubado con plasma procedente de animales tratados fue más rápido 4 días después de la siembra en placas (p $\leq$ 0.0001) (figuras 2m a 2o).

La división celular se cuantificó después de la administración de BrdU durante la totalidad del tratamiento *per os* con fluoxetina, y los resultados mostraron que el 90% de la población de SC se estaba dividiendo (figura 2r). Un pulso corto de BrdU 16 h antes de la muerte mostró que la mayoría de las SC se dividieron entre la tercera y la quinta semana (figura 2s).

2.1.2. La fluoxetina mejora el potencial de regeneración muscular

Para investigar si la fluoxetina tuvo un impacto funcional en los músculos, se realizó una lesión después del tratamiento con fluoxetina (figura 3a) y se investigó la capacidad muscular para regenerarse en ratones *Tg:Pax7nGFP* (Sambasivan et al., 2009). La comparación 4 días y 14 días después de la lesión de los músculos mostró en ambos casos una mejor regeneración (figura 3b a 3j). De hecho, se observaron diferencias importantes en las características de regeneración muscular entre los ratones tratados con placebo y fluoxetina. A los 4 días después de la lesión, los animales tratados mostraron un mayor número de SC (459 $\pm$ 283 en los tratados vs. 177.2 $\pm$ 49 en el placebo, p=0.04) (figura 3b a 3d) y más células ya se estaban diferenciando (p=0.0006) (figura 3e a 3g). Después de 14 días de la lesión en el grupo placebo, la regeneración de las fibras centro-nucleadas mostró un tamaño variable (anisocitosis, 81 $\pm$ 28.4 μ m²), infiltración endomisial multifocal por células inflamatorias mononucleares (células 9.14 $\pm$ 3.9 Gr1+ y células 12.6 $\pm$ 3.9 F4/80+ por sección), la presencia de múltiples focos basófilos grandes de deposición de calcio (19 $\pm$ 4 per mm²), y fibrosis leve del endomisio (6.4 $\pm$ 2% del área muscular total) (Figuras 3h a 3k). Por el contrario, en ratones tratados con fluoxetina, las fibras regeneradoras fueron más grandes y mostraron un tamaño menos variable (129 $\pm$ 12.6 μ m², p=0.005), menos células inflamatorias (células 4.1 $\pm$ 2.6 Gr1+; p=0.018 y células 4.7 $\pm$ 2.7 F4/80; p=0.0017), menos depósitos de calcio (3.2 $\pm$ 3 por mm² p=0.0006), y menos fibrosis endomisial (2.2 $\pm$ 0.7 del área muscular total p=0.007) (figuras 3h a 3k, y figuras 4a a 4d). No obstante el número de fibras permaneció igual (p=0.4, figura 4e). Veintiocho días después de la lesión, el músculo se regeneró por completo; no se observaron diferencias entre los dos grupos, excepto por un mayor número de vasos (p=0.036) y SC (p=0.076) en animales tratados con fluoxetina (figuras 4f, 4g). Estos datos se confirmaron *in vitro* al sembrar en placas SC de ratón *Tg:Pax7nGFP* en 20% de plasma que se origina de ratones tratados con C57Bl/6 o placebo. Por videomicroscopía *in vivo*, se observó que la primera división de células satélite ocurrió más rápido (26.45h $\pm$ 1.18 después del sembrado en placas en plasma tratada con fluoxetina vs. 29.08h $\pm$ 0.37 en plasma control p=0.02, con mayor velocidad de división (12.5 $\pm$ 2.1h en el placebo vs. 8.7 $\pm$ 0.7h en fluoxetina;

p=0.047) (figuras 4i, 4j). También se observó un mayor número de células positivas de miogenina 4 días después de la siembra en placas (12±5.5% del total de células sembradas en placas en el placebo vs. 34.75±6.3% en las tratadas con fluoxetina; p=0.02, (figura 4k) así como miofibras que se forman más rápidamente; que confirma las observaciones realizadas *in vivo* de una diferenciación y reparación más rápida de las fibras musculares. Curiosamente, junto con esta regeneración mejorada, se observó una disminución en la inflamación del músculo después de la lesión como anteriormente (tabla 3). Por ejemplo, la citocina proinflamatoria IL-6 disminuyó de 4258±665pg/μl en la lesionada en comparación con 2459±920pg/μl en la lesionada con tratamiento con fluoxetina (p=0.02).

Para poner a prueba aún más el músculo, se realizaron varias rondas de lesiones después del tratamiento con fluoxetina, con el fin de exacerbar el fenotipo y asegurar que el conjunto de células satélite (SC) no se haya agotado. El número de SC se mantuvo constante por TA incluso después de 3 rondas de lesiones (figura 4h). A nivel histológico, el músculo se regeneró bien en los casos de heridos y los heridos nuevamente (figura 3l), mostrando que las SC todavía era células madre funcionales después del tratamiento con fluoxetina.

Tabla 3: La fluoxetina disminuye los niveles de citocinas después de la lesión. La tabla representa los niveles plasmáticos de citocinas en picogramos por μl de plasma medidos por el ensayo Luminex® en los ratones tratados con placebo y fluoxetina y los dañados con notexina. El valor p se calcula usando la prueba de Mann-Whitney. n=4 animales usados por condición. PI: después de la lesión; *: p≤0.05 ns: estadísticamente no importante.

Citocina	Cantidad en PI de cuatro días de placebo (pg/μm)	Cantidad en tratados PI de cuatro días de fluoxetina (pg/μm)	Estadísticamente importante	Valor P
IL-1a	307.6±180	107.6±33.2	*	0.05
IL-1b	3698±2202	2039±435	ns	0.34
IL-2	206.5±187	47.33±15	*	0.03
IL-4	156.1±52	303.9±5	*	0.02
IL-5	566±82	265±41	*	0.02
IL-6	4258±665	2459±920	*	0.02
IL-9	426.3±89	241±56	*	0.02
IL-10	342±36	176±39	*	0.03
IL-12(p40)	336±179	171±84	ns	0.2
IL-12(p70)	987.2±693	359±240	ns	0.11
IL-13	2028±1242	691±268	*	0.02
IL-17	1800±1075	1558±525	ns	0.8
Eotaxina	10155±6873	3692±934	ns	0.11
G-CSF	7014±7628	2689±364	ns	0.34
GM-CSF	30928±49630	3962±2289	ns	0.2
IFN-g	149.2±35.72	68.84±44.6	*	0.02
KC	8290±10202	717±502	*	0.05
MCP-1	21380±21143	6560±7168	*	0.05
MIP-1a	2492±784	4214±4861	ns	0.68
MIP-1b	1770±1034	1337±540	ns	0.68
RANTES	4658±1870	2804±826	*	0.05
TNF-a	7846±2171	10386±1266	*	0.02
FGF-básico	1115±117	1618±232	*	0.02
MIG	45730±41234	28105±38006	ns	0.2
PDGF-bb	2965±317.6	1777±148.5	*	0.02
VEGF	653.4±203	3334±59	*	0.02

2.1.3. Se obtienen los efectos de fluoxetina en los vasos y células satélite a través de la estimulación del receptor de serotonina 5-HT1 B

Para entender cómo se activan los vasos, las células endoteliales (CD34+, CD31+, Sca-1+, CD45-) del músculo digerido fueron clasificados por células FACS después de 6 semanas de tratamiento de fluoxetina P.O (figura 5a). RT-qPCR entonces se realizó en los subtipos de receptores de serotonina para caracterizar adicionalmente mediante lo cual se podrían activar las células endoteliales (figura 5b). Se observó un aumento de 90±35 en el subtipo de 5-HT1 BR en los ratones tratados en comparación con los placebo (p=0.0035), y un aumento de 30±13 (p=0.015) en el subtipo 5-HT2 BR en los animales tratados con fluoxetina (figura 5b). Los otros subtipos analizados (5-HT1 AR, 5-HT1 DR, 5-HT1 FR, 5-HT2 AR, 5-HT2 CR) no mostraron aumento estadísticamente importante (figura 5b). Estos datos se confirmaron usando marcadores endoteliales de músculo digerido después de 6 semanas de tratamiento con fluoxetina P.O (datos no representados). La misma observación se realizó en SC clasificadas por células FACS de ratones *Tg:Pax7nGFP* (figura 5b).

Para investigar el papel del 5-HT1 BR, se administró el inhibidor de clorhidrato GR127935 (un antagonista 5-HT1 BR) en una bomba osmótica junto con tratamiento con fluoxetina P.O. durante 6 semanas y se realizó el conteo de vasos en ratones *Flk1^{GFP/+}* y conteo de SC en ratones *Tg:Pax7nGFP*. El número de vasos fue menor en fluoxetina y los ratones *Flk1^{GFP/+}* tratados con inhibidor (1028±173 vasos por mm²) en comparación con ratones *Flk1^{GFP/+}* tratados con fluoxetina y PBS (1949±576 vasos por mm², p=0.0159 (figura 5i a 5k). El número de SC también fue menor en ratones *Tg:Pax7nGFP* tratados con fluoxetina e inhibidor (4674±1414 SC por TA) en comparación con ratones *Tg:Pax7nGFP* tratados con fluoxetina y PBS (7283±2325 SC per TA p=0.04) (figuras 5f a 5h). Aunque se detectó un aumento de 30 veces del receptor de 5-HT2 B después del tratamiento con fluoxetina, no se observó inhibición de los efectos de la fluoxetina al antagonizarlo con MDL100907 (un antagonista de 5-HT2 BR) (figuras 6f, 6g).

Después de la lesión, la inhibición de 5-HT1 BR por GR127935 suprimió los efectos beneficiosos del tratamiento con fluoxetina con un número menor de SC (figura 6a) y células de diferenciación (figura 5c), un tamaño de fibra menor (figura 5D) y depósitos de calcio mayores (figura 6B) 14 días después de la lesión, un mayor porcentaje de fibrosis (figura 5e) y una mayor infiltración de células inmunitarias Gr1 y F4/80 (figuras 6c, 6d). Después de la lesión, la inhibición de 5-HT2 BR por MDL100907 no suprimió los efectos beneficiosos de la fluoxetina (figuras 6e).

Esos resultados se confirmaron *in vitro* (figura 7a). El número de células positivas Pax7 disminuyó más rápido 4 días después de sembrar en placas en plasma de animales tratados con fluoxetina (24%±6 en los tratados con fluoxetina vs. 39.25%±8 en placebo p=0.02) (figura 7b) y estuvo cerca del placebo cuando se incubó con GR127935 (35.25%±6.2 p=0.32) (Figura 7b). Tras 14 días de sembrar en placas, se detectó un número mayor de células de reserva (células positivas Pax7 que son inactivas *in vitro*) en el plasma de animales tratados con fluoxetina (9.4%±0.7) que en los animales tratados con placebo (4.4%±0.7, p=0.01), y cuando GR127935 se agregó *in vitro* el número de células de reserva disminuyó (4.5%±0.5, p=0.9) (figuras 7b, 7c). La expresión MyoD (un marcador de activación) difirió en cualquier momento investigado en las 3 condiciones probadas (figura 7d), sin embargo, miogenina (MyoG), un marcador de diferenciación mostró un aumento de 3 veces en la expresión cuando se sembró en placas con plasma procedente de ratones tratados con fluoxetina. (p=0.0017) (figura 7e). Esta diferencia se perdió cuando las SC se sembraron en placas con GR127935 (p=0.4) (Figura 7E). La salida más rápida de la inactividad y las mayores tasas de división también se perdieron al agregar GR127935 *in vitro* (figuras 7f, 7g). Los efectos del plasma de los animales tratados con fluoxetina fueron persistentes al agregar MDL100907 (figuras 7b a 7g). De manera importante, *in vitro*, la adición directa de un agonista de 5-HT1B en los medios de cultivo desencadenó el mismo efecto que la adición de plasma de ratones tratados con fluoxetina (figuras 7h y 7i); se observa una diferenciación más rápida en los puntos temporales tempranos después de sembrar en placas y una velocidad mayor de la autorrenovación en los puntos temporales tardíos después de sembrar en placas.

Se obtuvieron los mismos resultados cuando se sembraron mioblastos humanos primarios en plasma de ratones tratados con fluoxetina, con una diferenciación más rápida 4 días después del sembrado en placas (p=0.05) (figura 7j) y una mayor autorrenovación de las células 14 días después del sembrado en placas (p=0.02) (figura 7k). Esos efectos se perdieron al antagonizar 5-HT1 BR pero no 5-HT2 BR (figuras 7j, 7k).

2.1.4. La fluoxetina mejora el fenotipo Mdx

La fluoxetina se suministró P.O. durante 6 semanas a ratones Mdx (Bulfield G et al., 1983), un modelo de ratón con distrofia muscular de Duchenne. Los ratones Mdx tratados con fluoxetina exhibieron menos focos de fibra necrótica (2893±803 mm² en promedio) en comparación con el control Mdx no tratado (5041±1629 mm² en promedio, p=0.04) (figura 8a). El tamaño de la fibra también fue en general mayor en animales tratados con Mdx (4.241±0.9 píxeles en tratados vs. 3.192±0.3 in placebo p=0.051) (figura 8b). En consecuencia, el número de focos de regeneración disminuyó en los ratones Mdx tratados con fluoxetina (figuras 8c a 8d). El número de vasos aumentó en los ratones tratados (1459±327 vasos por mm²) en comparación con el placebo (942.4±113 vasos por sección p=0.008) (Figura 8e). Curiosamente, el número de células satélite de ciclo también disminuyó, lo que correlaciona con la disminución del número de focos regenerativos previamente observados (figura 8f). Los ratones tratados también mostraron un nivel más bajo de citocinas (34.52±21pg/ml de IL6, tabla 4) en comparación con placebo (580±158pg/ml de IL6, p=0.004) (figura 8g, tabla 4). La misma disminución se observó para otras citocinas proinflamatorias (datos no representados). Es de destacar que el nivel de IL10 (una citocina antiinflamatoria) no cambió en los animales tratados (99.6±56pg/ml de IL10) en comparación con placebo (64.1±50, p=0.4) (figura 8h, tabla 4). Esta observación está en línea con la disminución de la infiltración de células inflamatorias observada en el músculo (9.6±3.7 células Gr1+ observadas por sección en el placebo vs. 4±2.4 Gr1+ células en los ratones tratados p=0.04) (figura 8i). Particularmente, cuando los ratones Mdx fueron tratados con fluoxetina y un inhibidor de 5-HT1B, los efectos beneficiosos se perdieron (figuras 9a a 9h).

A nivel funcional, la fuerza muscular total de los ratones mdx tratados con fluoxetina se incrementó en un 56% (figura 9I) y las fibras aisladas de la fuerza del extensor largo de los dedos también se incrementaron en un 45% (figuras 9J a 9K). Esto se confirmó en el músculo sóleo (datos no representados).

Tabla 4: La fluoxetina disminuye los niveles de citocinas en un modelo de ratón distrofina Mdx. La tabla representa los niveles plasmáticos de citocinas en picogramos por µl de plasma medidos por el ensayo Luminex® en los

ratones Mdx tratados con placebo y fluoxetina. El valor p se calcula usando la prueba de Mann-Whitney. n=7 animales usados por condición. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ns: estadísticamente no importante

Citocina	Cantidad en Mdx placebo (pg/ μ m)	Cantidad en Mdx fluoxetina tratada (pg/ μ m)	Estadísticamente importante	Valor P
IL-1a	119.8 $\pm$ 54	28.8 $\pm$ 10.6	***	0.0006
IL-1b	1174 $\pm$ 252	436 $\pm$ 86	***	0.0006
IL-2	50.11 $\pm$ 27	22.02 $\pm$ 15.13	*	0.04
IL-3	63.8 $\pm$ 14	21.4 $\pm$ 23.7	*	0.01
IL-4	56.46 $\pm$ 94	29.5 $\pm$ 27.3	ns	0.9
IL-5	101.6 $\pm$ 101.8	10.59 $\pm$ 5.5	***	0.0006
IL-6	324 $\pm$ 343	12.9 $\pm$ 10.24	**	0.0012
IL-10	407.9 $\pm$ 167	176.5 $\pm$ 96	ns	0.06
IL-12(p40)	2015 $\pm$ 874	922 $\pm$ 414	**	0.007
IL-12(p70)	2557 $\pm$ 839	182 $\pm$ 90	**	0.002
IL-13	1942 $\pm$ 459	1065 $\pm$ 380	**	0.007
IL-17	91.6 $\pm$ 39	21.2 $\pm$ 21	**	0.001
Eotaxina	2398 $\pm$ 521	850.4 $\pm$ 565	**	0.002
G-CSF	1369 $\pm$ 880	65.20 $\pm$ 43.6	***	0.0006
GM-CSF	1272 $\pm$ 284	447 $\pm$ 199	**	0.002
IFN-g	428.3 $\pm$ 193	24.7 $\pm$ 16	***	0.0006
KC	2606 $\pm$ 898	30.68 $\pm$ 10.2	***	0.0006
MCP-1	2704 $\pm$ 522	339 $\pm$ 172	***	0.0006
MIP-1a	415 $\pm$ 175	75.5 $\pm$ 12.6	***	0.0006
MIP-1b	1978 $\pm$ 1219	91.48 $\pm$ 84	***	0.0006
RANTES	223.3 $\pm$ 151	19.15 $\pm$ 6.3	***	0.0006
TNF-a	9927 $\pm$ 1702	2355 $\pm$ 782	***	0.0006
FGF-básico	139 $\pm$ 37	118.2 $\pm$ 85	ns	0.25
MIG	4320 $\pm$ 3003	1649 $\pm$ 624	*	0.01
PDGF	2005 $\pm$ 721	2984 $\pm$ 1573	ns	0.25
VEGF	88.2 $\pm$ 18.9	32.1 $\pm$ 22.3	**	0.0041

5 2.2. Vortioxetina

2.2.1. La vortioxetina aumenta el número de vasos en el tibial anterior

Para investigar el efecto de vortioxetina en el número de vasos, se realizó la administración *intra peritoneal* (I.P) de 20mg/kg de vortioxetina por 12 días, 3 o 6 semanas a ratones C57Bl/6 (Figura 10A). El número de células CD31+ se contó mediante inmunotinción. El número de vasos en el placebo es (863.5 $\pm$ 115.6 vasos por mm²) y aumentó después de 12 días de tratamiento I.P (2274 $\pm$ 926 vasos por mm², p=0.03), e incluso más después de 3 semanas (2847 $\pm$ 705 vasos por mm², p=0.02) (figura 10b). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 12 días y las 3 semanas de tratamiento (p = 0.49). Los neovasos muestran una apariencia histológica normal asociada con una lámina basal y un tubo permeable que algunas veces contiene glóbulos rojos. La administración diaria de vortioxetina IP podría causar inflamación peritoneal no deseada que podría interferir con la angiogénesis, ya que la inflamación y la neovascularización se entrelazan en algunos modelos. Por lo tanto, la vortioxetina se administró *vía oral* (P.O) durante 12 días: se observó un aumento similar en el número de vasos (2451 $\pm$ 595 vasos por mm² p=0.028, figura 10c). Para confirmar adicionalmente estos resultados, la vortioxetina se administrará a ratones Flk1^{GFP/+} P.O y I.P durante 12 días y se utilizará un ensayo de angiogénesis *ex vivo* Matrigel y se usará el plasma de ratones tratados con vortioxetina en HUVEC (células endoteliales).

2.2.2. La vortioxetina aumenta el número de células satélite

Para contar el número de células satélite, el tibialis anterior (TA) de ratones *Tg:Pax7nGFP* se digirió y analizó por FACS en ratones tratados con placebo y vortioxetina (12 días, 20mg/Kg). Las células fueron contadas por citometría (figura 10d) por TA y se observó un claro aumento en el número de SC en el tratamiento (8660 células satélite $\pm$ 699) vs. ratones no tratados (4444 células satélite $\pm$ 802 p=0.008) (figura 10a). Estos datos se confirmaron por recuento histológico en las secciones, en el que se encontró un aumento de dos veces en las secciones TA. Después de 3 semanas de tratamiento con vortioxetina, el número de células satélite fue incluso mayor (9351 células satélite $\pm$ 706, p=0.0079) pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 12 días y las 3 semanas de tratamiento (p=0.15). La vortioxetina también se administró P.O. a 20 mg/kg: se observó un aumento similar en el número de SC, lo que confirma los resultados de la IP (figuras 10d, 10e).

2.2.3. La vortioxetina aumenta el número de vasos y células satélite por medio de la estimulación del receptor de 5-HT1 B

Para investigar el papel del inhibidor de clorhidrato de GR127935 del 5-HT1 BR, un antagonista específico del 5-HT1 BR se suministró en la bomba osmótica junto con el tratamiento con vortioxetina I.P durante 12 días. El número de vasos fue menor en vortioxetina y los ratones *Flk1^{GFP/+}* tratados con inhibidor (928 ± 207 vasos por mm^2) en comparación con vortioxetina y ratones *Flk1^{GFP/+}* tratados con PBS (2274 ± 926 vasos por mm^2 , $p=0.028$ (figura 11a). El número de SC también fue menor en vortioxetina y los ratones *Tg:Pax7nGFP* tratados con el inhibidor (5540 ± 411 SC por TA) en comparación con vortioxetina sola (figura 11b). No se observó inhibición de los efectos de vortioxetina cuando se antagoniza con MDL100907, un inhibidor del receptor de 5-HT2 B (figuras 11a, 11b), ni para los vasos ni el número de SC.

Después de la lesión, la inhibición de 5-HT1 BR por GR127935 reprimió los efectos beneficiosos del tratamiento de 12 días con vortioxetina: de hecho, se podría observar un menor número de SC y células de diferenciación, un menor tamaño de fibra y mayores depósitos de calcio 14 días después lesión, un mayor porcentaje de fibrosis, así como una mayor infiltración de células Gr1 y F4/80 inmunitarias.

Esos resultados se confirmaron *in vitro* como se muestra en las figuras 11c a 11e. Las células satélite se aislaron de los ratones *Tg:Pax7nGFP* y las células se sembraron en placas a 2.000 células por cm^2 . Después de la noche, se agregó vortioxetina a $10 \mu\text{M}$. El número de células positivas Pax7 disminuyó más rápido 4 días después de sembrar en placas ($23\% \pm 2$ en los tratados con vortioxetina vs. $38.25\% \pm 6$ en PBS $p=0.02$) (figura 11c) y estuvo cerca del control (PBS) cuando se incubó con el inhibidor GR127935 ($25.5\% \pm 4.2$ $p=0.32$) (figura 11c). Tras 14 días de sembrar en placas, se detectó un número mayor de células de reserva (Pax7 células positivas que son inactivas *in vitro*) en las células tratadas con vortioxetina ($9\% \pm 0.7$) que en el PBS ($3.5\% \pm 0.9$, $p=0.01$), y cuando el inhibidor GR127935 se agregó *in vitro* el número de células de reserva disminuyó ($3.5\% \pm 0.9$, $p=0.9$) (figura 11c). La expresión de MyoD (un marcador de activación) no difirió en ningún momento investigado en las 3 condiciones analizadas (figura 11d). Sin embargo, miogenina (MyoG), un marcador de diferenciación mostró un aumento de 2 veces en expresión, 4 días después de sembrar en placas con vortioxetina ($p=0.0017$) (figura 11e). Esta diferencia en expresión se perdió cuando se sembraron en placas las SC con el inhibidor GR127935 5-HT1 BR ($p=0.4$) (figuras 11c a 11e). Los efectos positivos de vortioxetina se perdieron cuando se agregó GR127935 *in vitro* junto con vortioxetina (figuras 11c a 11e). No obstante, estos efectos fueron persistentes cuando se agregó el antagonista 5-HT2 BR (figuras 11c a 11e). Esto significa que los efectos positivos observados cuando se siembra en placas la vortioxetina *in vitro* con las células satélite son mediados por el receptor de 5HT1B y no 5HT2B.

Estos experimentos *in vitro* demuestran claramente que, de manera similar a las observaciones realizadas *in vivo*, la vortioxetina directamente actúa en las células satélite y estimulan su diferenciación a una velocidad de regeneración más rápida que la fluoxetine. De manera más importante, se observó un aumento en el número de células satélite de autorrenovación después de 14 días *in vitro*, lo cual resalta la capacidad de la vortioxetina de aumentar el conjunto de células madre musculares.

2.3. Derivados de vortioxetina

2.3.1. La histidina-vortioxetina y pirrolidinio-vortioxetina aumentan el número de vasos y células satélite

Para evaluar si 2 derivados de vortioxetina, a saber, histidina-vortioxetina y pirrolidinio-vortioxetina, podrían tener un efecto similar o mejorado en comparación con la vortioxetina no modificada, se utilizó el enfoque *in vitro* como se describe en la sección 2.2.3 anterior y se investigó la cascada de diferenciación de las células satélite mediante la evaluación del patrón de expresión de Pax7 (un marcador de la estaminalidad y la quiescencia) y miogenina (MyoG, un marcador de diferenciación) como se describió anteriormente en la sección 2.2.3. Para hacerlo, las células satélite de *Tg:Pax7-nGFP* se aislaron mediante FACS y se sembraron en placas a 2.000 células por cm^2 (sembradas en la noche). Al día siguiente, la vortioxetina, sus derivados o el PBS de control se añadieron a $10 \mu\text{M}$ y las células se fijaron en los puntos temporales indicados.

La velocidad de diferenciación de las células fue más rápida con vortioxetina, pirrolidinio-vortioxetina e histidina-vortioxetina que con PBS (control). Después de 4 días en PBS, $38.2 \pm 6.7\%$ de las células todavía estaban en Pax7 +, frente a $23.7 \pm 2.78\%$ cuando las células fueron sembradas en placas con vortioxetina ($p \leq 0.001$), $25.25 \pm 4\%$ con pirrolidinio-vortioxetina ($p \leq 0.001$) y $22.5 \pm 3.3\%$ con histidina-vortioxetina ($p \leq 0.0001$) (figura 12a). Los datos de tinción de Myogenin confirmaron esta observación con $13.25 \pm 2\%$ de las células MyoG + en el control PBS contra $34.5 \pm 2.5\%$ con vortioxetina ($p \leq 0.0001$), $19.75 \pm 0.47\%$ con pirrolidinio-vortioxetina ($p \leq 0.05$) y $30 \pm 1.7\%$ con histidina-vortioxetina ($p \leq 0.0001$) (figura 12b).

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que, *in vitro*, la pirrolidinio-vortioxetina y la histidina-vortioxetina desencadenan una diferenciación rápida de las células satélite similares a la vortioxetina.

Es importante destacar que, al evaluar la autorrenovación de las células satélite, se observó que tanto pirrolidinio-vortioxetina como histidina-vortioxetina mostraron más células Pax7 + 14 días después de la siembra en placas (con medio cambiado cada 4 días). De hecho, al final del proceso de diferenciación *in vitro*, $2 \pm 0.4\%$ de las células fueron Pax7+ con PBS en comparación con $10.5 \pm 0.65\%$ con vortioxetina, $12.5 \pm 1.9\%$ con pirrolidinio-vortioxetina

($p \leq 0.01$), y $12.25 \pm 1.3\%$ con histidina-vortioxetina ($p \leq 0.05$). Esto indica que el número de células de autorrenovación *in vitro* es mayor con pirrolidinio-vortioxetina e histidina-vortioxetina cuando se compara con la vortioxetina sola (figuras 12A, 12B; 20% de aumento). Se inyectó IP 20mg/Kg de histidina-vortioxetina o pirrolidinio-vortioxetina durante 12 días en ratones *TgPax7nGFP*: se observó un duplicado en el número de SC en el TA. Estos resultados indican que aquellos 2 derivados presentan el mismo efecto en comparación con la vortioxetina (figuras 12c, 12d).

3. Discusión

Los fármacos antidepresivos de la clase del inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI) (por ejemplo, fluoxetina) se usan comúnmente para tratar un amplio espectro de trastornos del estado de ánimo (Marsella et al., 1975). Curiosamente, nunca se ha evaluado el uso de fluoxetina para mejorar la regeneración de otros órganos además del cerebro.

Los presentes resultados muestran que la administración no sólo de fluoxetina, sino también de vortioxetina (un conocido antidepresivo atípico), aumentó el número de vasos y, lo que es más importante, de células satélite en el músculo esquelético. Estos resultados se confirmaron utilizando diferentes enfoques (genéticos e inmunotinción), vías de administración (intraperitoneal y por vía oral) y diferentes concentraciones. Estos datos se confirmaron adicionalmente *ex vivo* con más vasos que invaden los tapones de Matrigel en ratones tratados con fluoxetina. *In vitro*, las células endoteliales humanas HUVEC mostraron más divisiones cuando se colocaron en placas en plasma de ratones tratados con fluoxetina cuando se comparan con plasma de ratones tratados con placebo. Las células satélite humanas primarias también mostraron diferenciación en puntos temporales tempranos y mayor potencial de autorrenovación en puntos temporales tardíos posteriores a la siembra en placas.

Fundamentalmente, los animales tratados con fluoxetina o vortioxetina mostraron una regeneración más rápida cuando se lesionaron, y esto fue sostenible a través de múltiples rondas de lesiones. La regeneración más rápida se evaluó tanto a nivel genético (expresión de miogenina) como a nivel histológico. Además, la regeneración fue más rápida con vortioxetina en comparación con fluoxetina (2 semanas en lugar de 6 semanas). Al buscar el mecanismo de acción que podría estar involucrado en esta regeneración mejorada, la velocidad de activación no pareció estar involucrada, ya que MyoD se detectó en los mismos tiempos tanto *in vivo* como *in vitro* en los ratones tratados y control. En cambio, el número inicial de células satélite casi se duplicó *in vivo*. Las células *in vitro*, mostraron más divisiones celulares y una diferenciación más rápida cuando se sembraron en placas en plasma de ratones tratados con fluoxetina.

Al evaluar la autorrenovación de las células satélite, se observó además que tanto la pirrolidinio-vortioxetina como la histidina-vortioxetina mostraron un mejor efecto *in vitro* que la vortioxetina sola 14 días después de la siembra en placas. En los puntos temporales tempranos después de la siembra en placas (4 días), se observó que tanto la pirrolidinio-vortioxetina como la histidina-vortioxetina mostraron una diferenciación más rápida.

También se muestra que la administración de fluoxetina o vortioxetina estaba desencadenando una salida de la quiescencia de las células satélite. De hecho, se detectaron más células después de 6 semanas de tratamiento y dado que éstas eran BrdU +, significaba que esas células adicionales provienen de la división de las células existentes (autorrenovación). Esto podría encontrarse en la raíz de la regeneración más rápida del músculo después de una lesión. De hecho, es posible que la mayor cantidad de células satélite explique la diferenciación más rápida, sin embargo, su activación más rápida y la tasa de división en caso de lesión *in vitro* es más probable que explique la diferenciación más rápida. Esto podría significar que las células satélite, aunque en reposo, salen de su estado latente y se activan más rápidamente en caso de lesión o cuando necesiten activación.

Los datos *in vivo* e *in vitro* mostrados en la presente memoria por lo tanto están mostrando un modo de acción de 2 etapas que podría presentar diferentes mecanismos dependiendo del estado celular, fisiológico o patológico. Cuando están inactivas, las células satélite pueden ser activadas por fluoxetina o vortioxetina o cualquier estimulación 5-HT1B que active su autorrenovación de una manera controlada y limitada. Después de la activación celular, en un punto de la cascada de diferenciación, la activación de 5-HT1BR podría desencadenar una diferenciación más rápida (ya sea porque la densidad celular es mayor o porque, como se demostró, la activación directa del receptor de 5-HT1B desencadena la diferenciación (hipótesis no exclusiva)). Por lo tanto, la estimulación con 5-HT1BR desencadena la salida de latencia de las células satélite y aumenta la división de la velocidad celular, la autorrenovación en condiciones fisiológicas normales, pero también la diferenciación cuando sea necesario.

La administración de fluoxetina también aumentó los niveles de receptores de serotonina 5-HT1 BR 90 veces en las células endoteliales y SC, y la administración farmacéutica de inhibidor de 5-HT1 BR canceló los efectos de la fluoxetina, tanto en el aumento de vasos como en el número de células satélite. La fluoxetina *in vitro* aumentó la velocidad de diferenciación y el número de células de reserva, mientras que la adición del inhibidor canceló esos efectos. Éste es un punto clave, ya que muestra que la fluoxetina, o los metabolitos encontrados en el plasma generado *in vivo* por la administración de fluoxetina puede actuar directamente en SC al dirigir el receptor de 5-HT1 B.

La inhibición de 5-HT₂ BR no afectó los resultados, lo que indica que el efecto de la fluoxetina de ratones tratados con plasma o directamente mediado por vortioxetina actúa específicamente sobre el receptor de 5-HT_{1B}.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la distrofia muscular más común y una enfermedad muscular progresiva recesiva ligada al cromosoma X causada por la ausencia de una proteína distrofina funcional (Emery, 2002). Los defectos estructurales observados en la DMD hacen que los miocitos tengan una mayor susceptibilidad al estrés mecánico y, junto con la isquemia importante, genera daños en los miocitos que inducen rondas sucesivas de degeneración y regeneración de miofibras, pérdida de homeostasis del calcio, respuesta inflamatoria crónica, fibrosis y mionecrosis. En individuos con DMD, estos procesos inevitablemente causan la pérdida de la ambulación poco después de la primera década y una vida breve con muerte en la tercera o cuarta década debido a anomalías cardio-respiratorias. No se conoce una cura para la DMD, y aunque el gen culpable ha sido identificado durante más de veinte años, la investigación sobre tratamientos ha producido pocos resultados clínicamente relevantes. Debido a estas características, pueden ser de interés principal tanto los vasos (isquemia) como las células satélite (regeneración muscular).

Después del suministro de fluoxetina a ratones distróficos (Mdx), todavía se observaron grandes variaciones en el tamaño de la fibra muscular y las fibras centronucleadas, pero el número de focos necróticos disminuyó drásticamente y el diámetro total de las fibras fue mayor. Mediante el ensayo Luminex®, también se demostró que los niveles globales de citocinas, una conocida lectura de la inflamación en ratón Mdx, disminuyeron. Esto se asoció con una disminución del número de células inflamatorias infiltradas.

Tomados en conjunto, esos resultados indican que la administración de fluoxetina, vortioxetina o sus derivados a pacientes distróficos presenta el potencial de disminuir la progresión de la distrofia, al aumentar la regeneración muscular, más particularmente el número de células madre musculares (además de los vasos). Los datos actuales muestran que este efecto está directamente mediado a través del receptor de 5-HT_{1B} que se expresa tanto en células endoteliales como en células madre musculares.

Referencias

- Baroffio A, Hamann M et al. (1996). *Differentiation*; 60(1): 47-57.
- Bauer JM, Kaiser MJ, y Sieber CC (2008). *J Am Med Dir Assoc* ;9(8):545-51
- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, et al (1998). *Am. J. Epidemiol.*; 147 (8): 755-63
- Beauchamp JR, Heslop L et al. (2000). *J Cell Biol*; 151(6): 1221-34.
- Bentzinger CF, y Rudnicki MA (2014). *Nat Med.*;20(3):234-5.
- Bernet JD, Doles JD, Hall JK, Kelly Tanaka K, Carter TA, y Olwin BB (2014). *Nat Med.*; 20(3):265-71.
- Bischoff R (1994). *Myology* (eds A.G. Engel y C. Frazini-Armstrong), pp.97-118. McGraw-Hill, New York.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, y Moore KJ (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A* ;81:1189-92.
- Charge SB y Rudnicki MA (2004). *Physiol Rev* ; 84(1): 209-38.
- Cornelison DD y Wold BJ (1997). *Dev Biol* ; 191(2): 270-83.
- Cosgrove BD, Gilbert PM, Porpiglia E, Mourikioti F, Lee SP, Corbel SY, Llewellyn ME, Delp SL, y Blau HM (2014). *Nat Med.* ;20(3):255-64.
- Emery AE (2002). *Lancet*; 359: 687-695.
- Farmaco, 1989, 44, de p.683.
- Goodell MA, y Rando TA (2015). *Science* ;350(6265):1199-204.
- Grounds MD y Yablonka-Reuveni Z (1993). *Cell Biol Hum Dis Ser*; 3:210-256.
- Hawke TJ y Garry DJ (2001). *J Appl Physiol*; 91:534:551.
- Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R, Yang Y, Mengod G, Palacios JM, O'Dowd BF (1992). *J. Biol. Chem*; 267 (9): 5735-8.
- Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M (1995). *J Cell Biol.*;129(2):383-96.

- Kuang S, Kuroda K et al. (2007). *Cell*; 129(5): 999-1010.
- 5 Kuch C, Winnekendonk D et al. (1997). *Exp Cell Res*; 232(2): 331-8.
- Kudryashova E, Kramerova I, y Spencer MJ (2012). *J Clin Invest.*; 122(5):1764-76.
- Kuroda N, Ohyama Y, Nakashima K, Nakashima K, y Akiyama S (1996). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 44(8): 1525-1529.
- 10 Kwak KB, Chung SS et al. (1993). *Biochim Biophys Acta*; 1175(3): 243-9.
- Lepper C, Partridge TA & Fan CM (2001). *Development*; 138: 3639-3646.
- 15 Livak KJ y Schmittgen TD (2001). *Methods* 25(4): 402-8.
- Marsella AJ, Sanborn KO, Kameoka V, Shizuru L & Brennan J (1975). *J Clin Psychol*; 31: 281-287.
- 20 Messier V, Karelis AD, Lavoie ME, Brochu M, Faraj M, Strychar I, y Rabasa-Lhoret R (2009). *Appl Physiol Nutr Metab.*; 34(1): 18-24.
- Moss FO y Leblond CP (1971). *Anat. Rec.*; 170:421-435.
- 25 Mokrosz JL, Pietrasiewicz M, Duszyńska B, y Cegla M (1992). *J. Med. Chem.*; 35 (13): 2369-2374.
- Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA & Kardon G (2011). *Development*; 138: 3625-3637.
- Nakaya K, Tanaka T, Shirataki Y, Shiozaki H, Funabiki K, Shibata K, Matsui M (2001). *Bulletin of the Chemical Society of Japan.*; 74(1): 173-177.
- 30 Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S (2012). *Cell*; 148(1-2):112-25.
- Romanelli MN, Manetti D, Scapecchi S, Borea PA, Dei S, Bartolini A, Ghelardini C, Gualtieri F, Guandalini L, y Varani K (2001). *J Med Chem.*; 44(23):3946-55.
- 35 Sadat U, Jaffer FA, Van Zandvoort MAMJ, Nicholls SJ, Ribatti D y Gillard JH (2014). *Circulation*; 130:786-794.
- Sambasivan R et al. (2009). *Dev Cell*; 16, 810-821.
- 40 Sambasivan R et al. (2011). *Development*; 138: 3647-3656 (2011).
- Sanchez FM, Cuadra GI, Nielsen SJ, Tanner A, Berges BK (2013). *Methods Mol Biol*; 1031:19-26.
- 45 Shi X y Garry DJ (2006). *Genes & Development*; 20:1692–1708.
- Schmuck K, Ullmer C, Engels P, Lübbert H (1994). *FEBS Lett* ;342(1):85-90.
- Schulz E y Jaryszak DL (1985). *Mech. Ageing Dev.*; 30-63-72.
- 50 Smith CK, Janney MJ et al. (1994). *J Cell Physiol*; 159(2): 379-85.
- Smythe GM, Davies MJ et al. (2001). *Cell Tissue Res*; 304(2): 287-94.
- 55 Yablonka-Reuveni Z y Rivera AJ (1994). *Dev Biol* ;164(2): 588-603.
- Vaittinen S, Lukka R et al. (2001). *J Neuropathol Exp Neurol* ; 60(6): 588-97.

REIVINDICACIONES

1. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización como:

i) un promotor de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o

ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite,

en un sujeto afectado por una pérdida y/o un daño y/o un deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s),

en la que dicho derivado de la vortioxetina es vortioxetina que está modificada para comprender por lo menos una porción química cargada.

2. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha sujeto está afectado por degeneración muscular congénita o adquirida, debilidad, disfunción y/o pérdida que afecta al(a los) músculo(s) esquelético(s), tales como distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular congénita, distrofia muscular de cinturas (LGMD), distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal, y distrofia muscular de Emery-Dreifuss, miopatías inflamatorias, miopatía inducida por fármaco, miopatía inducida por traumatismo, o miopatía inducida por cirugía, enfermedad de Buerger, sarcopenia inducida por cáncer o miopatía inducida por dieta.

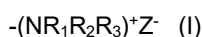
3. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dichos pérdida y/o daño y/o deterioro naturales del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s) es la sarcopenia.

4. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho derivado de la vortioxetina es vortioxetina que está modificada para comprender por lo menos una porción química cargada positivamente.

5. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según la reivindicación 4, en la que dicha porción química cargada positivamente es un grupo amonio cuaternario o un grupo sulfonio terciario.

6. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según la reivindicación 5, en la que

- dicho grupo amonio cuaternario presenta la fórmula (I)



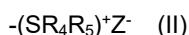
en la que

Z es un anión orgánico o inorgánico; y

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y cicloalquilo;

o

- dicho grupo sulfonio terciario presenta la fórmula (II)



en la que

Z es un anión orgánico o inorgánico; y

R₄ y R₅ son cada uno seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en alquilo, arilo y cicloalquilo.

7. Vortioxetina o derivado de la misma, para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicho derivado de vortioxetina es una vortioxetina cargada positivamente seleccionada de entre el grupo que consiste en sales de vortioxetina, vortioxetina acoplada a un aminoácido cargado positivamente tal como histidina, arginina o lisina, pirrolidinio-vortioxetina, piperazinio-vortioxetina, dimetilamonio-vortioxetina, sulfonio-vortioxetina, N-óxido-vortioxetina, sulfóxido-vortioxetina y fosfonio-vortioxetina, siendo dicha vortioxetina preferentemente histidina-vortioxetina o pirrolidinio-vortioxetina.

8. Vortioxetina o derivado de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la

utilización para retrasar la progresión de la pérdida y/o daño y/o deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s).

9. Composición farmacéutica para la utilización como:

- i) un promotor de la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o
- ii) un agente que previene y/o inhibe el agotamiento del conjunto de células satélite,

en un sujeto afectado por una pérdida y/o un daño y/o un deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s),

en la que dicha composición comprende vortioxetina o un derivado de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Composición para la utilización según la reivindicación 9, que comprende además por lo menos un agente activo que retrasa, previene o trata una pérdida y/o un daño y/o un deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s) y/o aumenta o potencia la acción de dichos vortioxetina o derivado de la misma.

11. Composición para la utilización según la reivindicación 10, en la que dicho agente se selecciona de entre el grupo que consiste en células satélite, células madre hematopoyéticas, pericitos, mesangioblastos, células madre mesenquimatosas, agentes antiinflamatorios, agentes miotróficos, agentes inmunoterapéuticos, anticuerpos, elementos genéticos, pindolol, (S)-(-)-pindolol, y sus combinaciones.

12. Vortioxetina o derivado de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un agente activo que retrasa, previene o trata una pérdida y/o un daño y/o un deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s) y/o aumentar o potenciar la acción de dichos vortioxetina o derivado de la misma, como una preparación combinada para la administración simultánea, separada o secuencial en un sujeto afectado por una pérdida y/o un daño y/o un deterioro naturales o patológicos del(de los) tejido(s) muscular(es) esquelético(s).

13. Utilización *in vitro* de vortioxetina o de un derivado de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para promover la autorrenovación y/o la diferenciación de células satélite.

14. Método *in vitro* para promover la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de vortioxetina o de un derivado de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, a una muestra biológica aislada que comprende células satélite.

15. Método de cribado *in vitro* para identificar un agente o una combinación de agentes que promueven la autorrenovación y/o diferenciación de células satélite; y/o prevenir y/o inhibir el agotamiento del conjunto de células satélite, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto las células satélite aisladas con un agente candidato o una combinación de agentes candidatos;
- b) evaluar el fenotipo celular de dichas células;
- c) comparar el fenotipo celular en la etapa b) con el fenotipo de las células satélite puestas en contacto con vortioxetina o un derivado de la misma, siendo dicho derivado de vortioxetina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o comparar el fenotipo celular en la etapa b) con el fenotipo de las células satélite en ausencia de dichos agente o combinación de agentes, y/o con el fenotipo de las células satélite puestas en contacto con vortioxetina o un derivado de la misma, siendo dicho derivado de vortioxetina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

FIG. 1

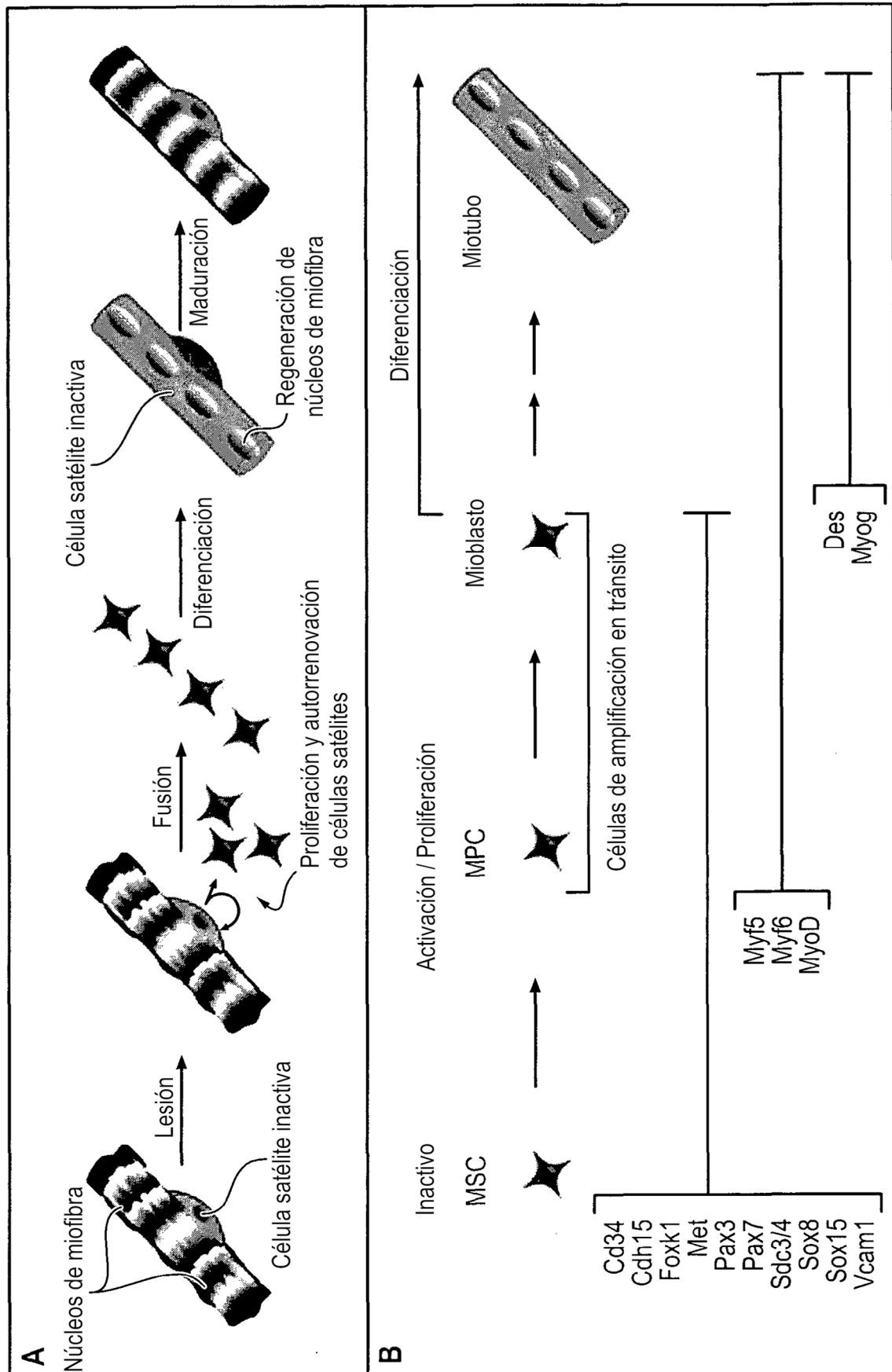


FIG. 2

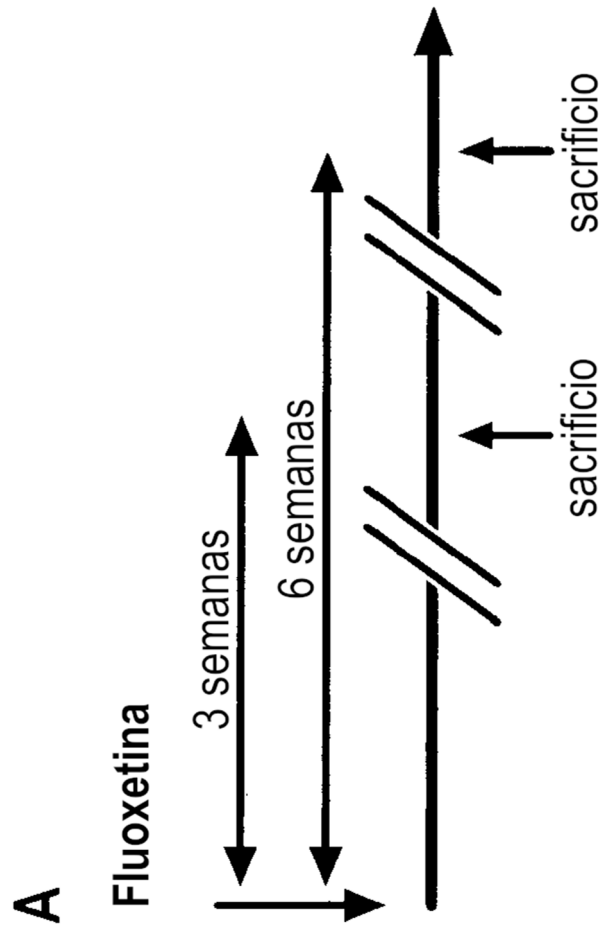


FIG. 2 (continuación)

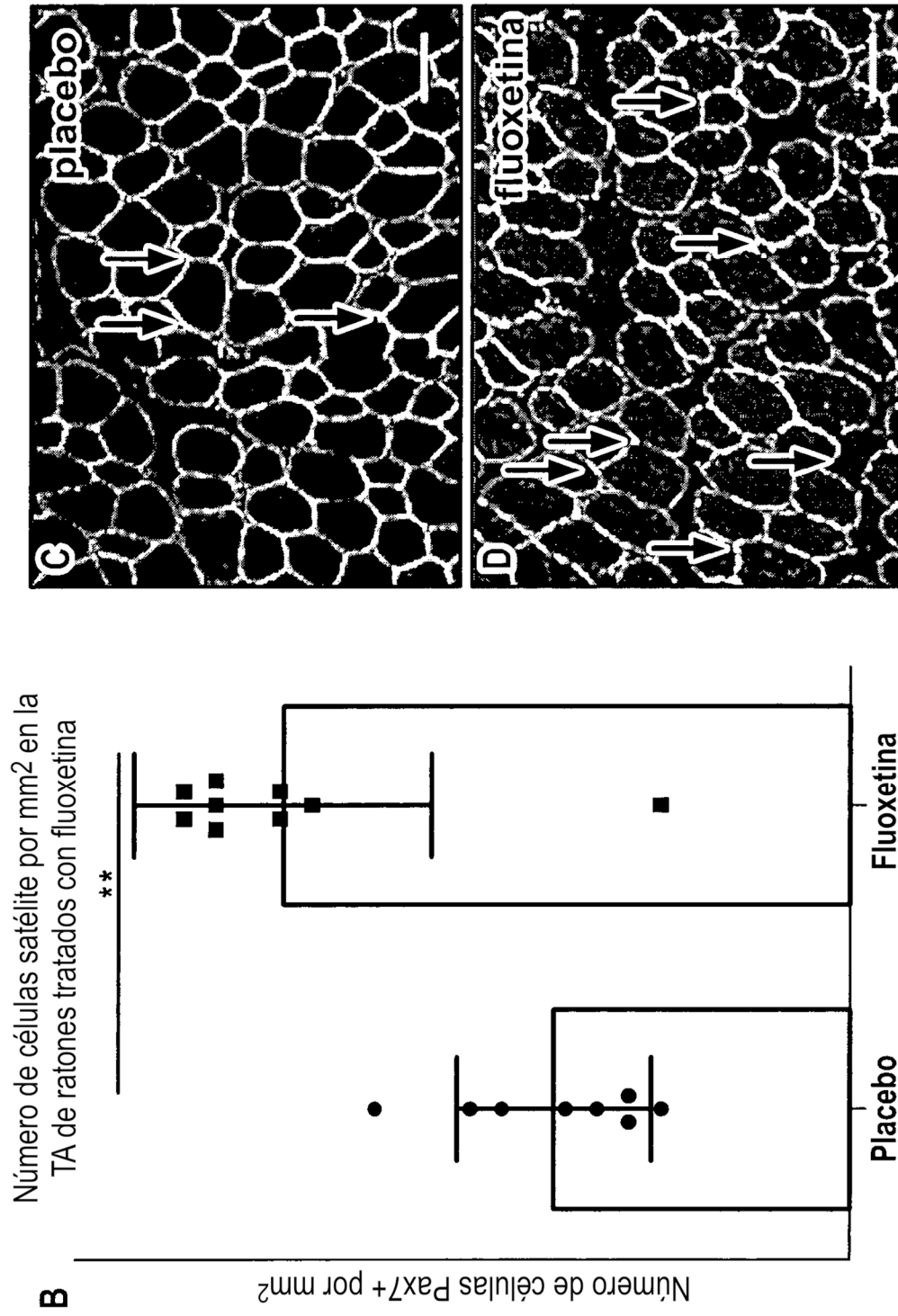


FIG. 2 (continuación)

E Número de vasos en la TA en *Flk-1^{GFP/+}* tratados con fluoxetina

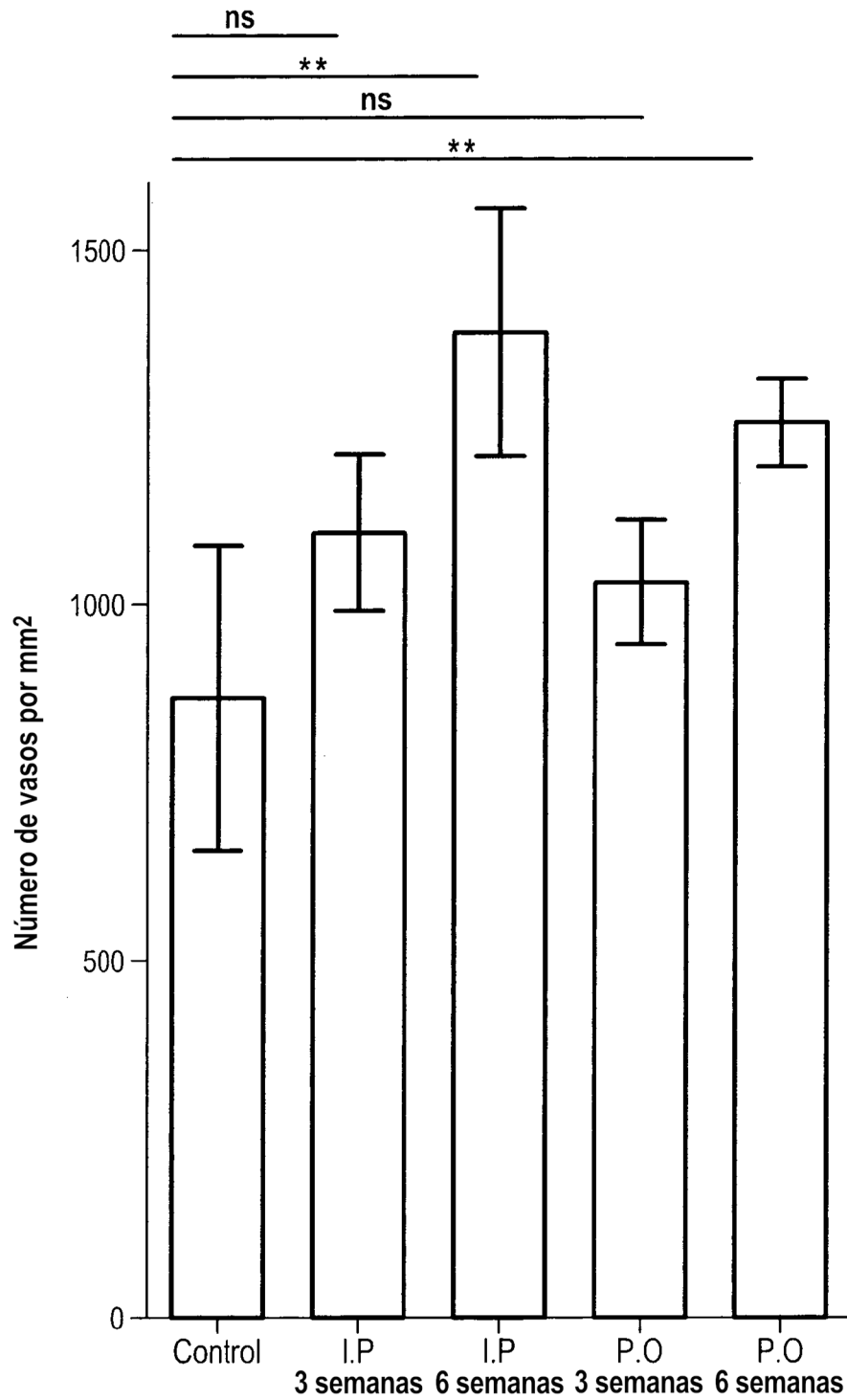
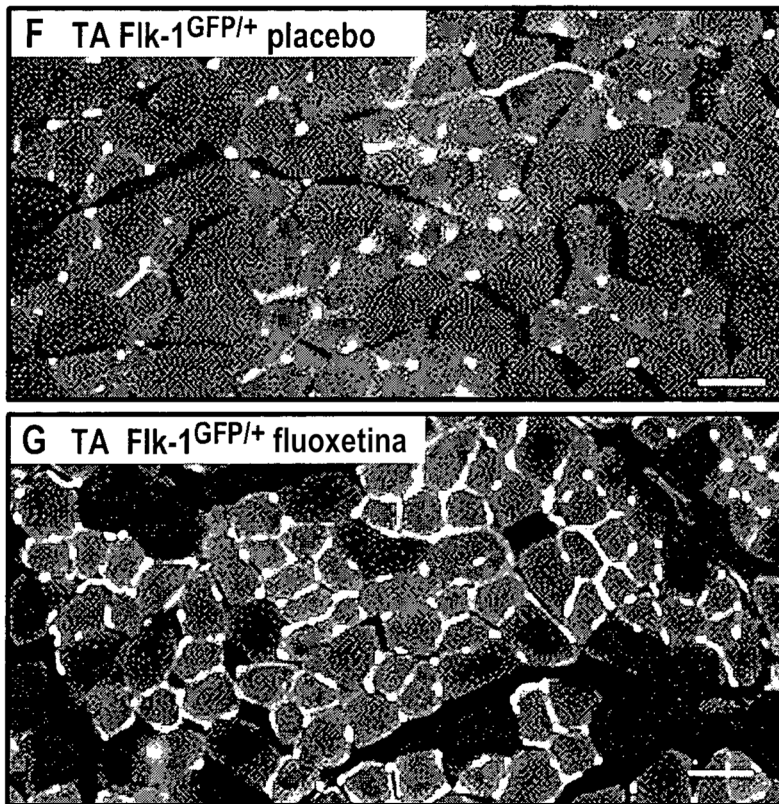
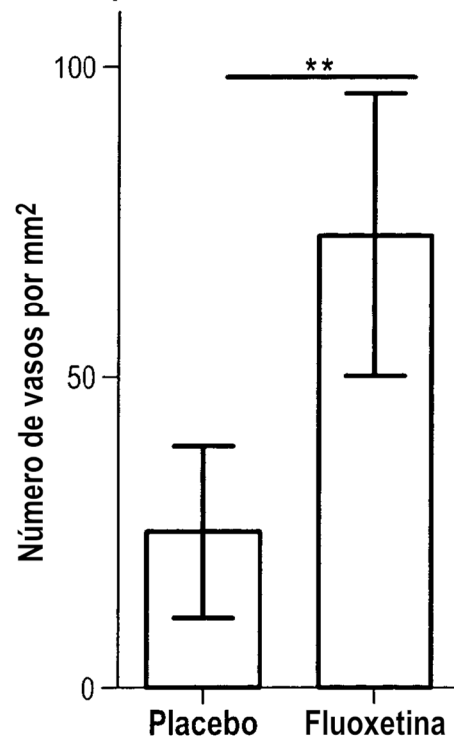


FIG. 2 (continuación)



H Número de vasos (CD31) en tapones de matrigel después del tratamiento de fluoxetina



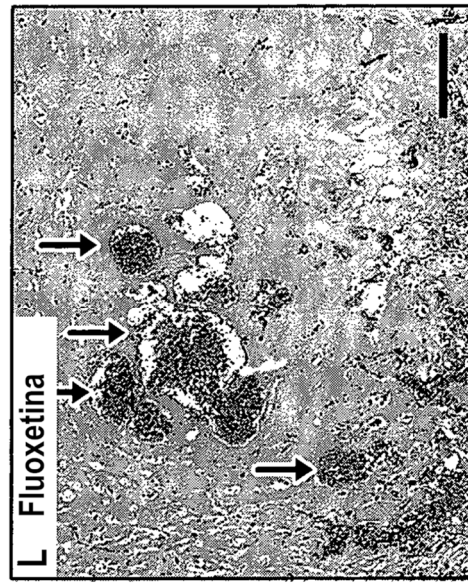
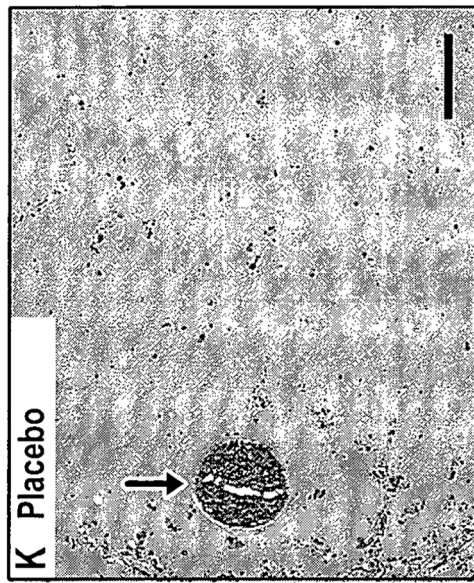


FIG. 2 (continuación)

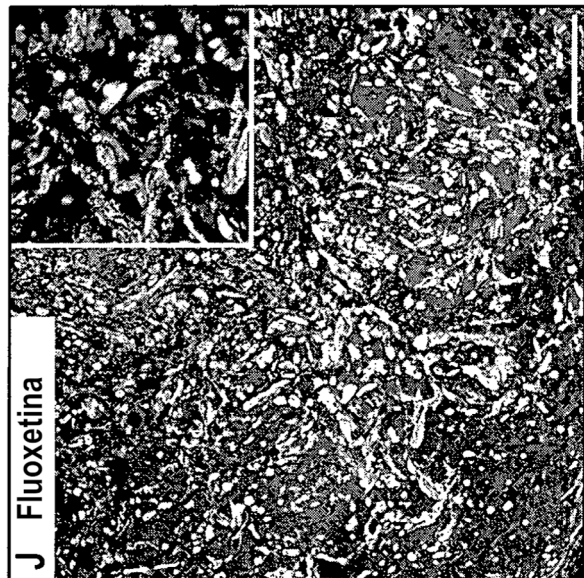
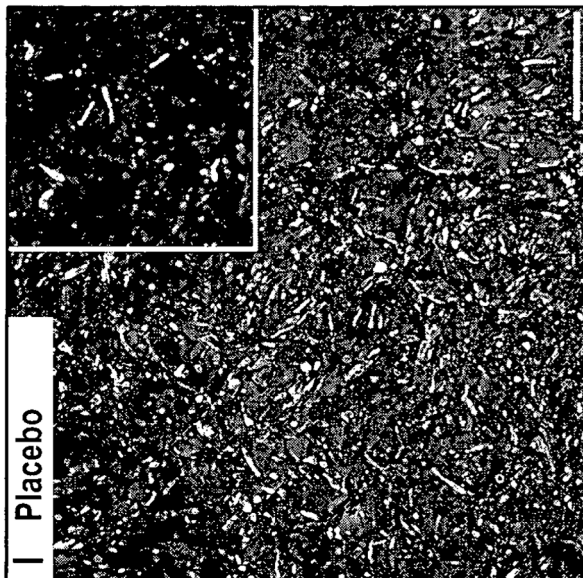


FIG. 2 (continuación)

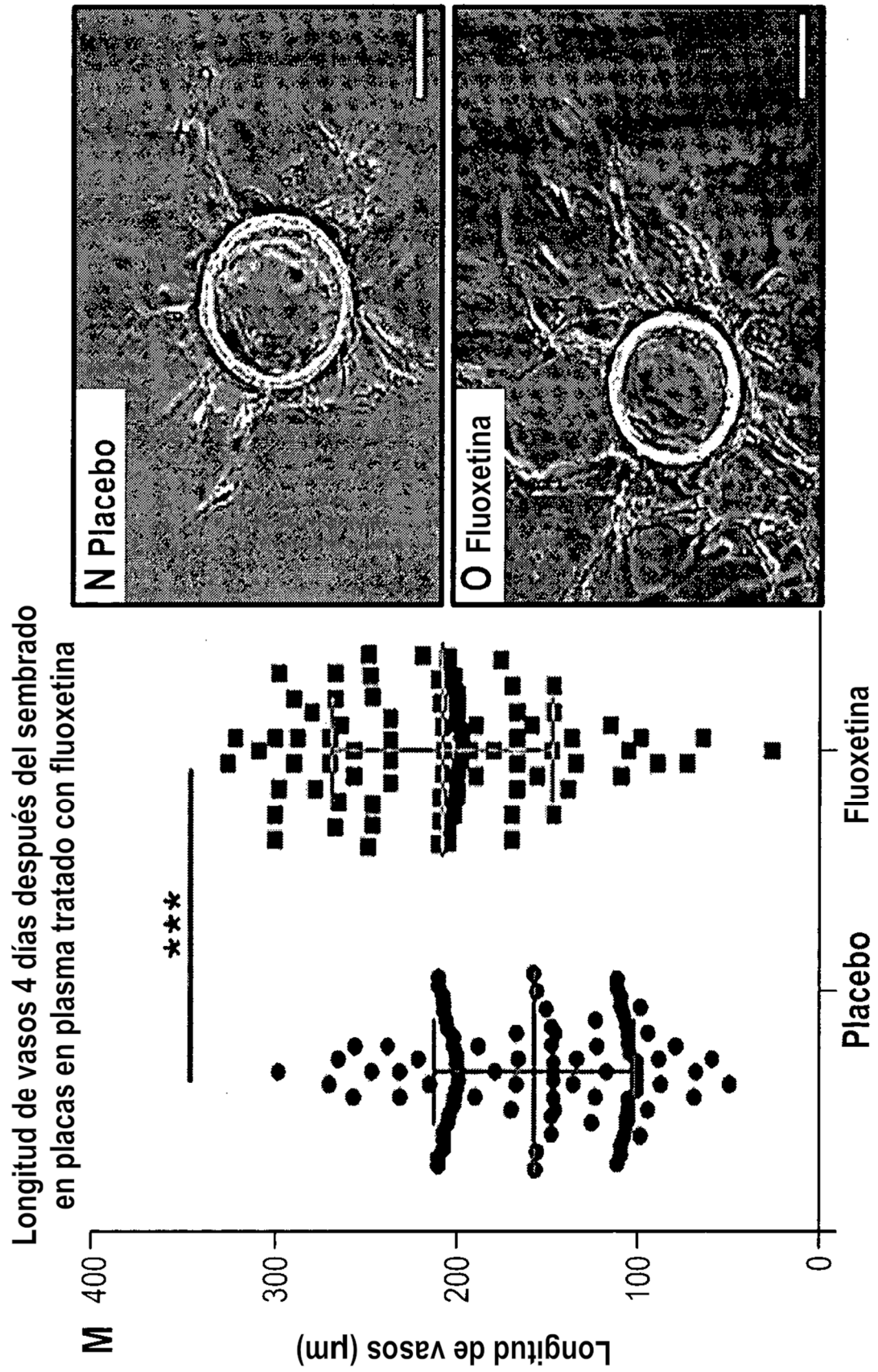


FIG. 2 (continuación)

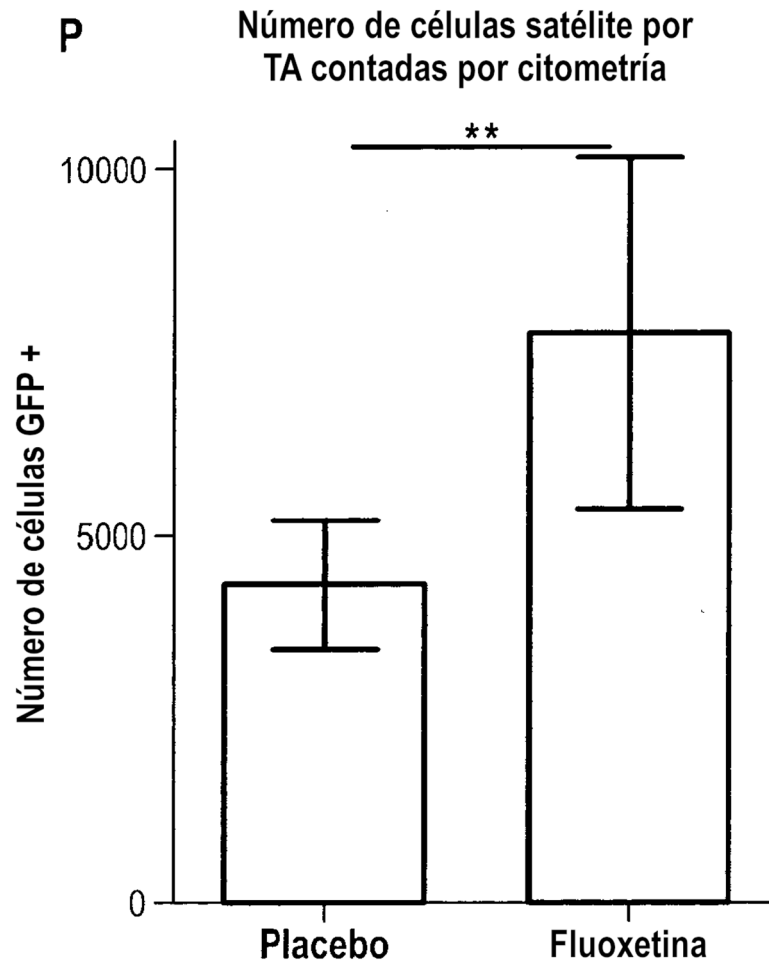


FIG. 2 (continuación)

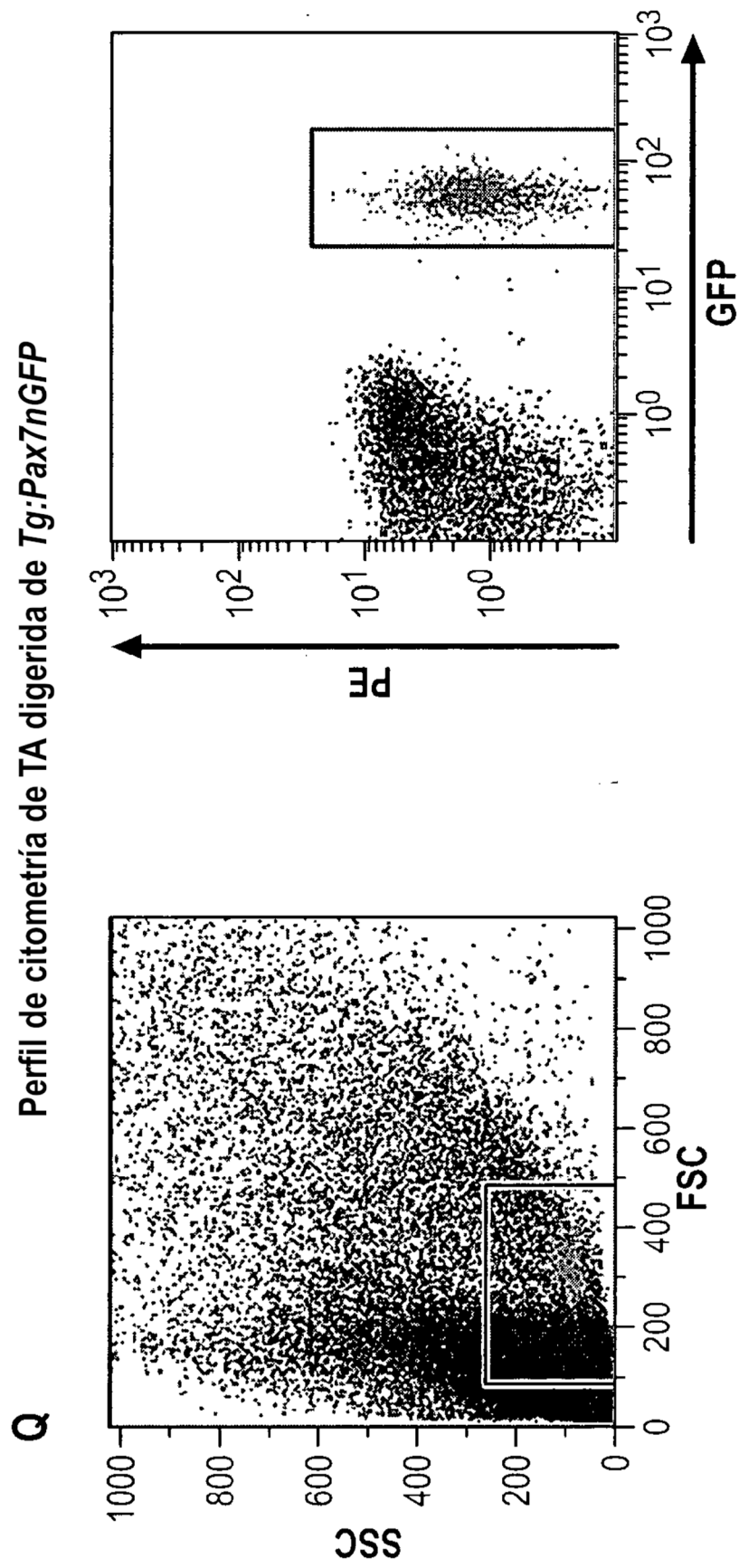


FIG. 2 (continuación)

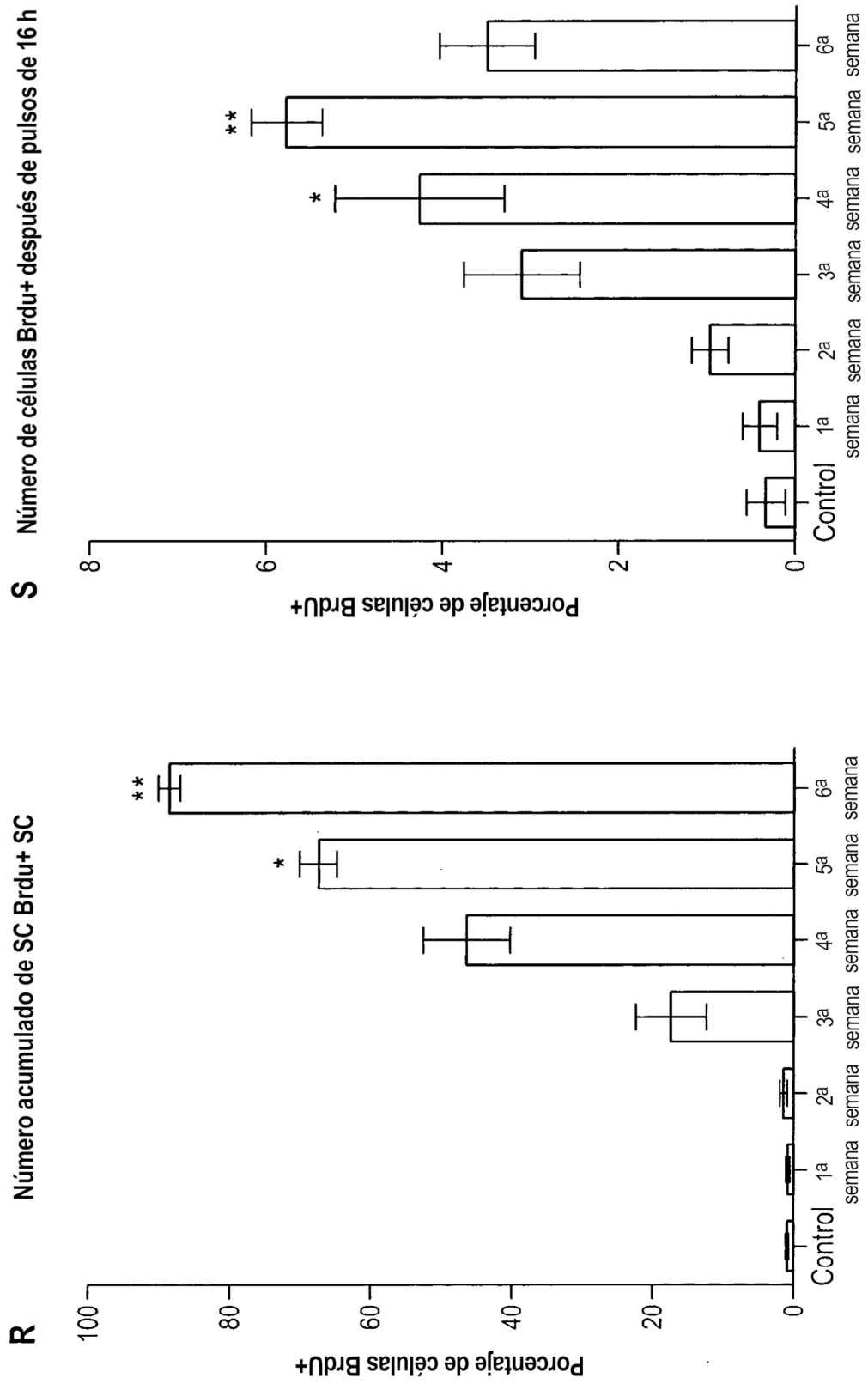


FIG. 2 (continuación)

T

Número de vasos en la TA (CD31+) en C57Bl/6
tratado con fluoxetina

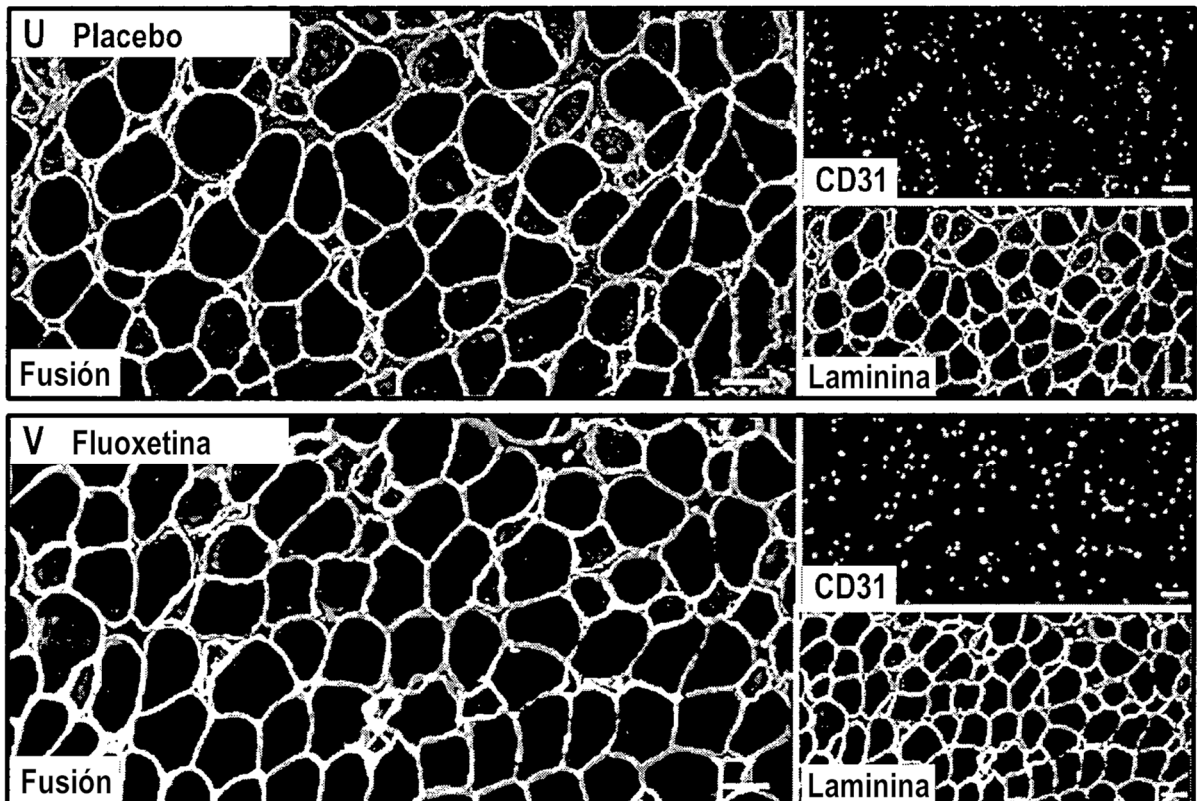
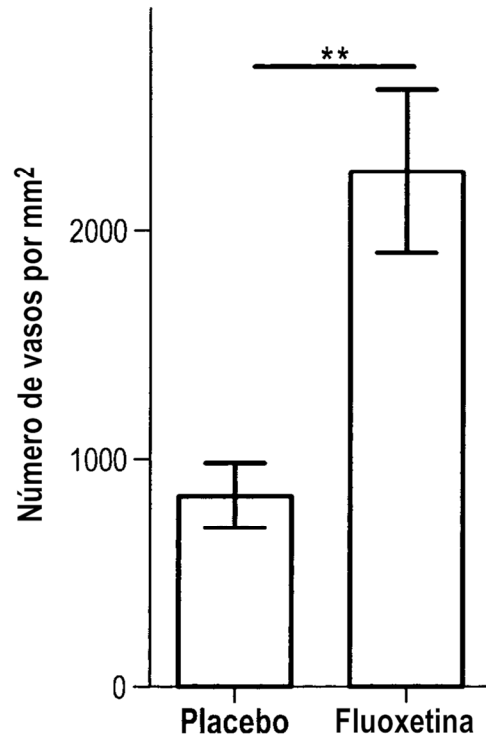


FIG. 3

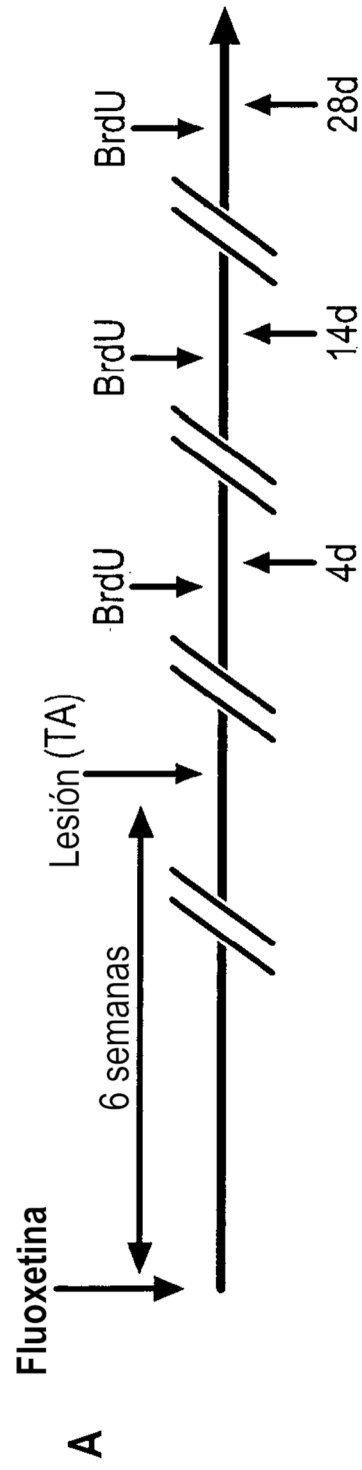


FIG. 3 (continuación)

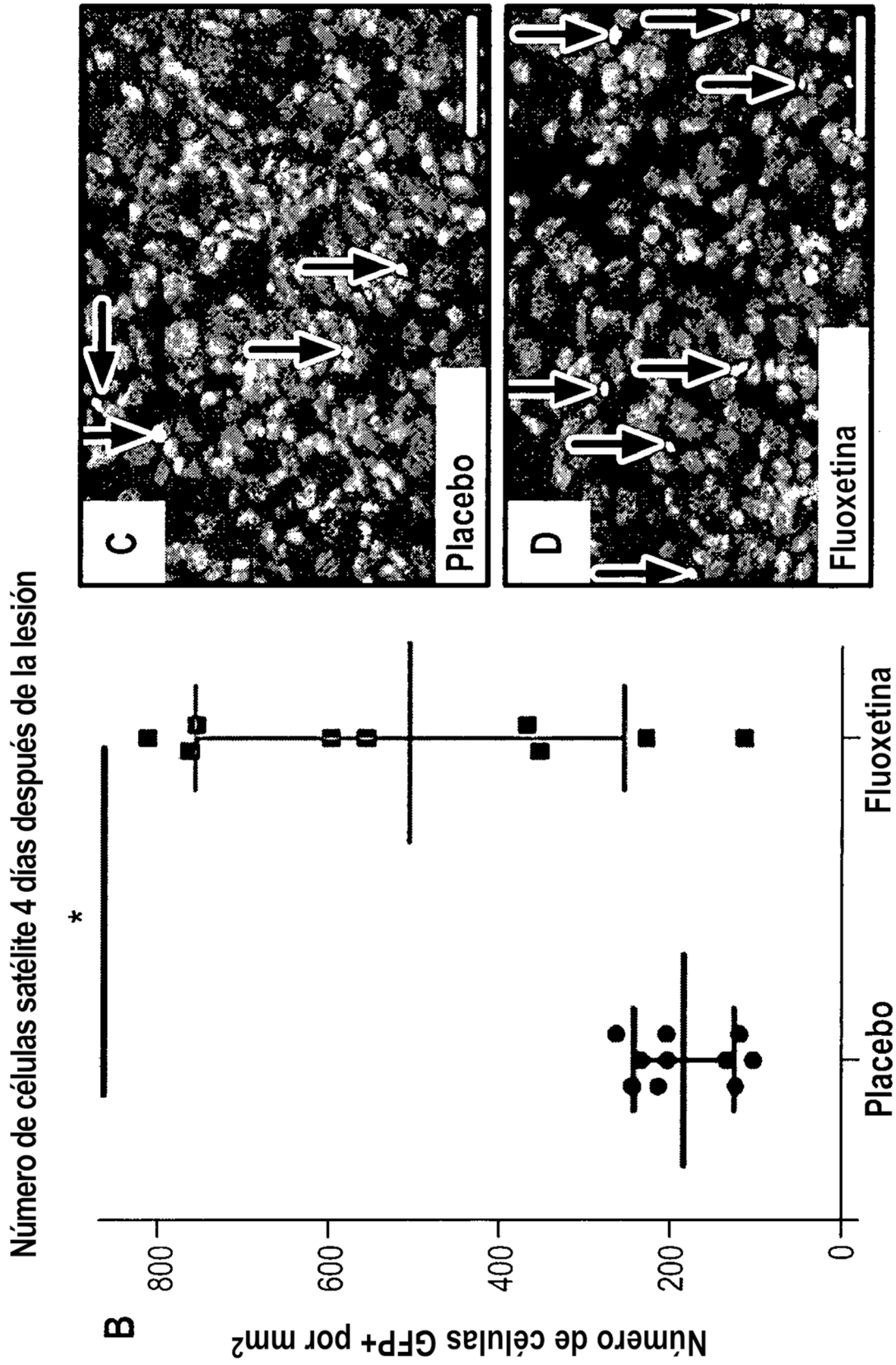


FIG. 3 (continuación)

Número de células de diferenciación 4 días después de la lesión

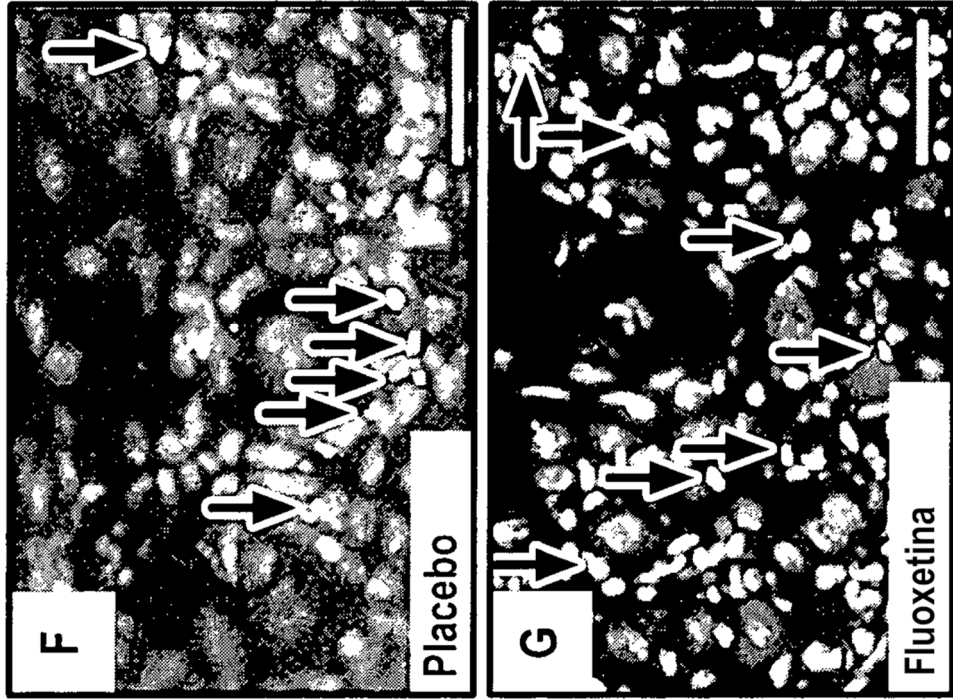
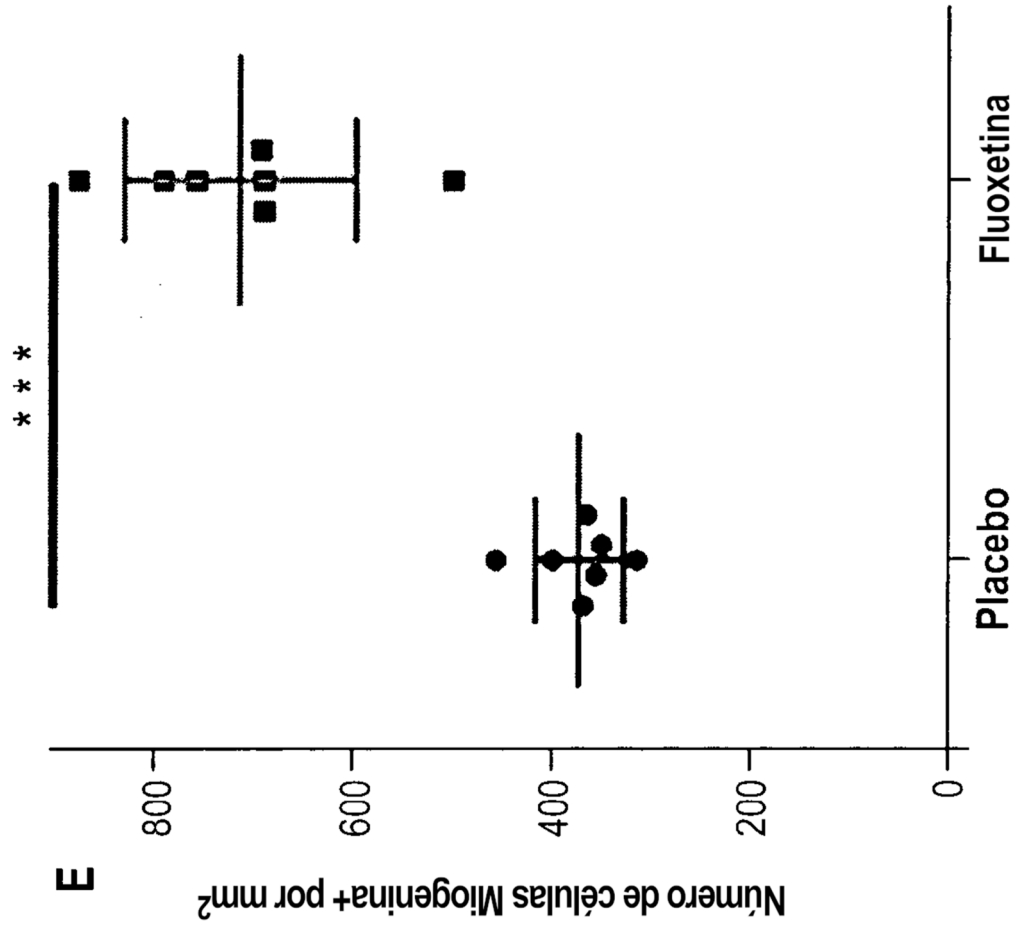


FIG. 3 (continuación)

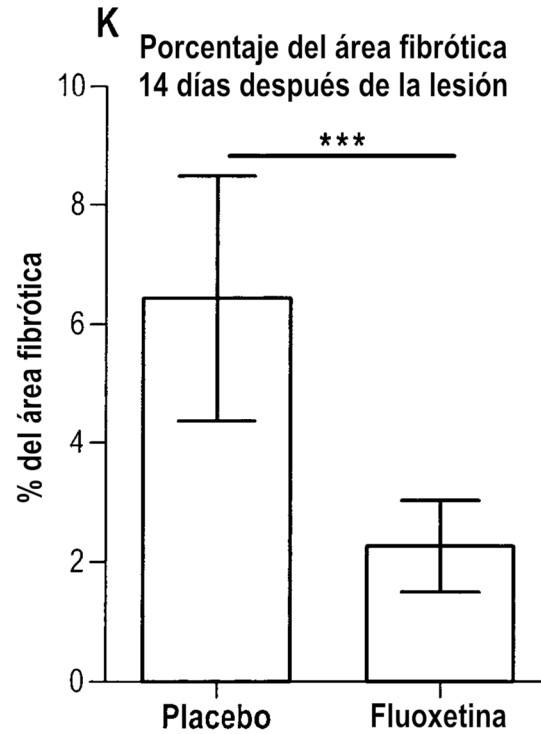
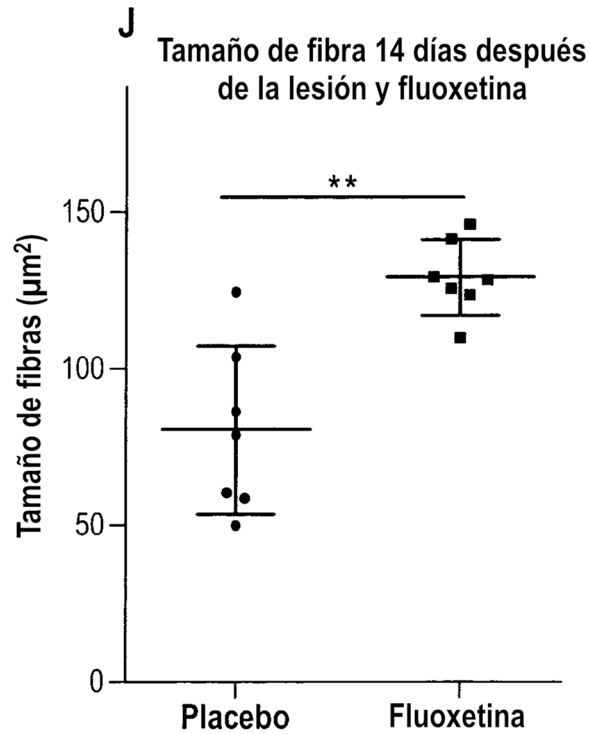
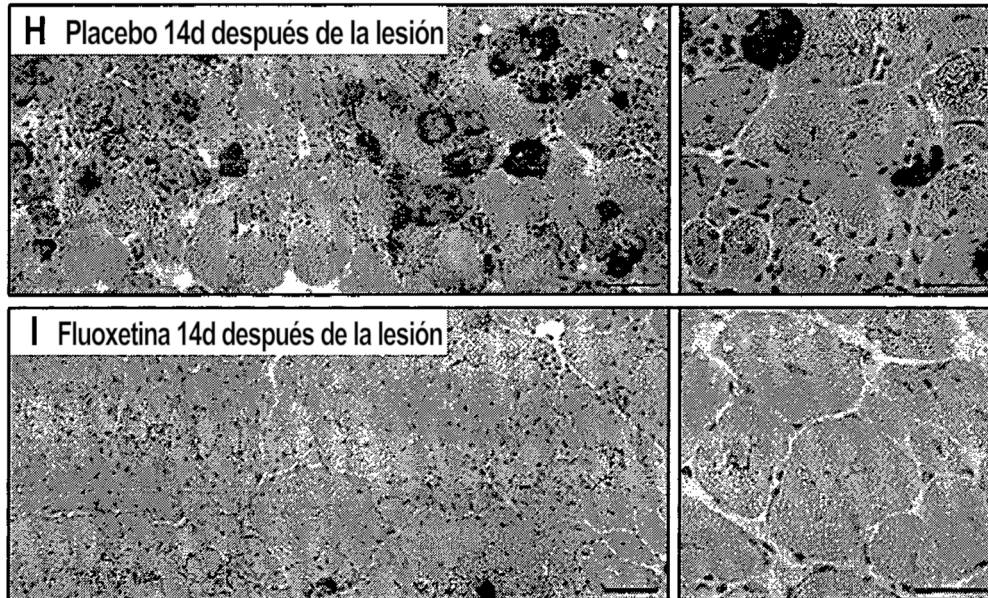


FIG. 3 (continuación)

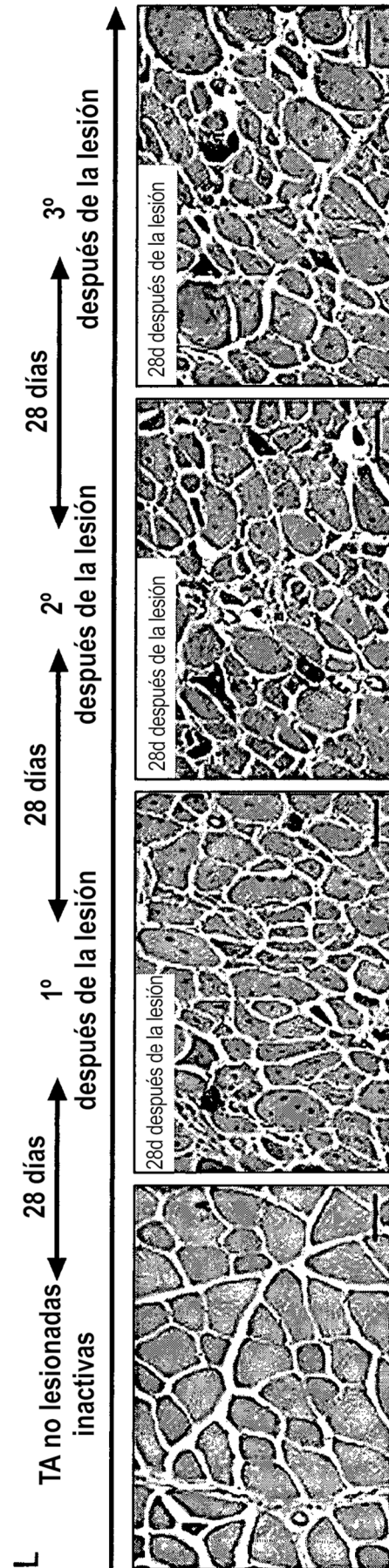


FIG. 4

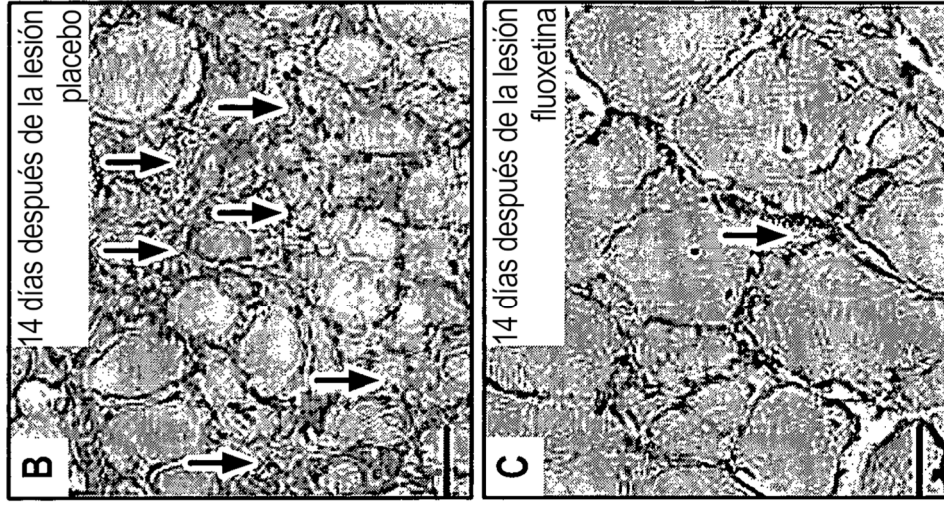
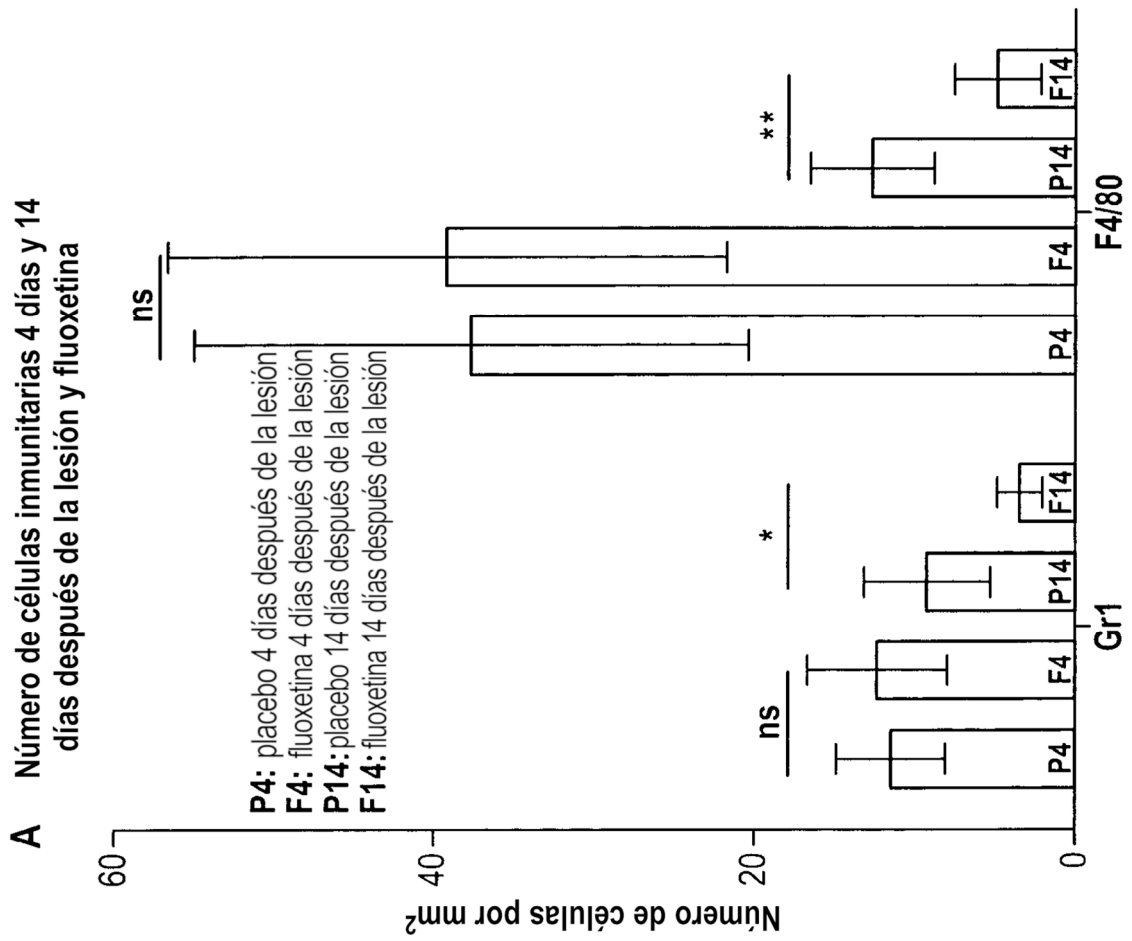


FIG. 4 (continuación)

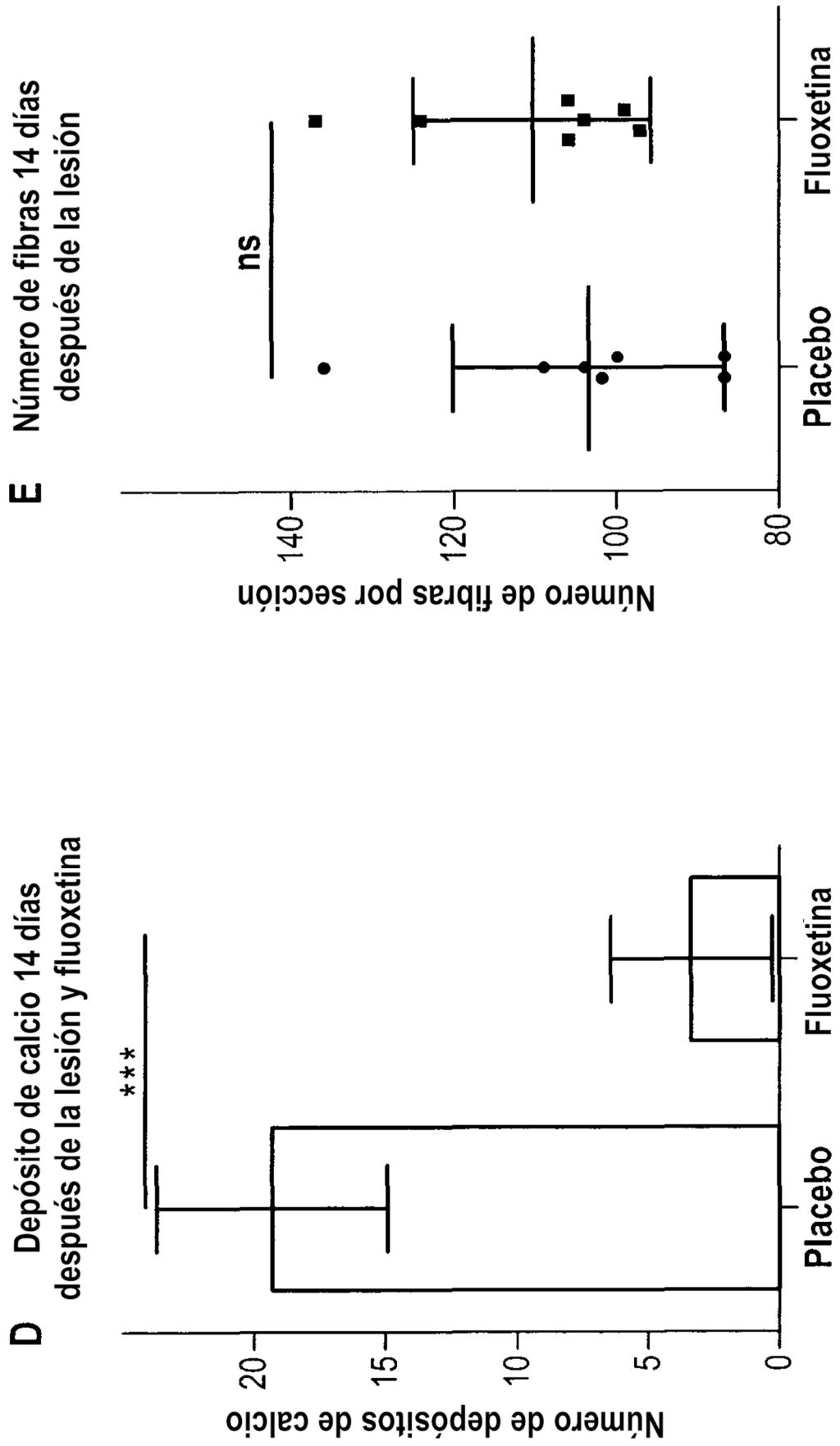


FIG. 4 (continuación)

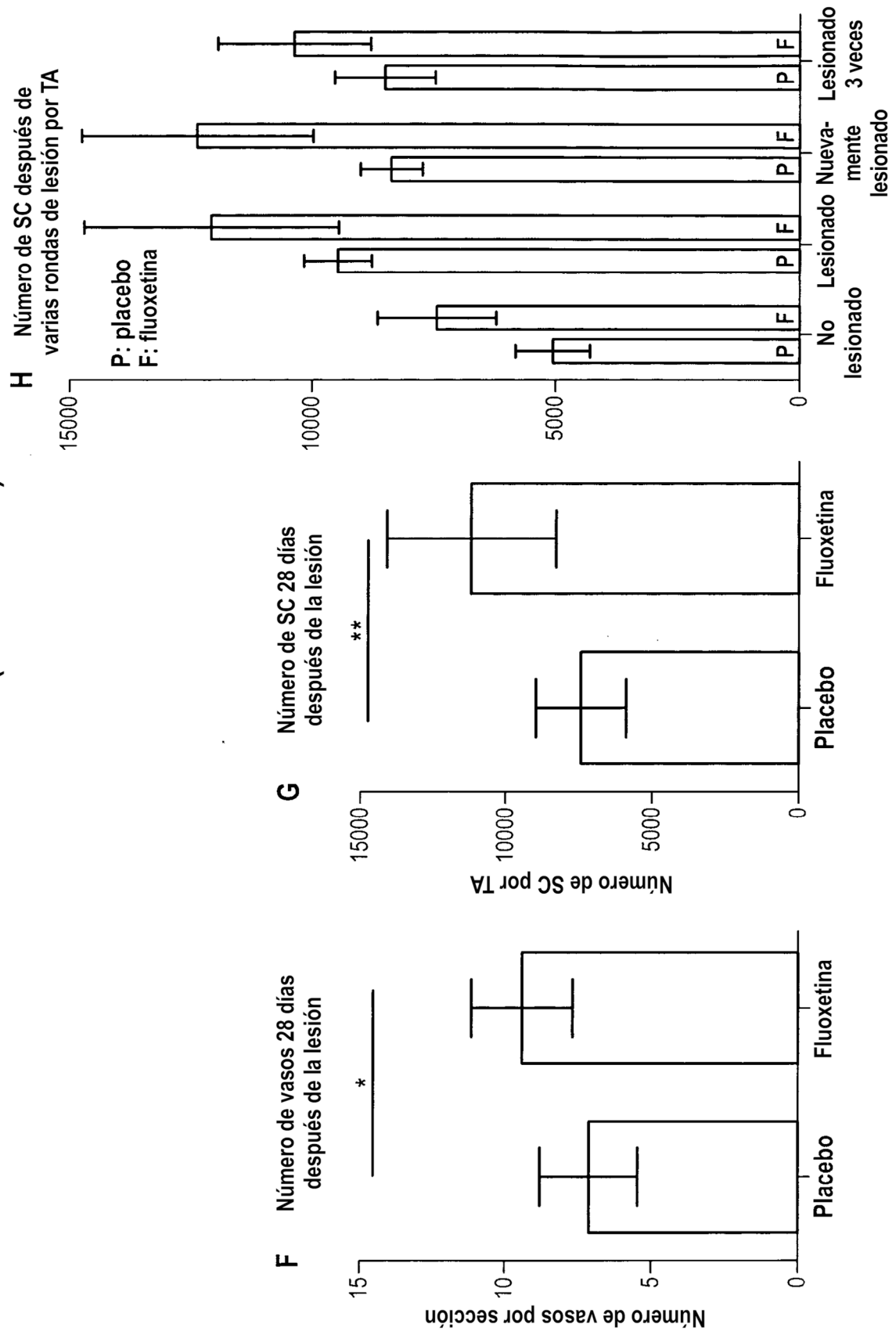


FIG. 4 (continuación)

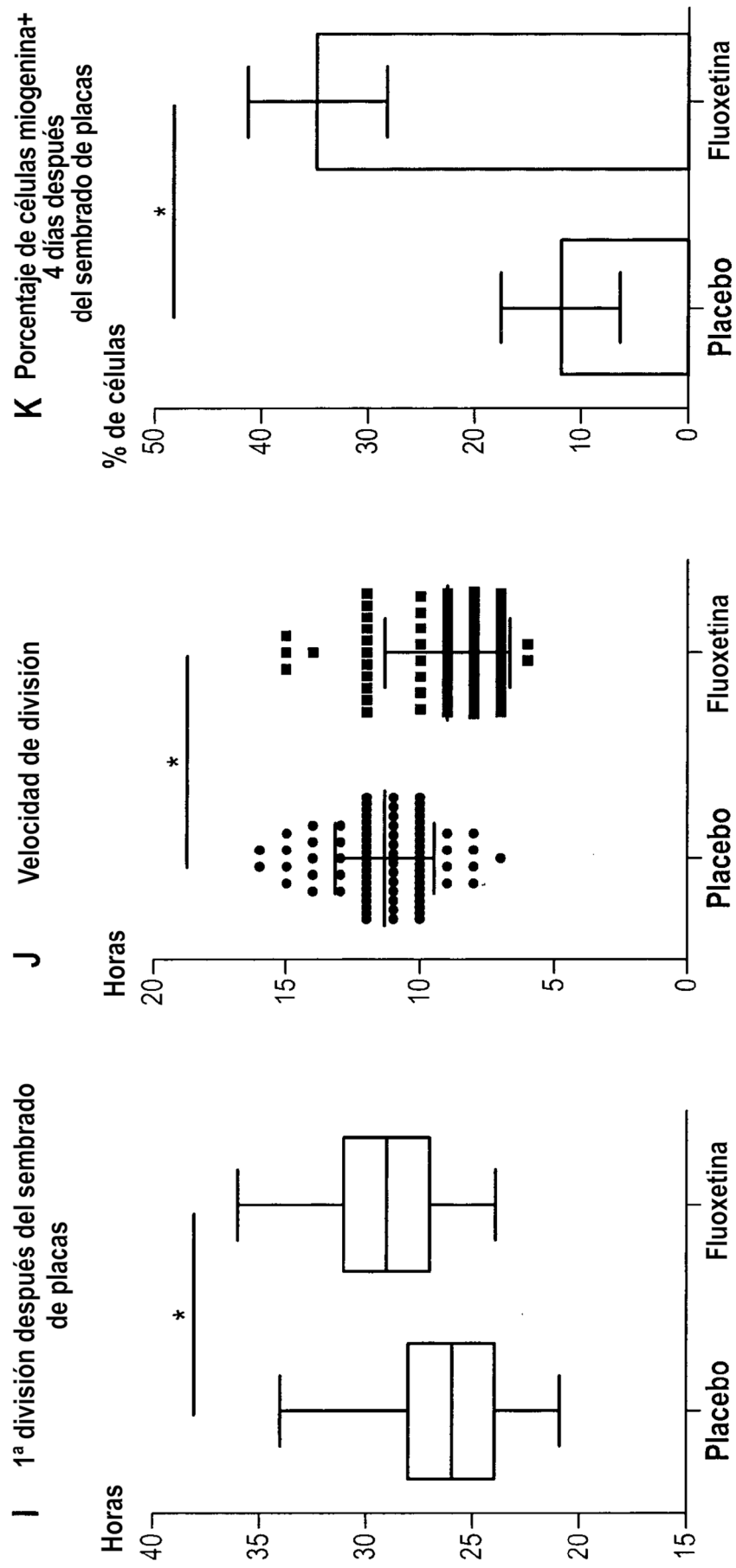


FIG. 5

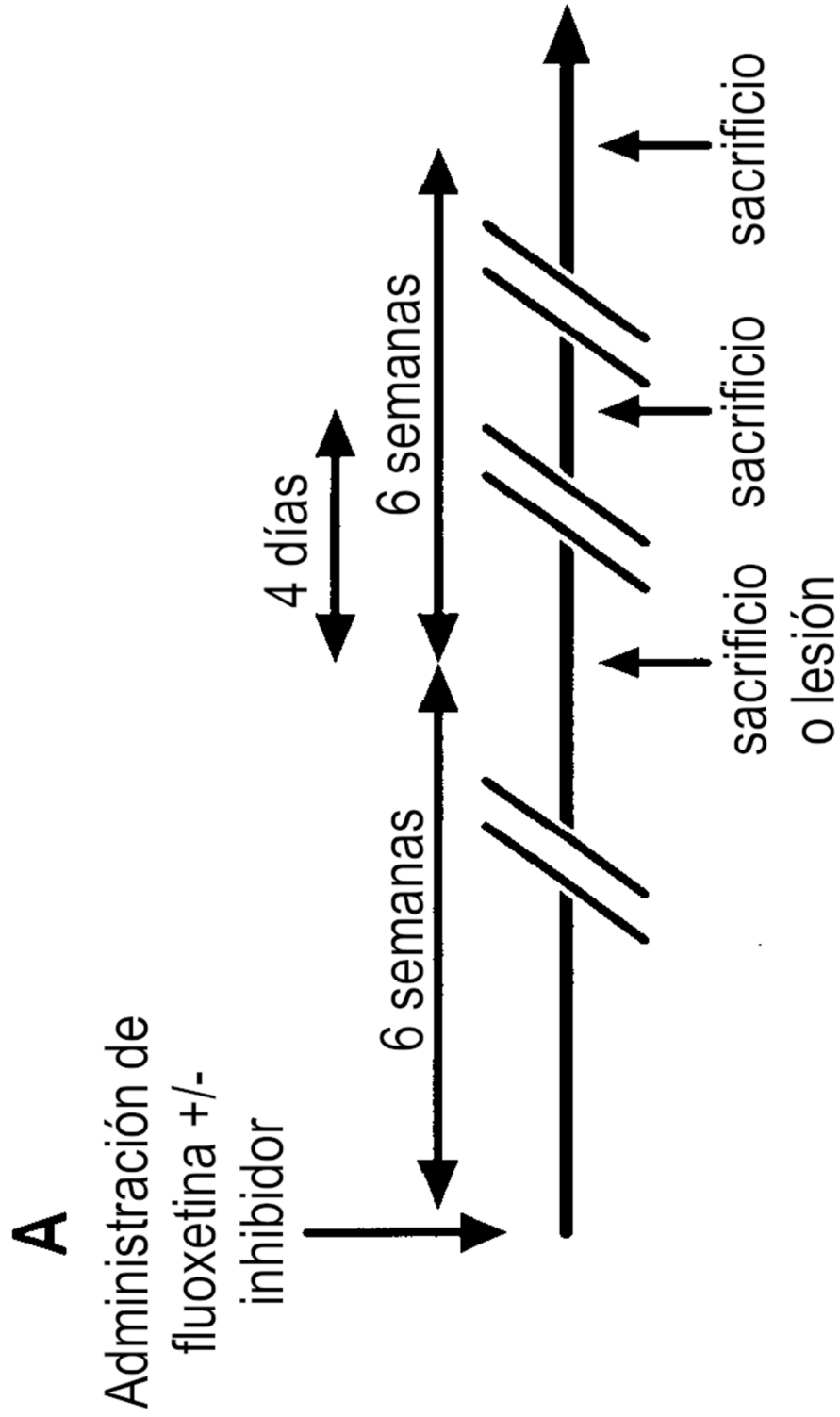


FIG. 5 (continuación)

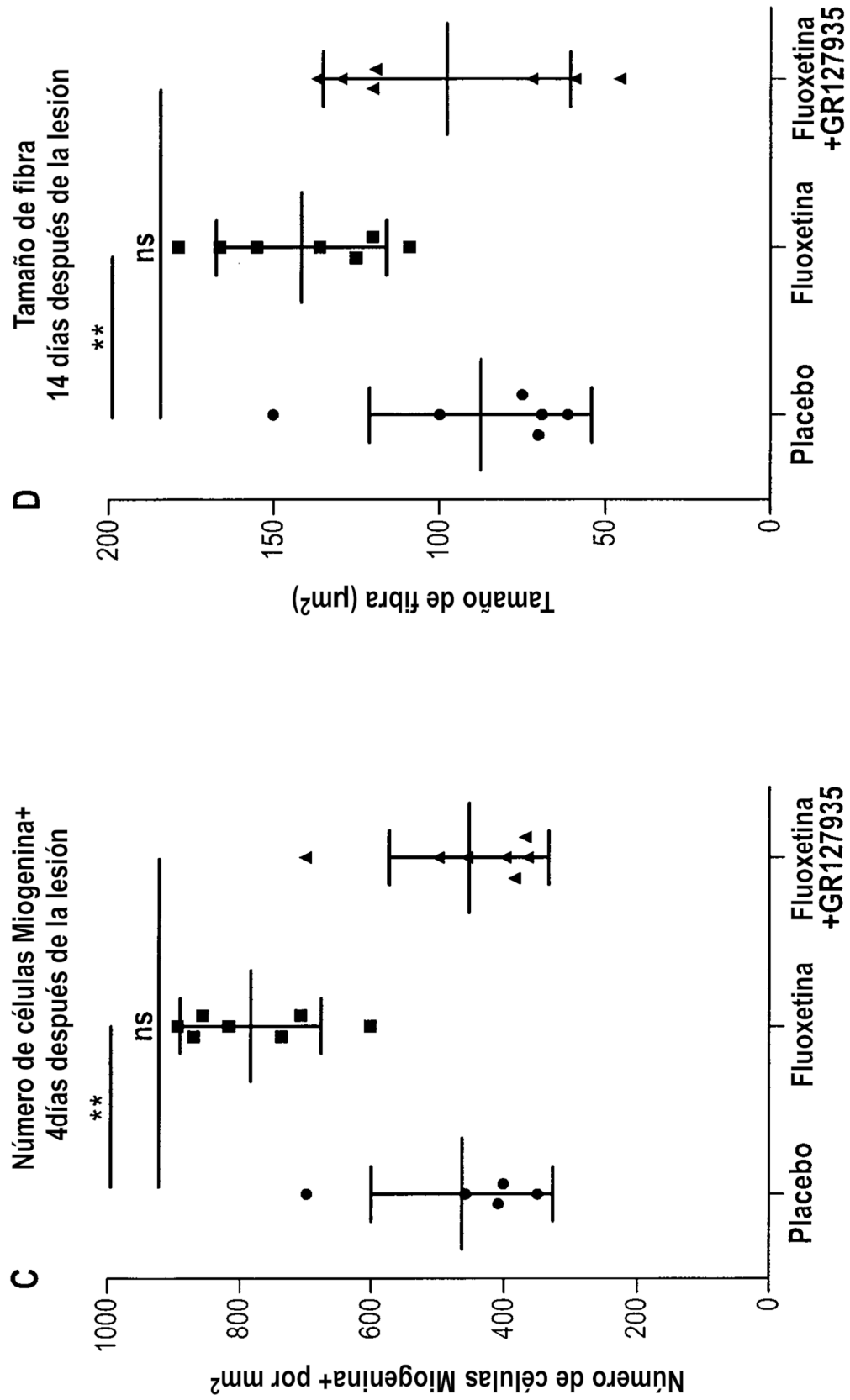


FIG. 5 (continuación)

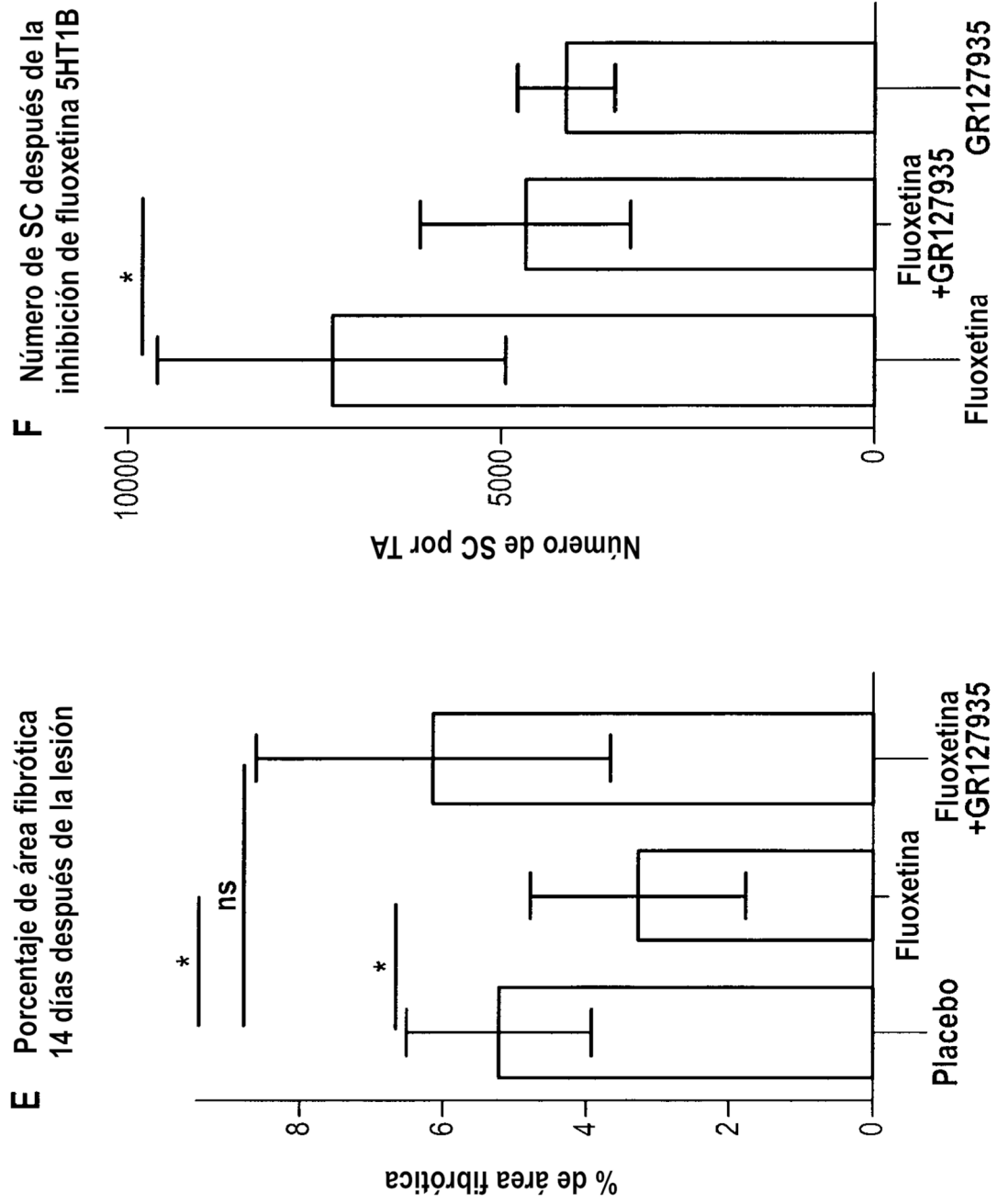


FIG. 5 (continuación)

! Número de vasos después de la fluoxetina e inhibición de 5HT1B

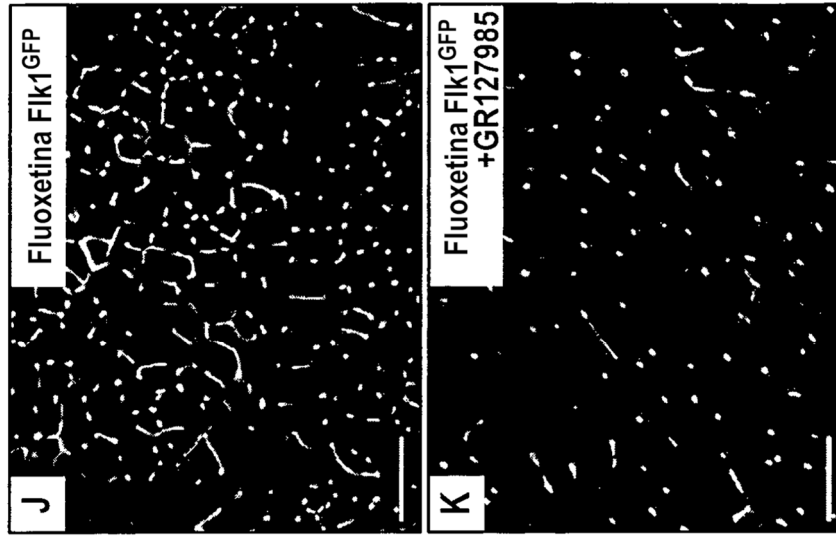
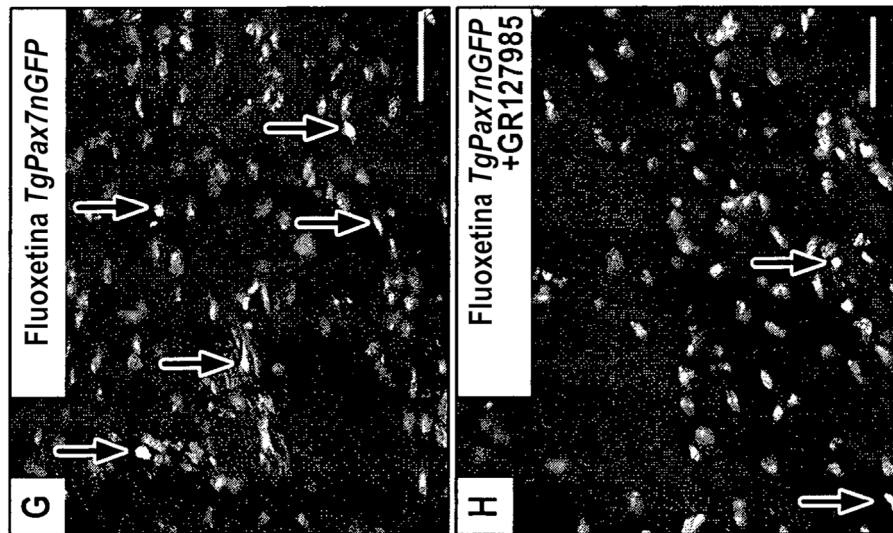
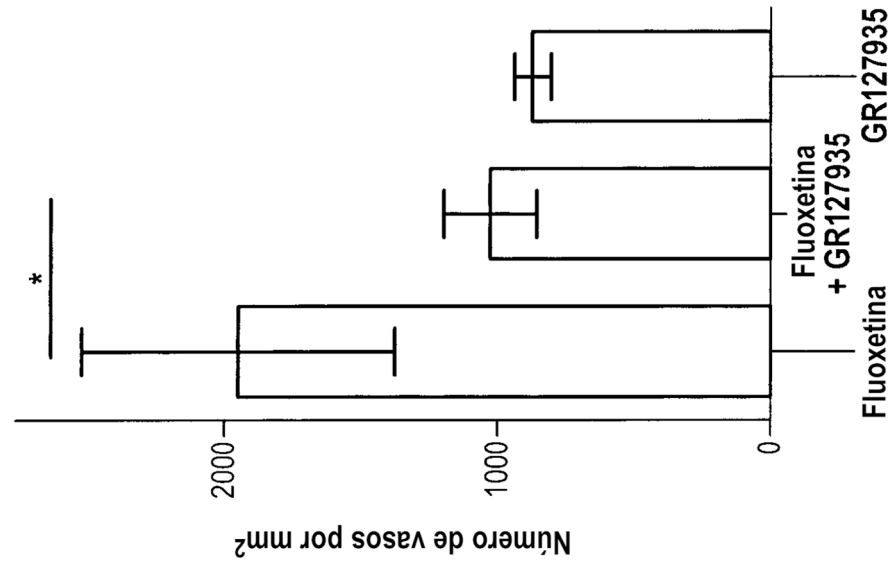


FIG. 6

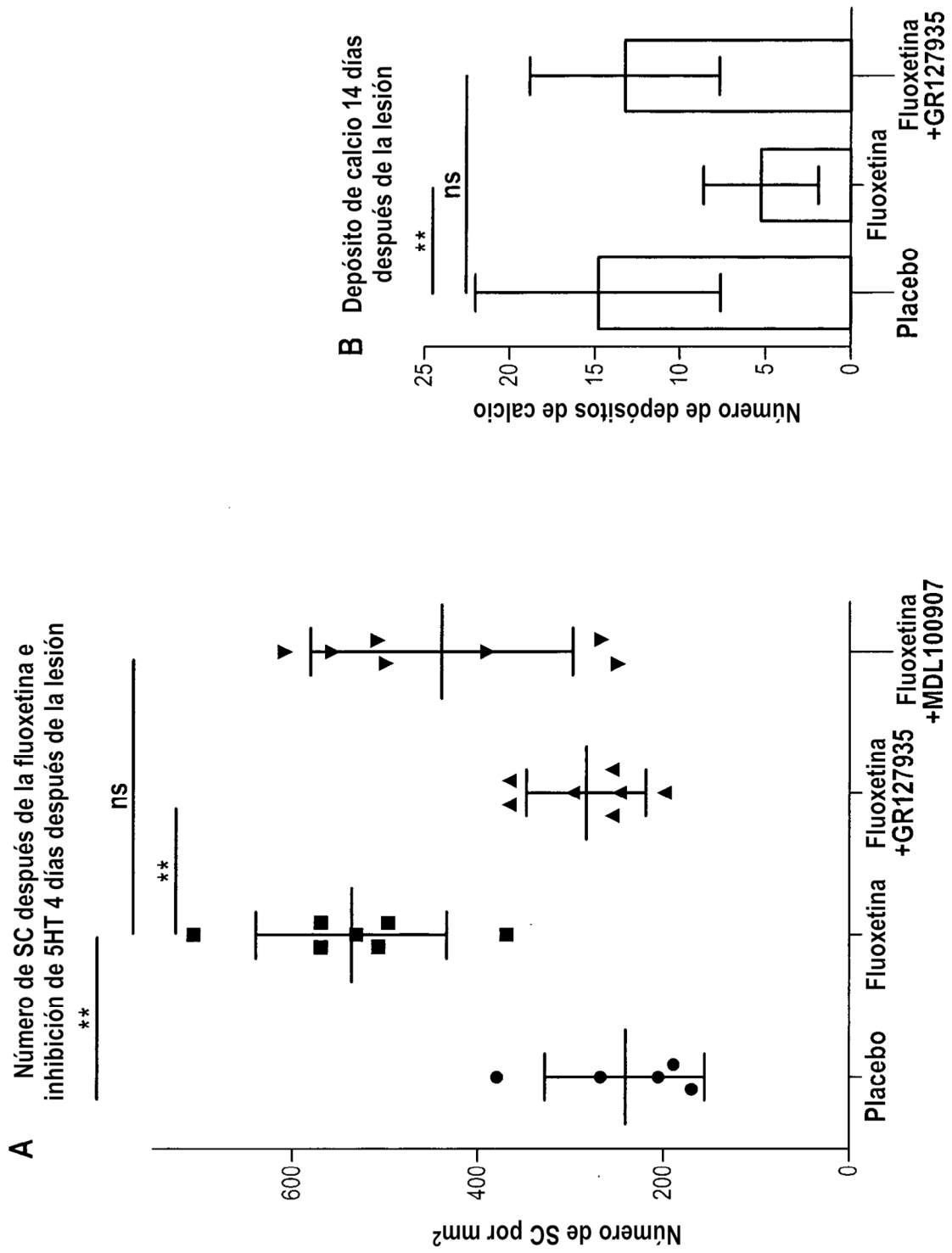


FIG. 6 (continuación)

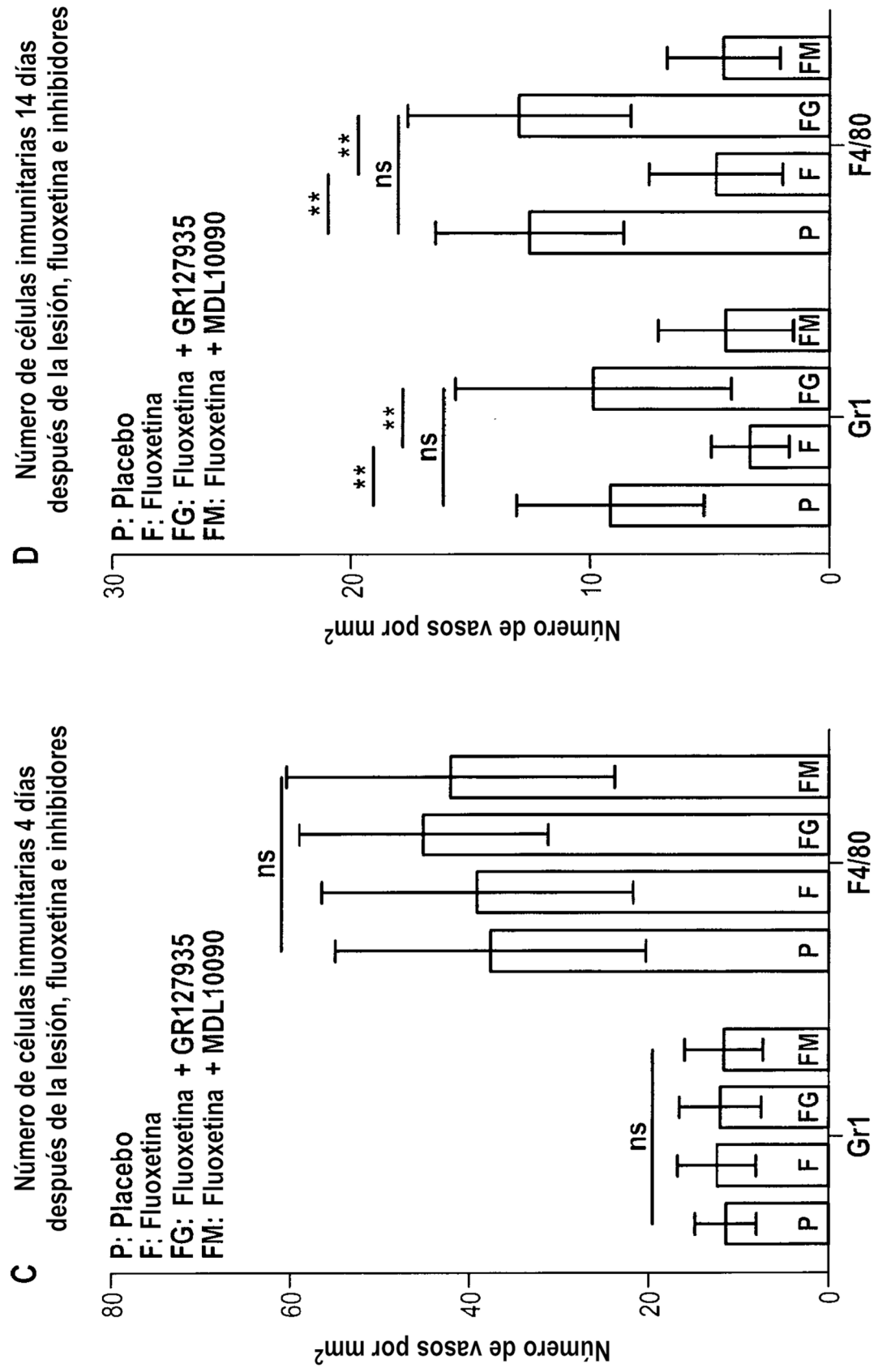


FIG. 6 (continuación)

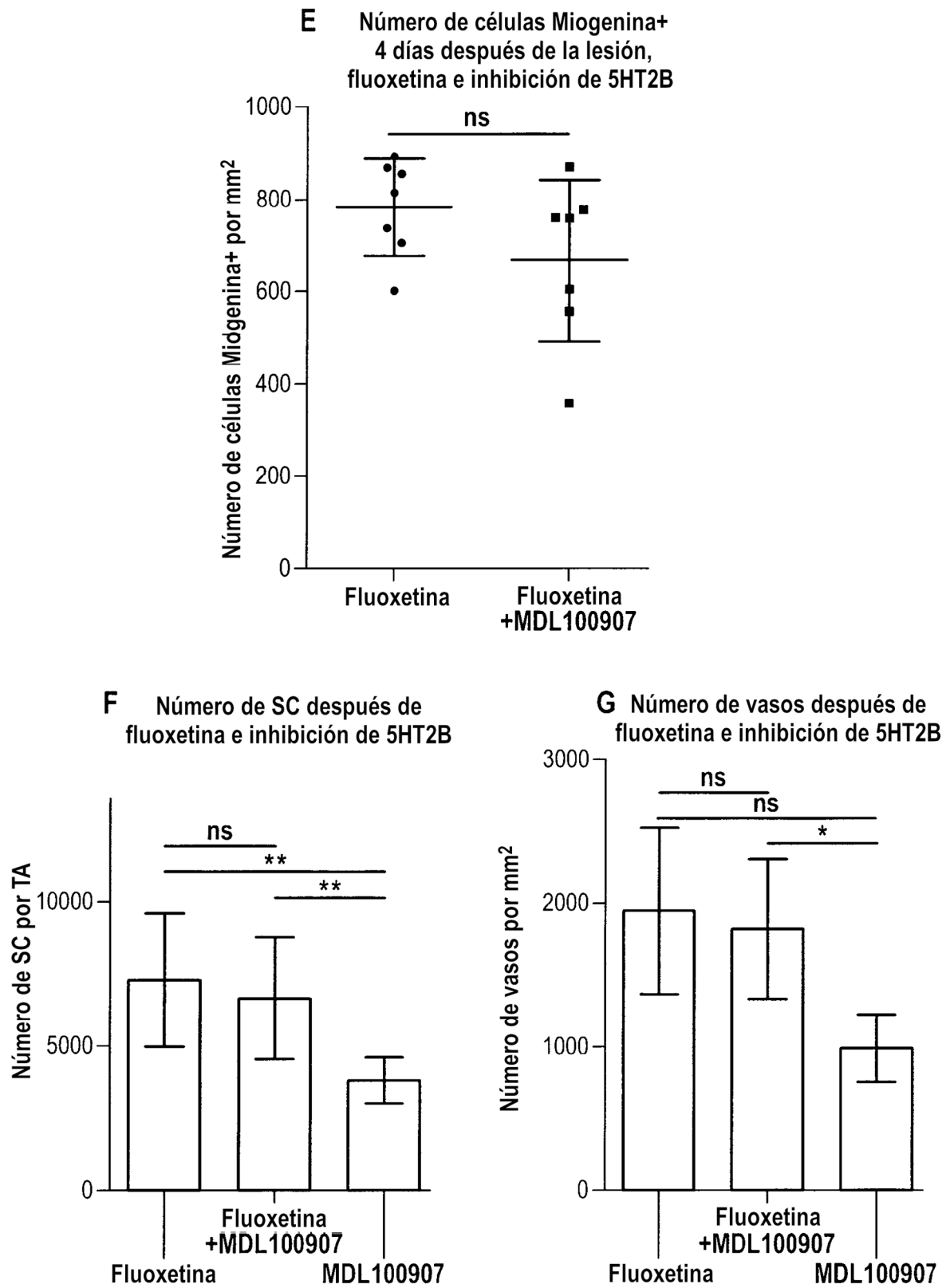


FIG. 7

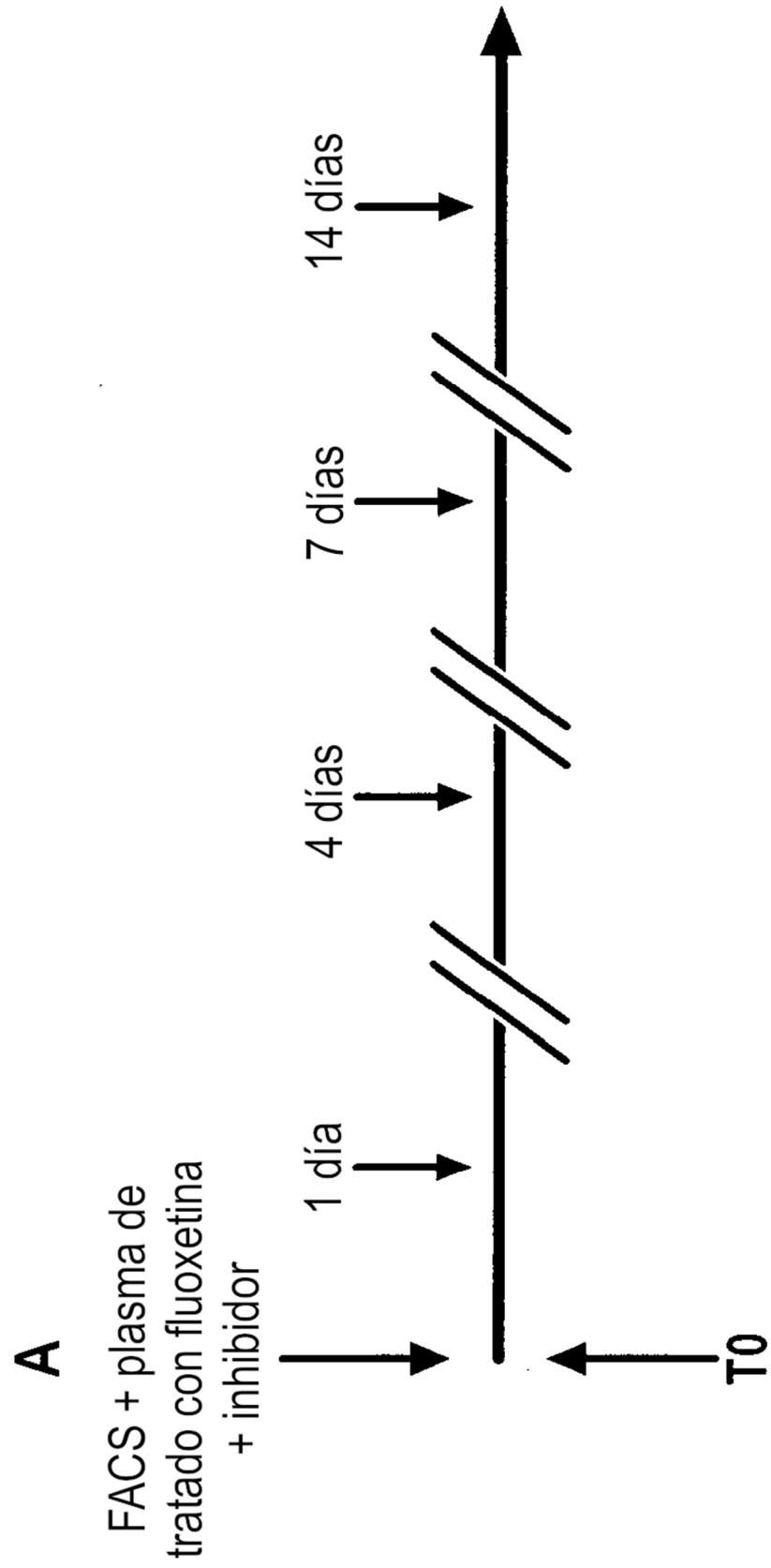


FIG. 7 (continuación)

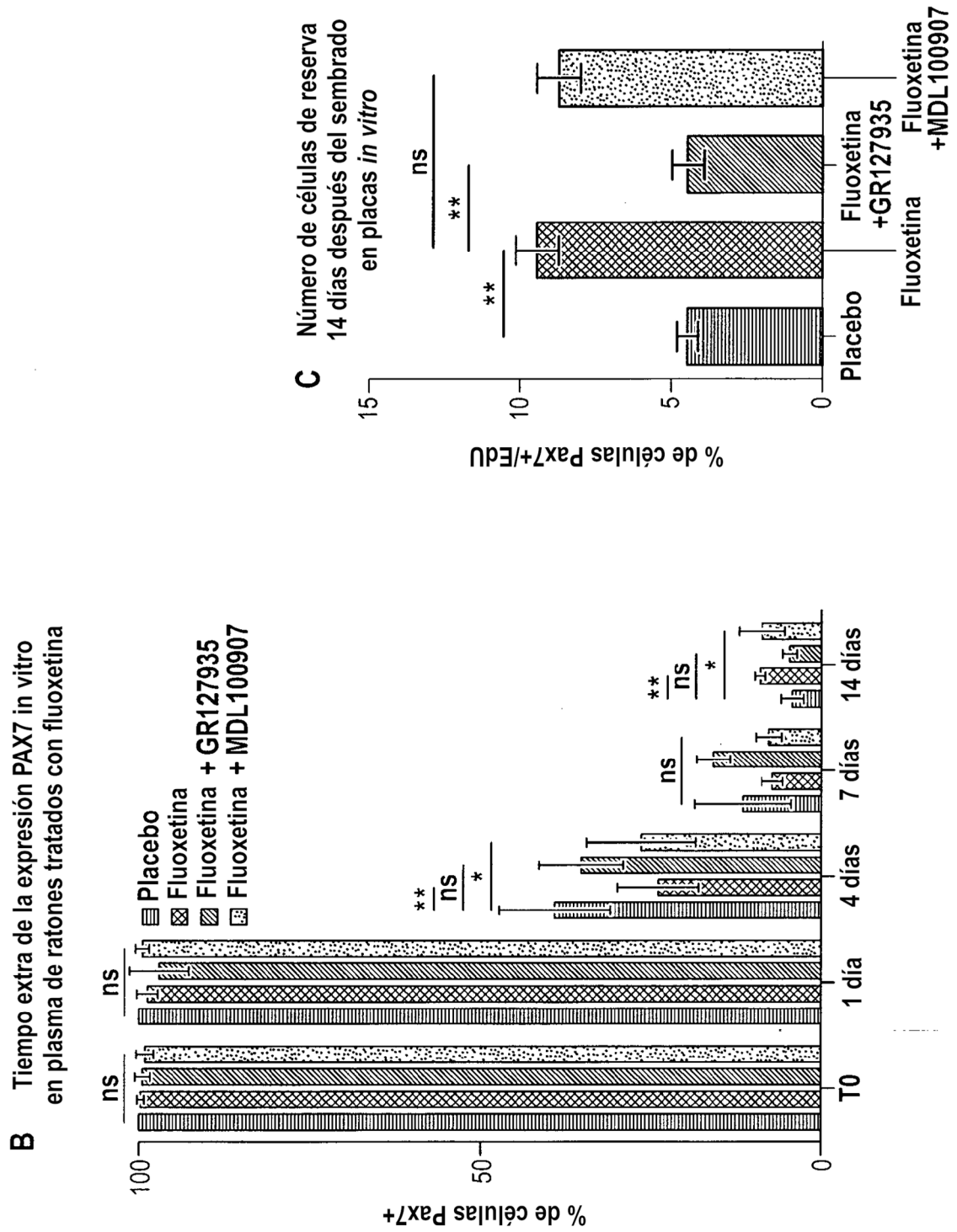


FIG. 7 (continuación)

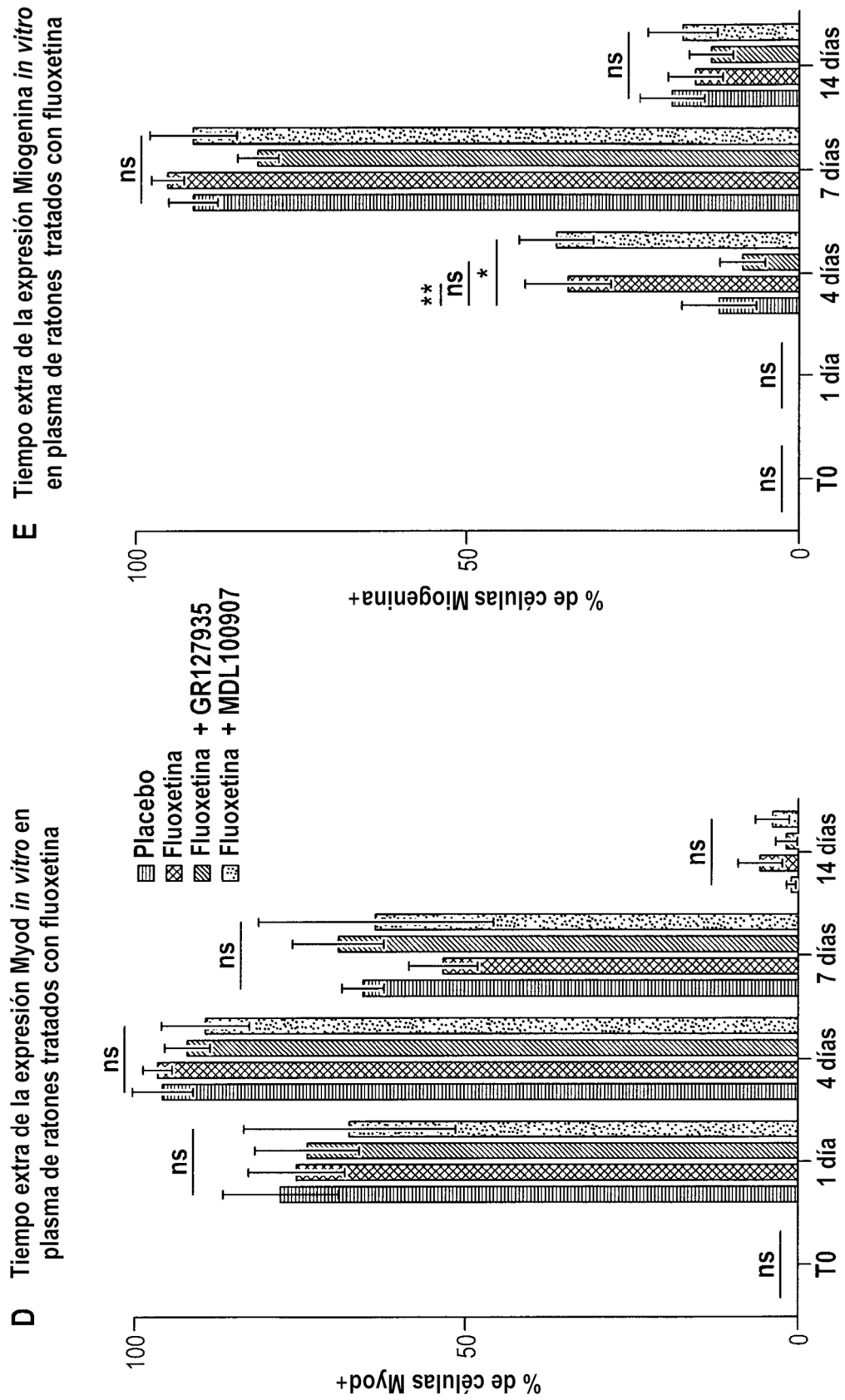


FIG. 7 (continuación)

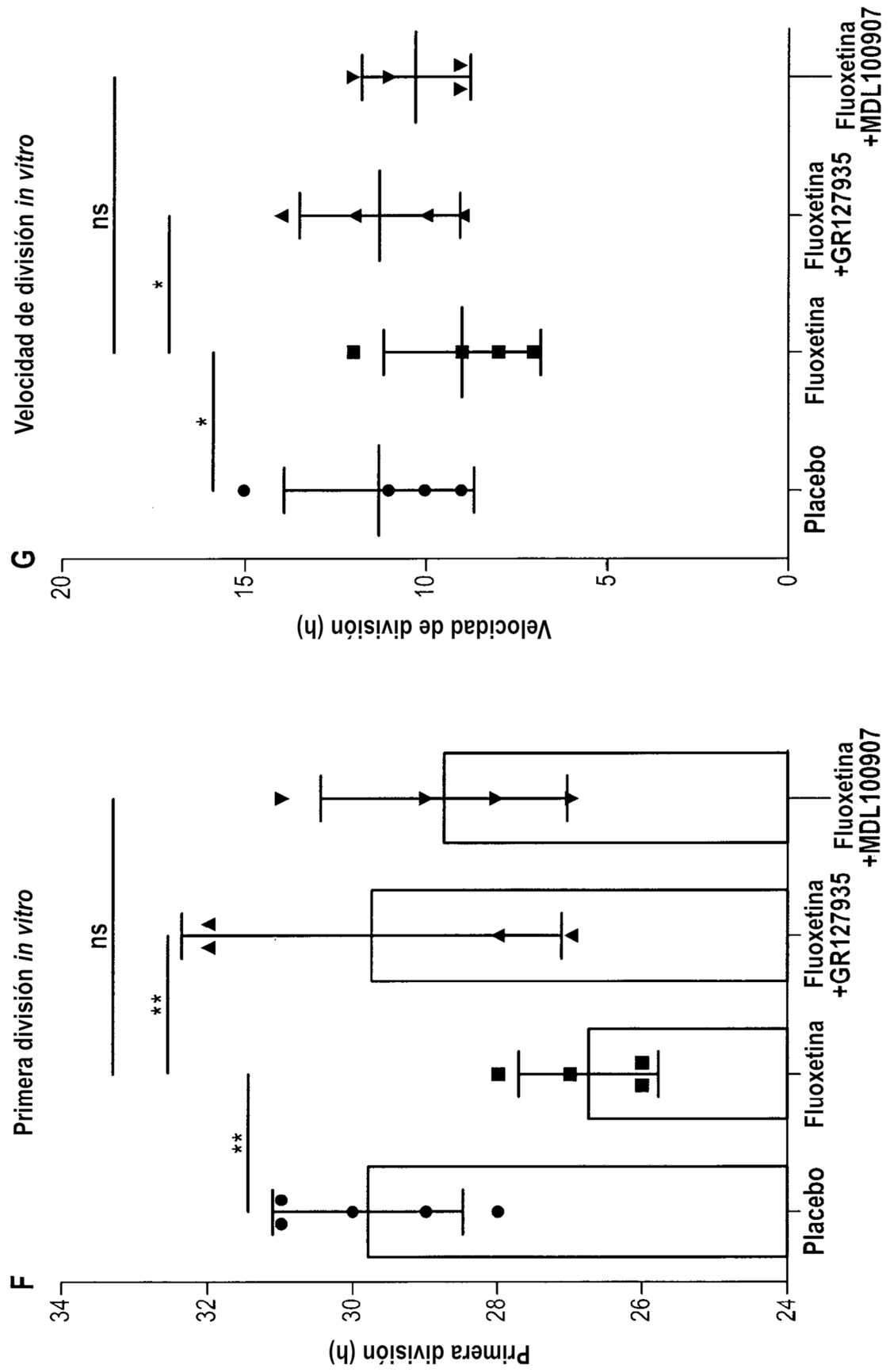


FIG. 7 (continuación)

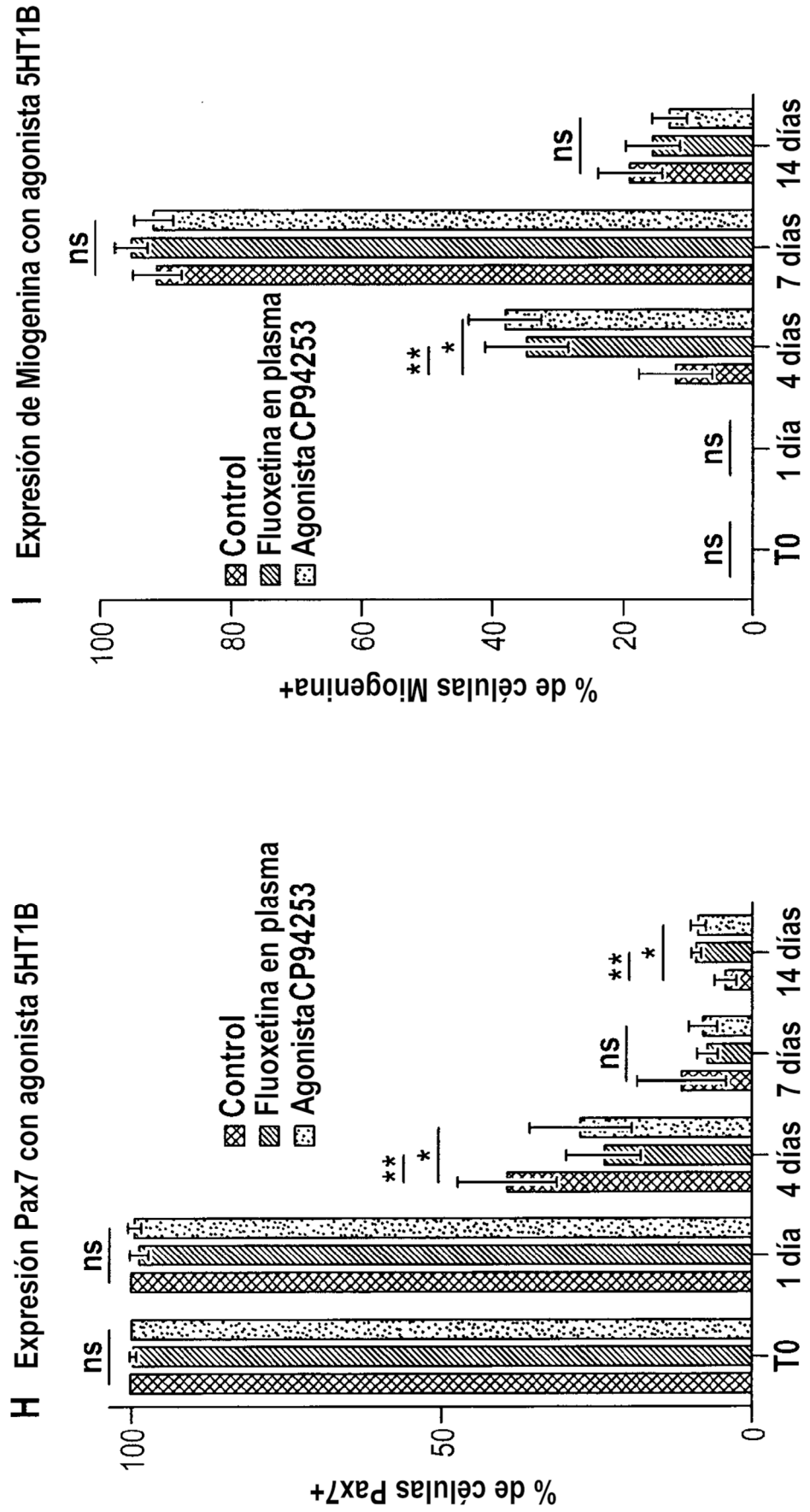
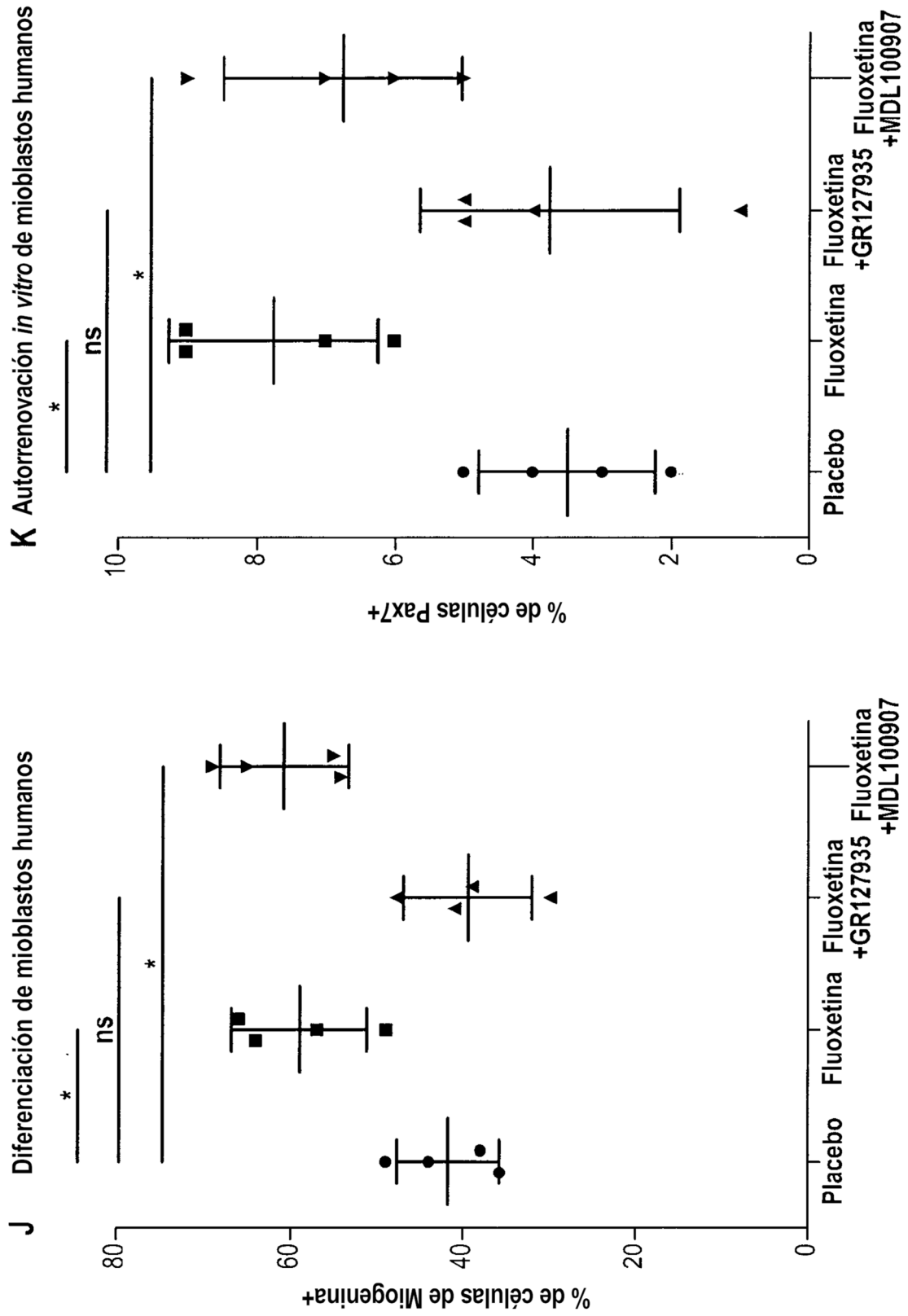


FIG. 7 (continuación)



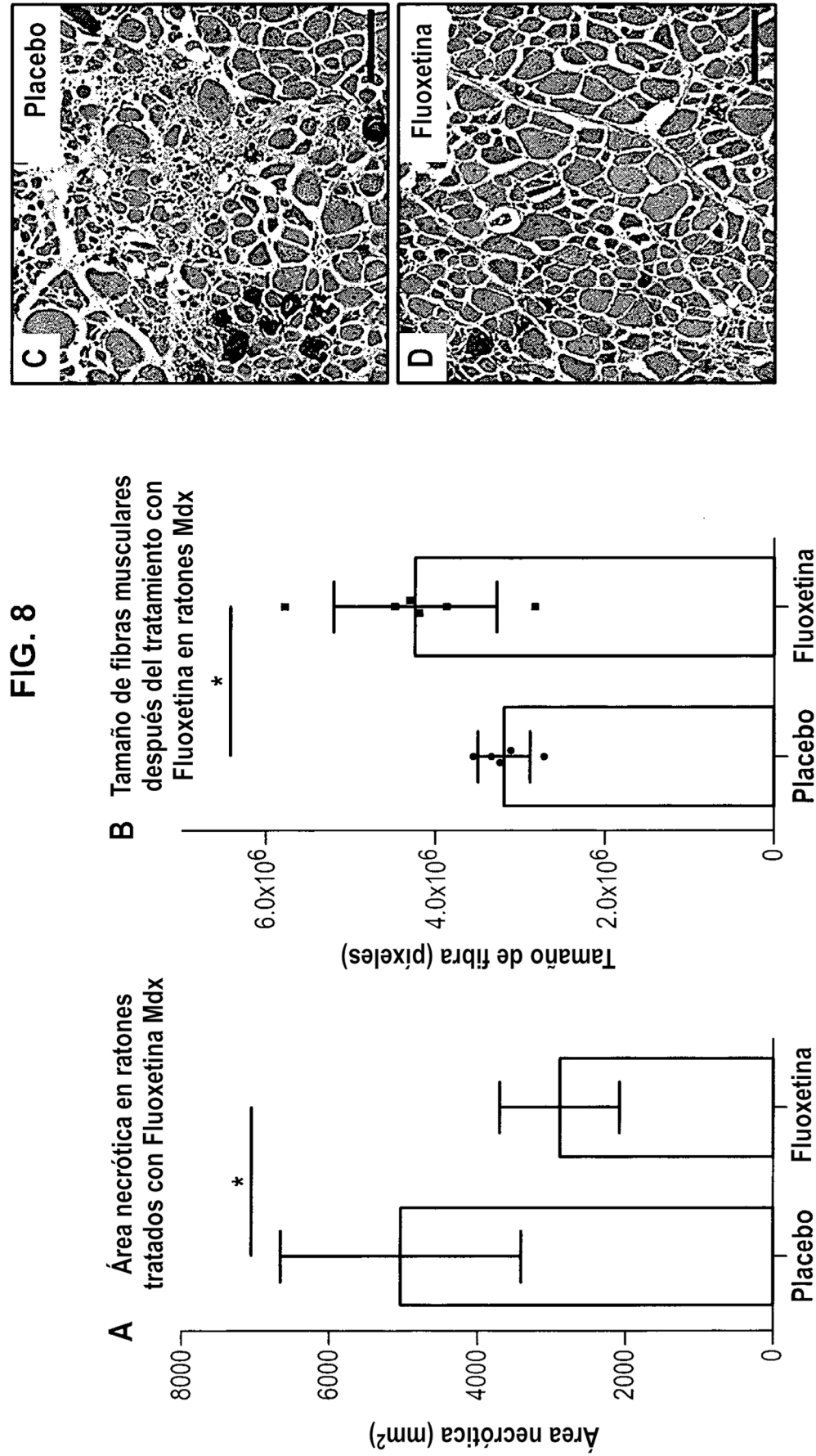


FIG. 8 (continuación)

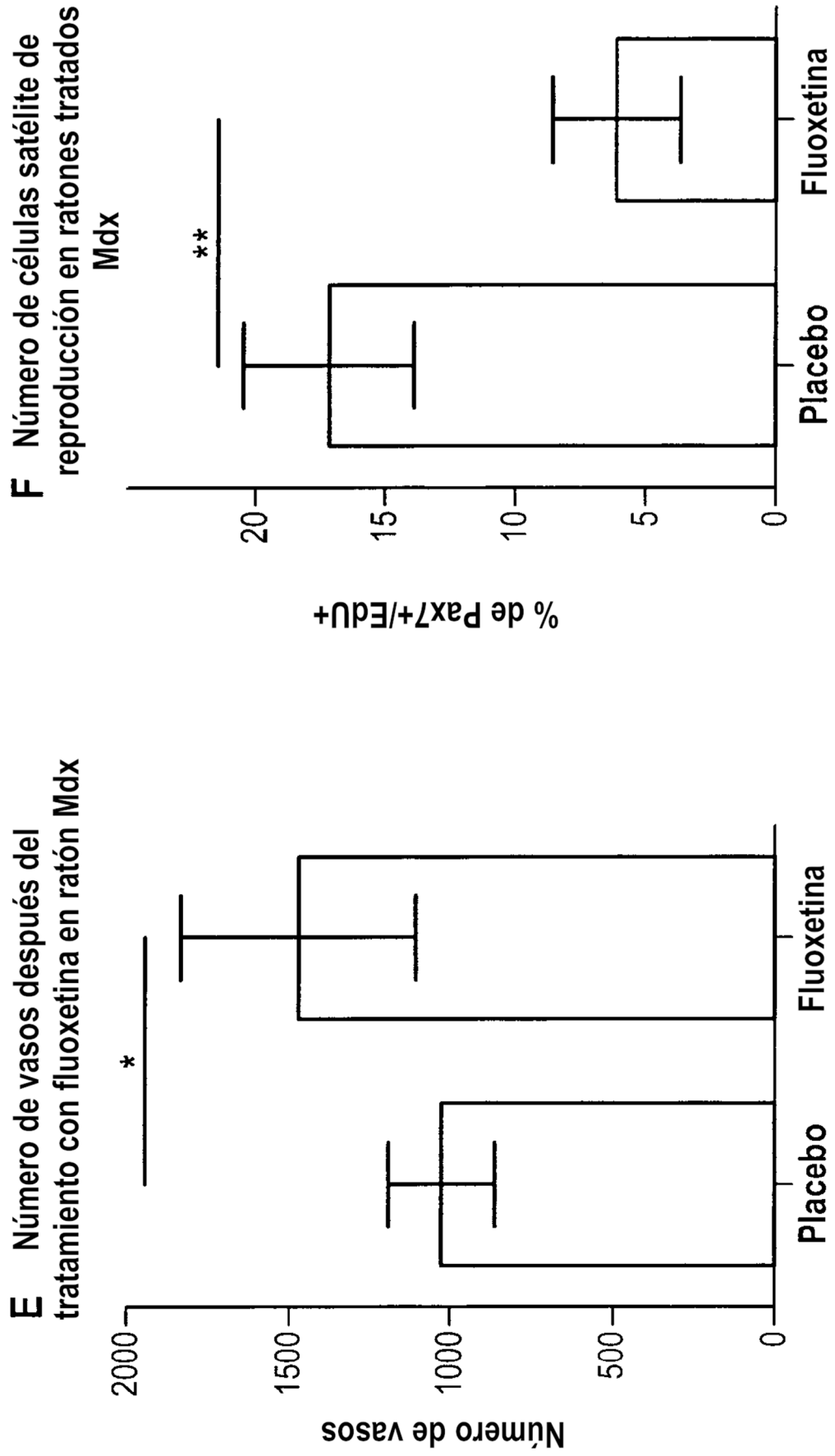


FIG. 8 (continuación)

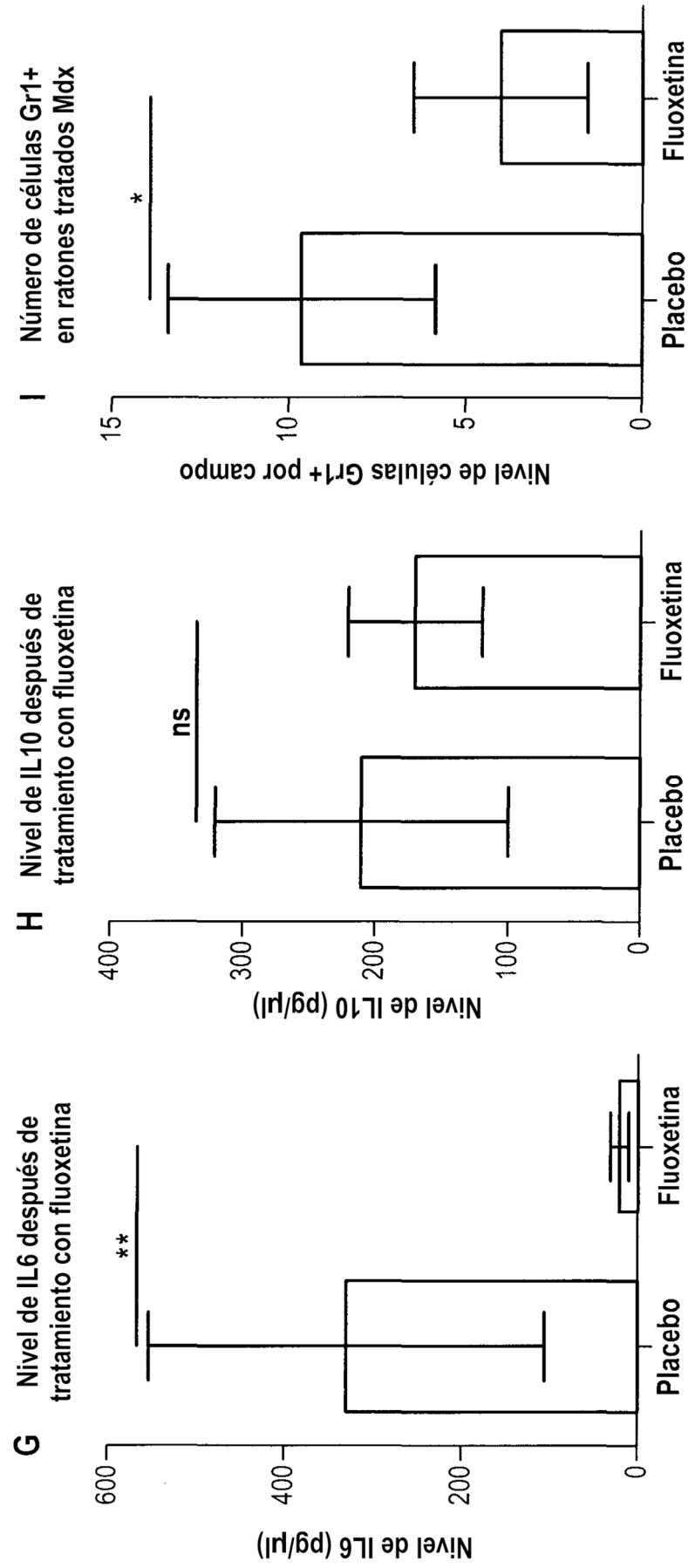


FIG. 9

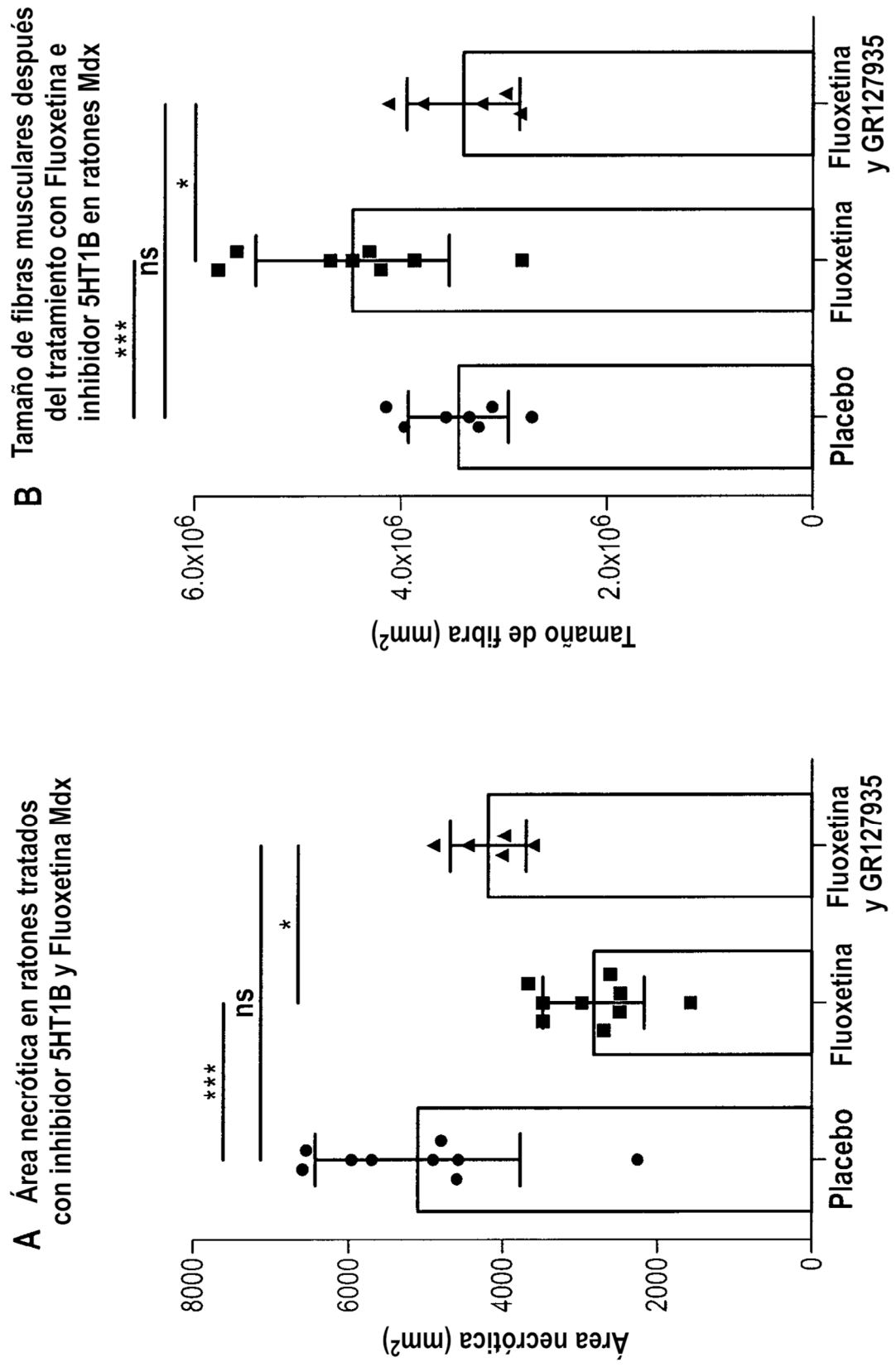


FIG. 9 (continuación)

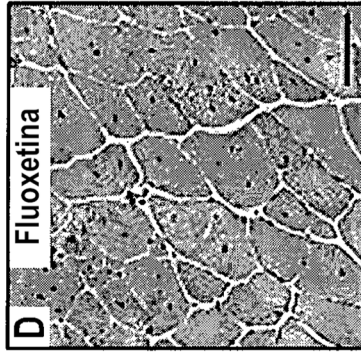
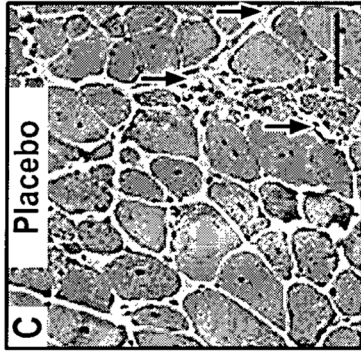
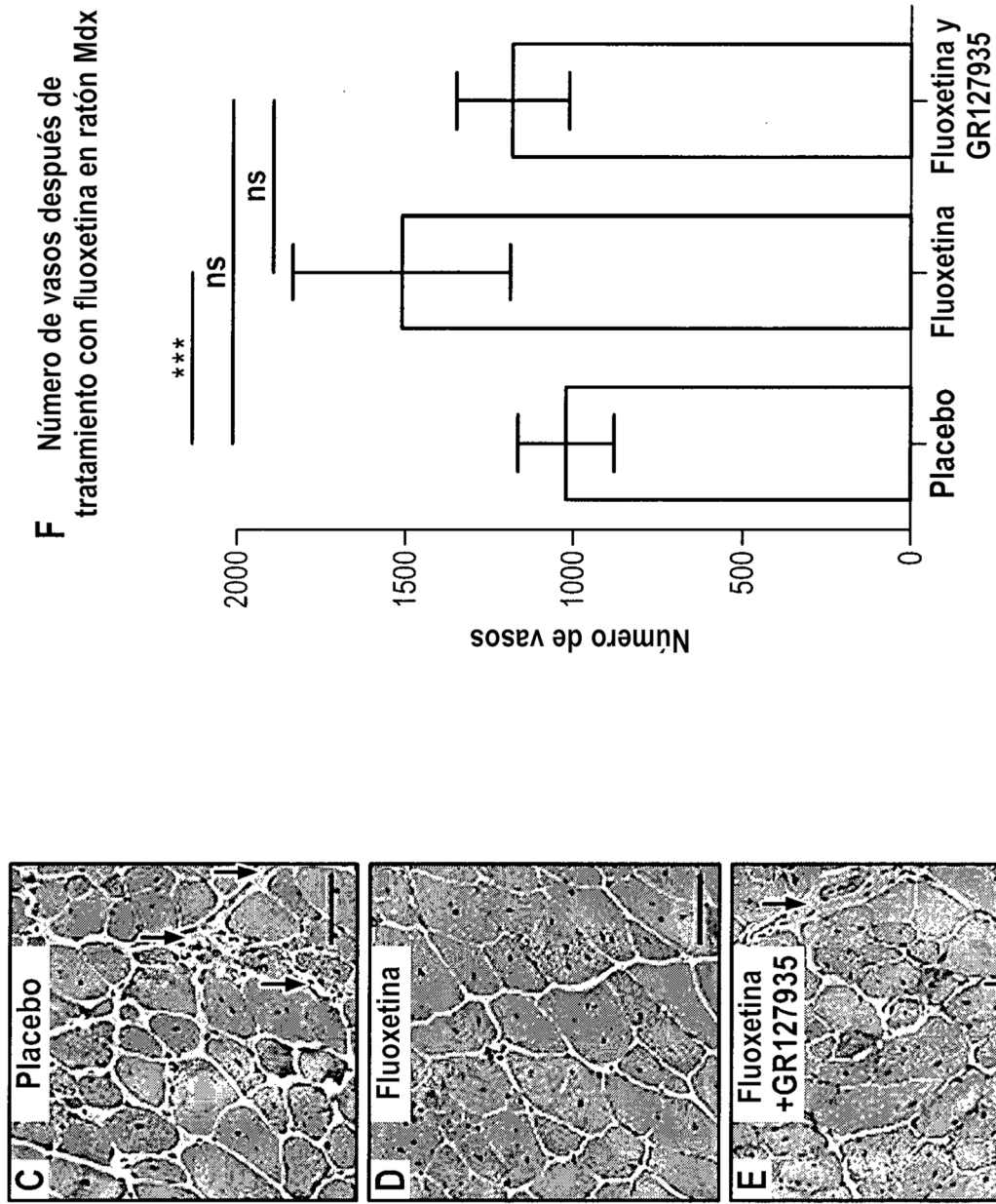


FIG. 9 (continuación)

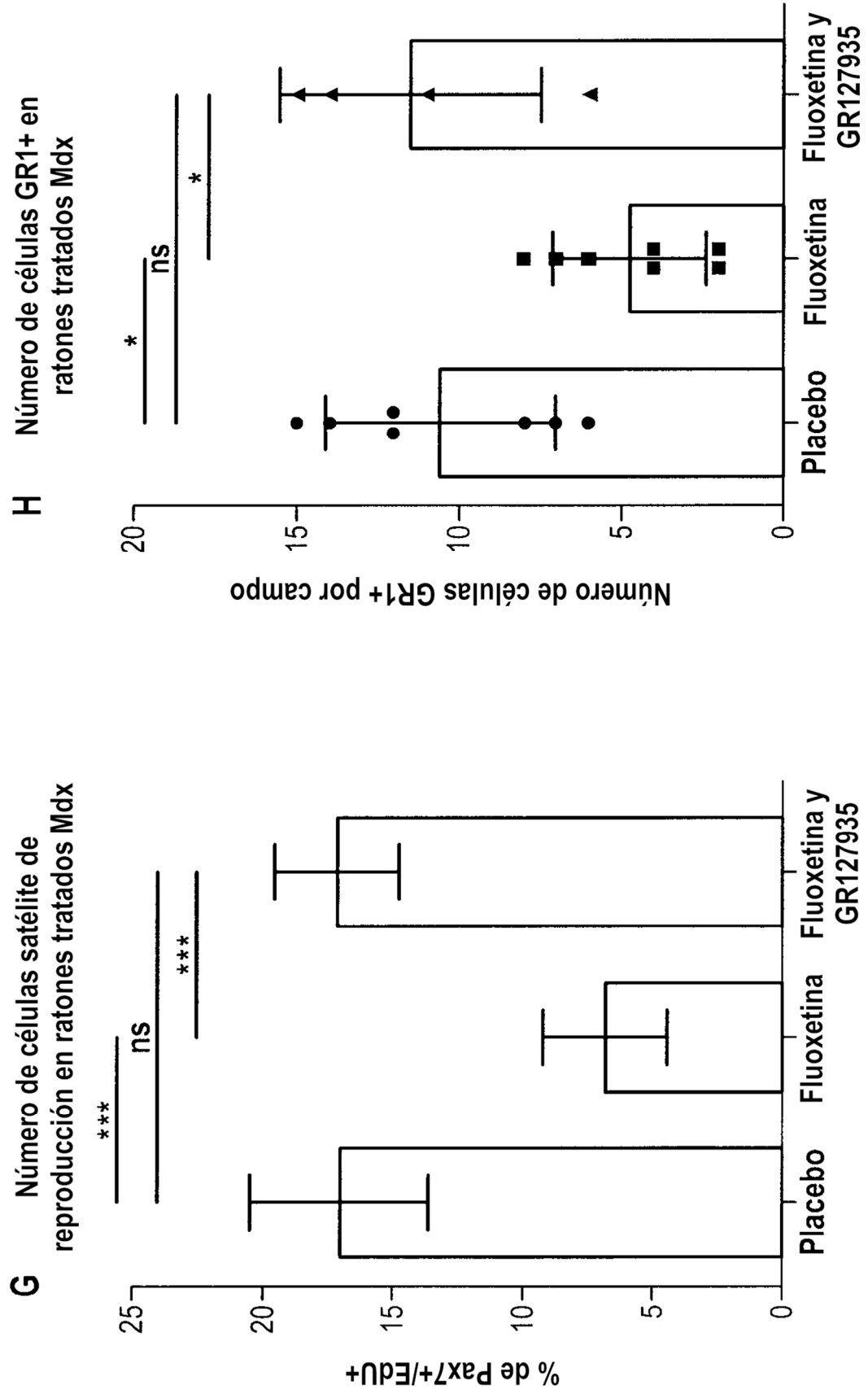


FIG. 9 (continuación)

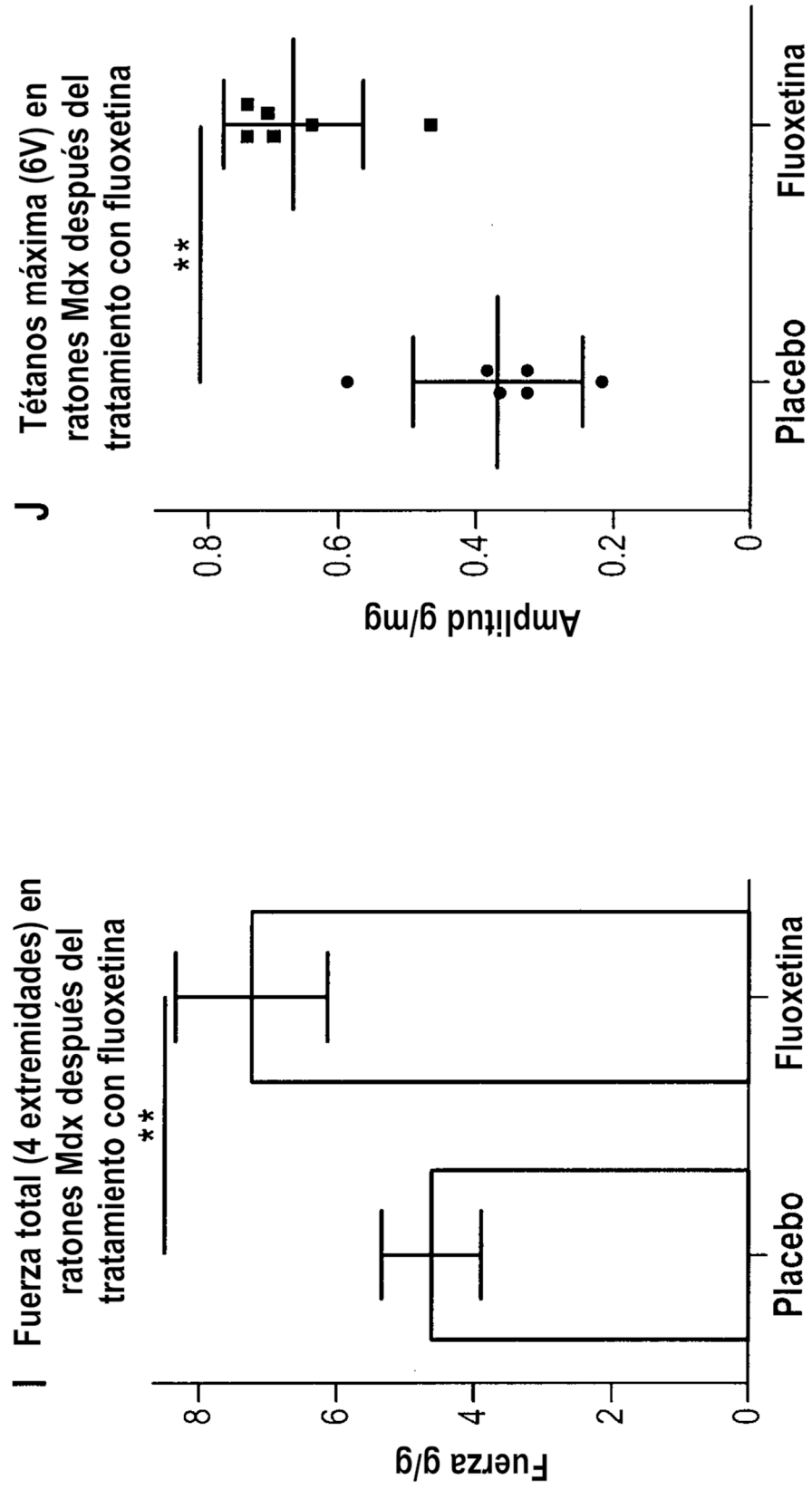


FIG. 9 (continuación)

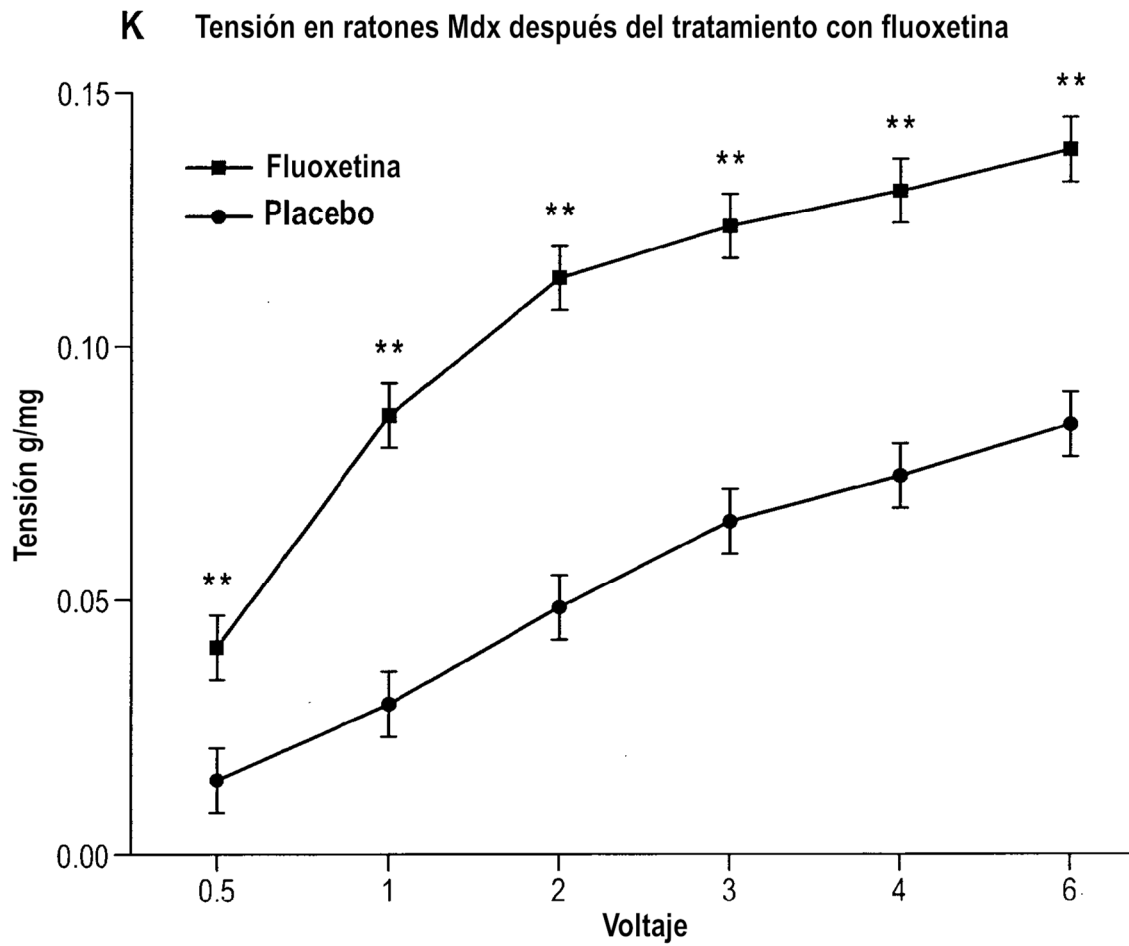


FIG. 10

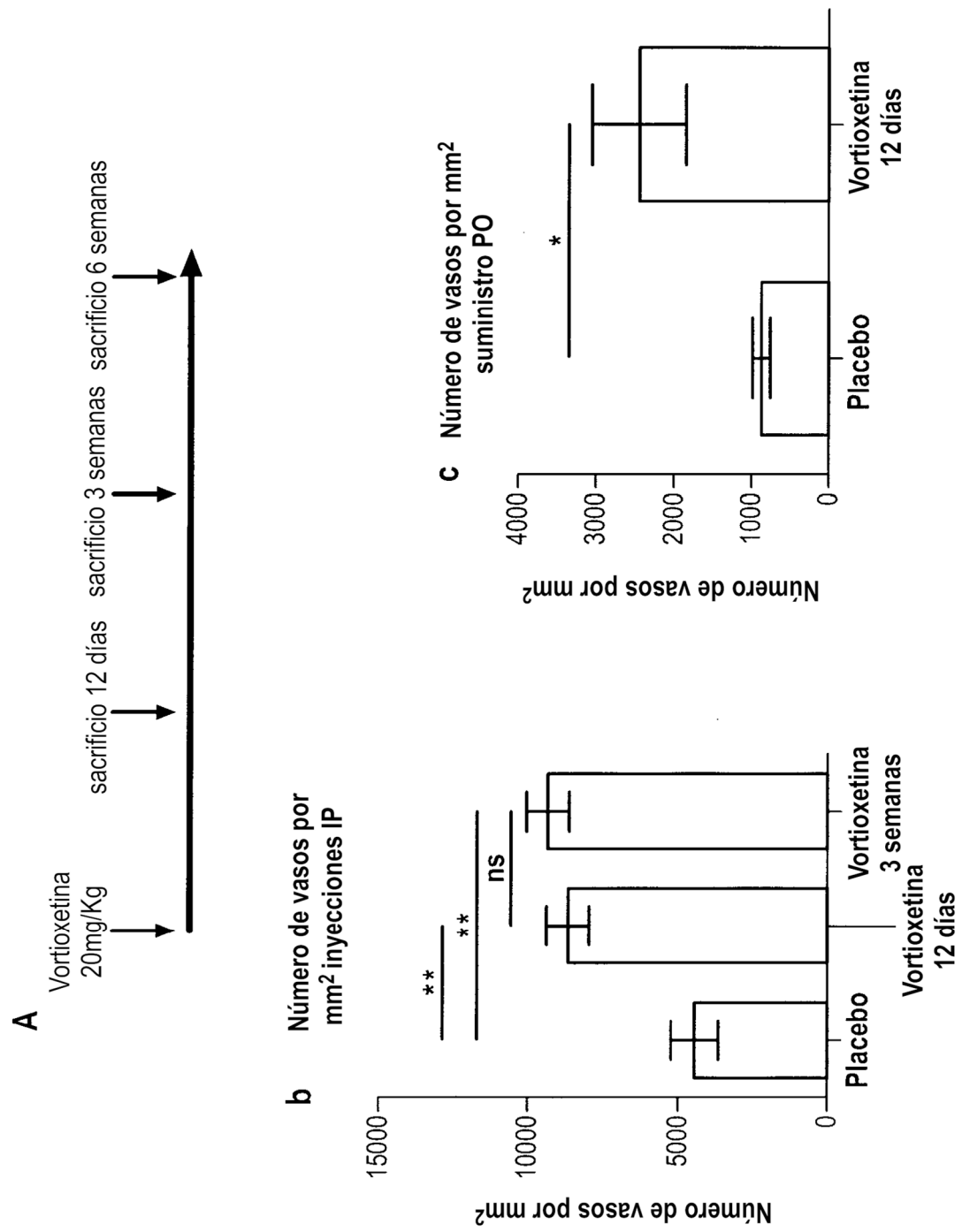


FIG. 10 (continuación)

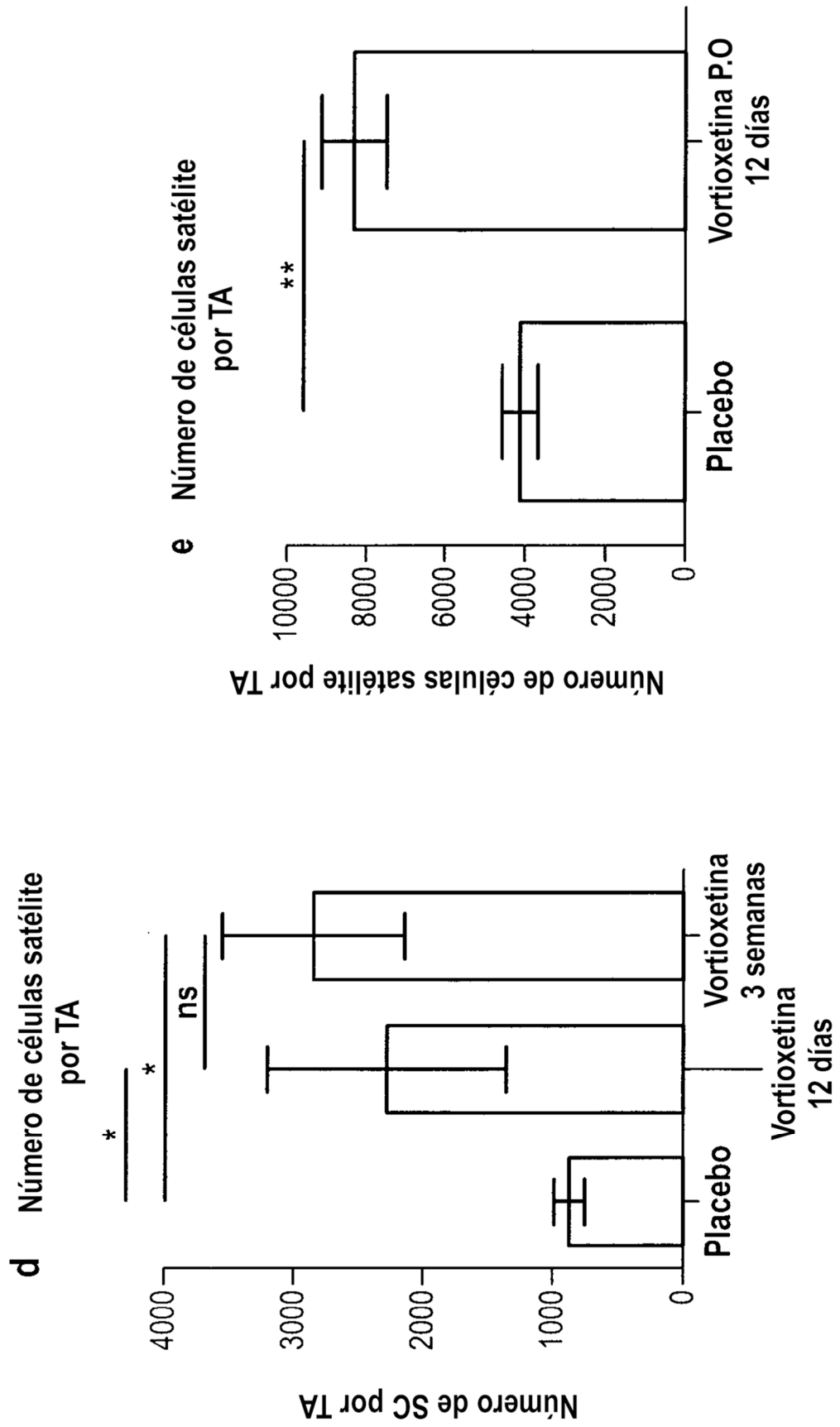


FIG. 11

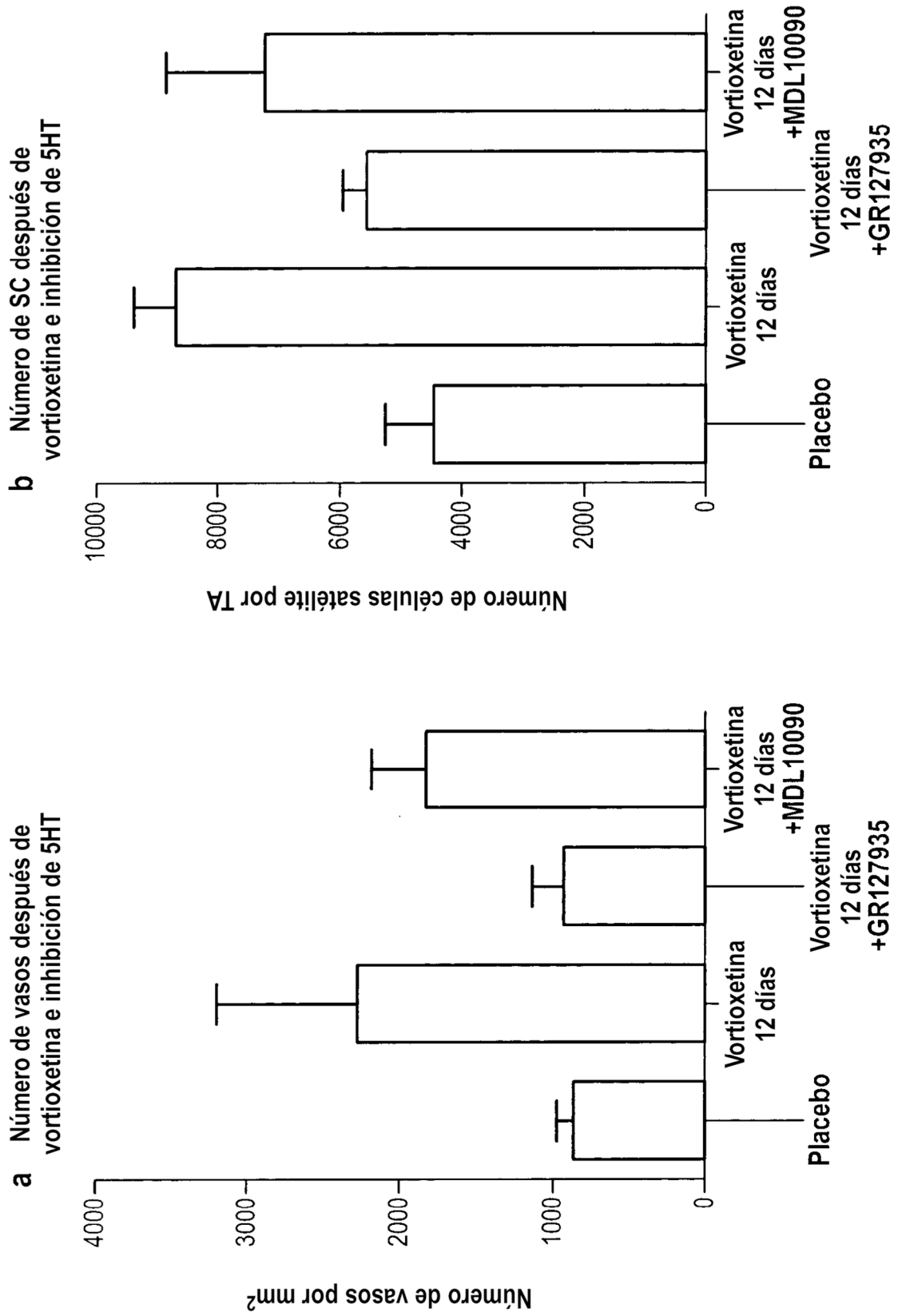


FIG. 11 (continuación)

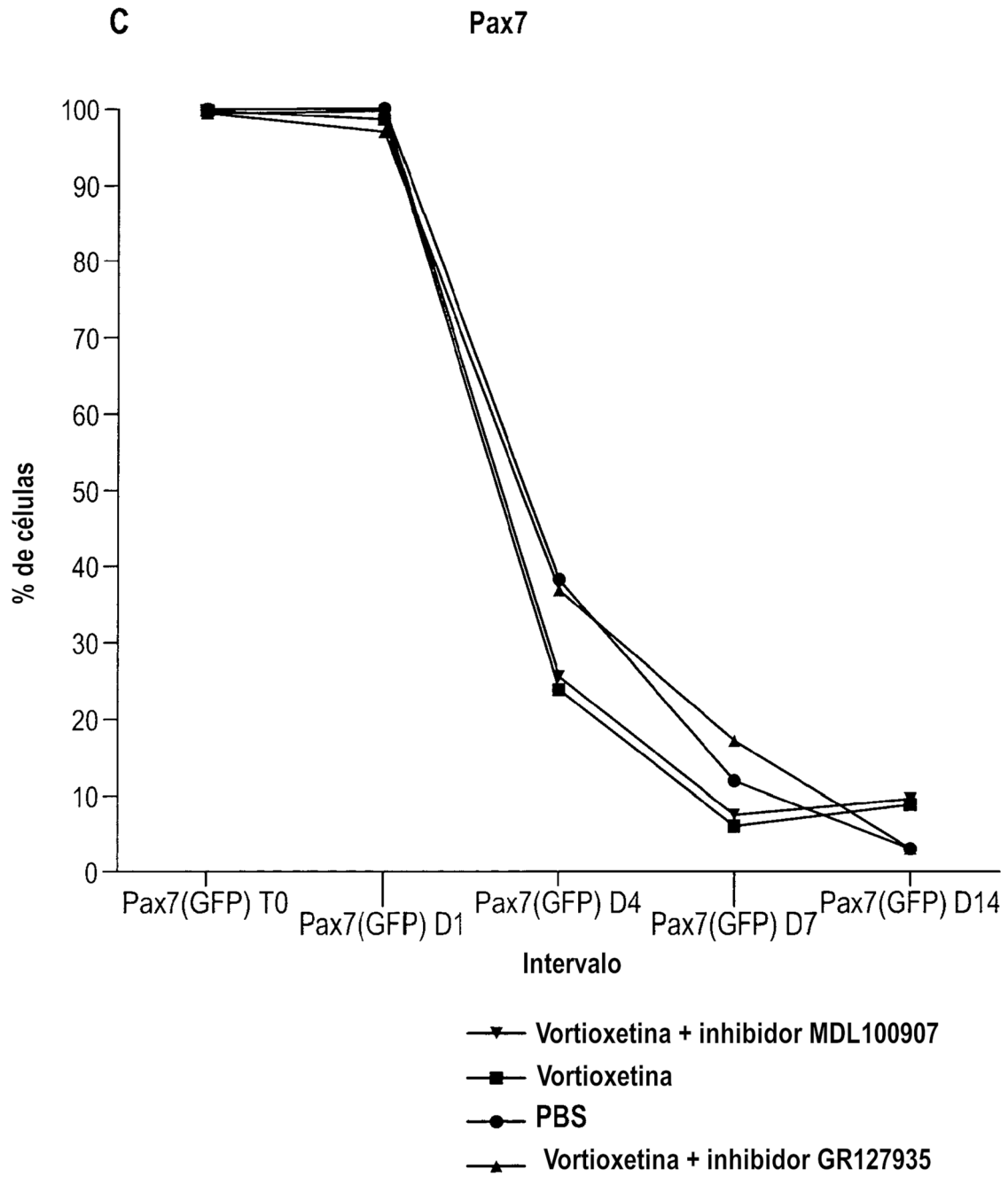


FIG. 11 (continuación)

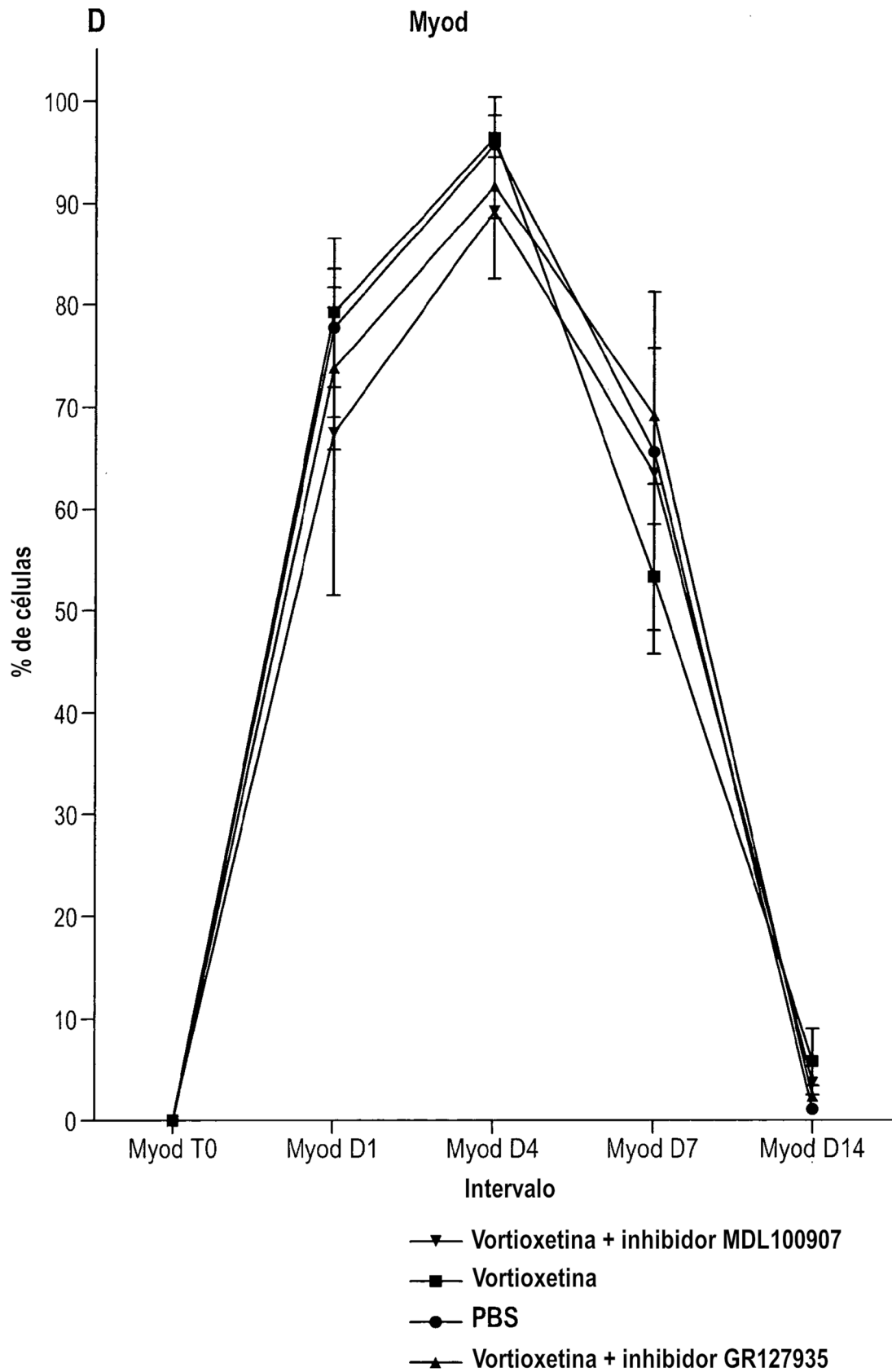


FIG. 11 (continuación)

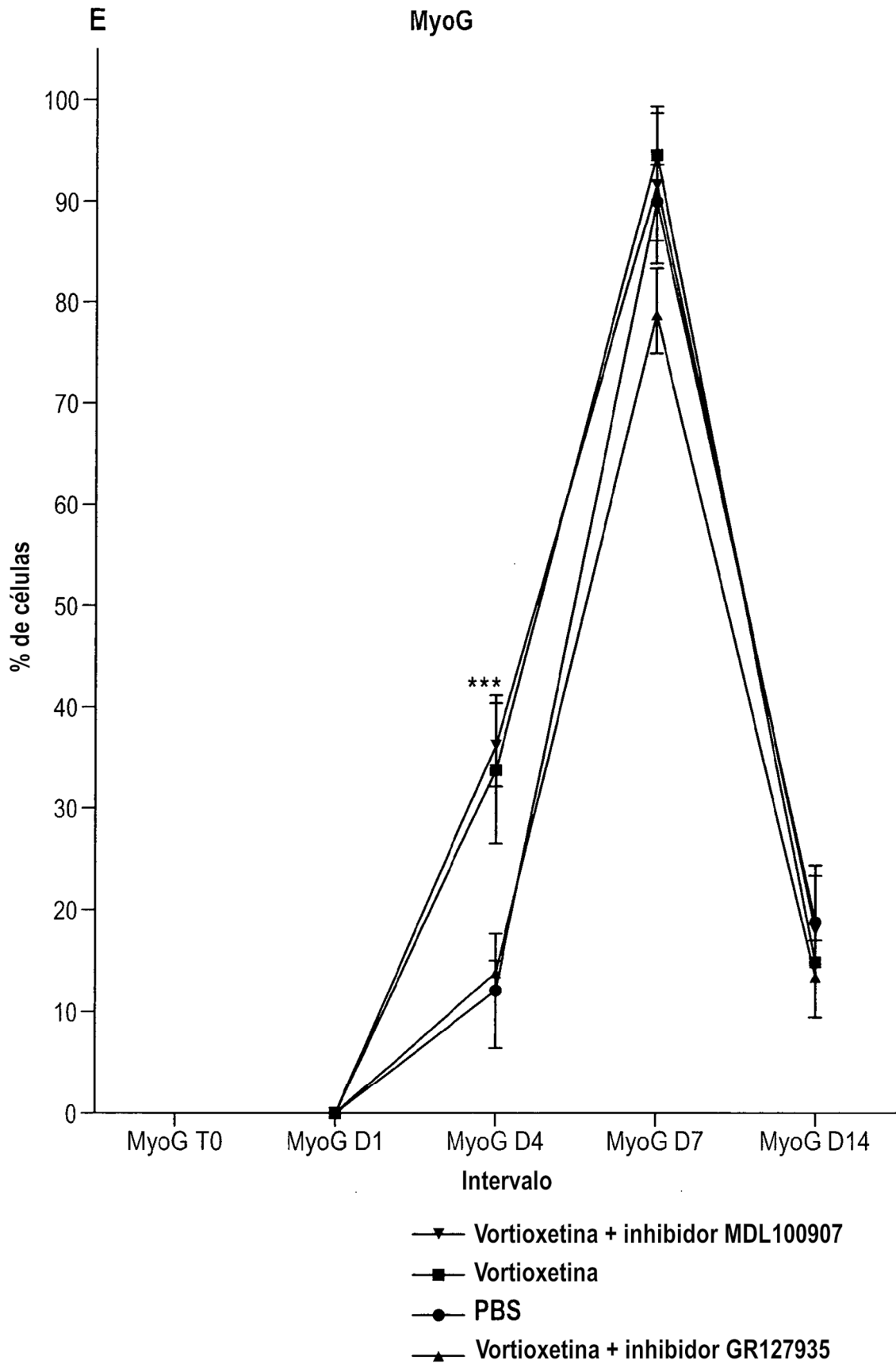


FIG. 12

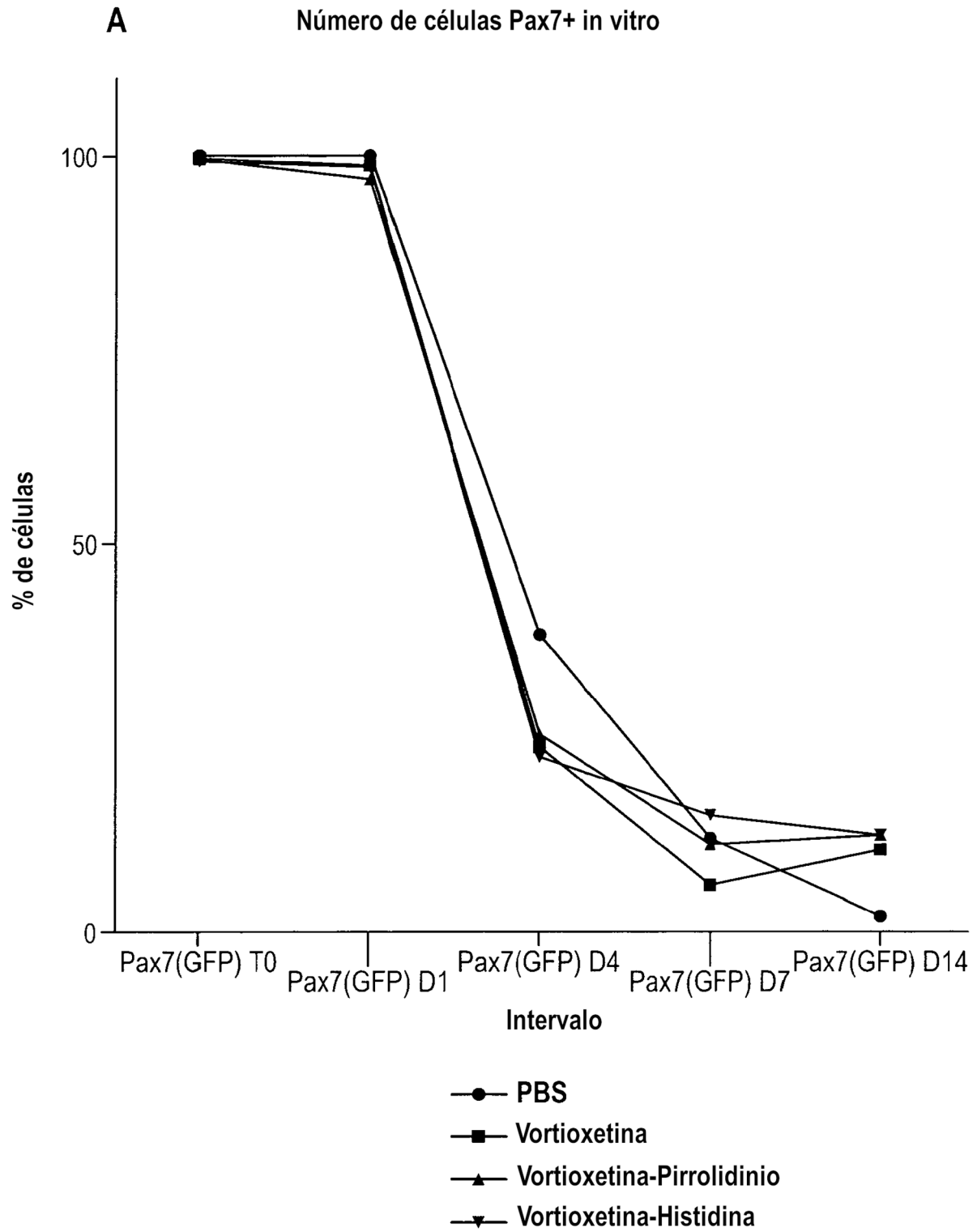


FIG. 12 (continuación)

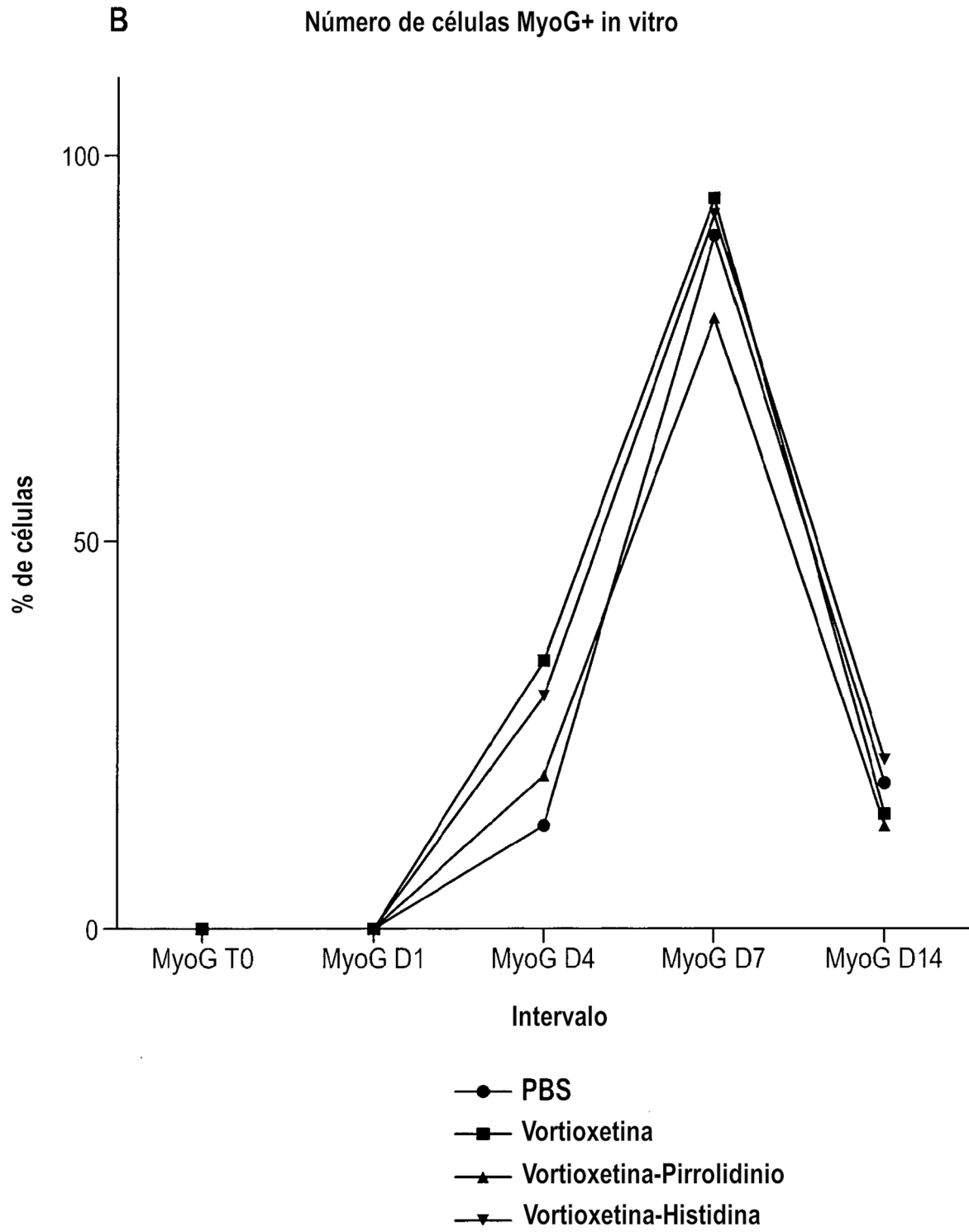


FIG. 12 (continuación)

