

## 2. Los canales de comunicación sensorial TRPs como dianas farmacológicas

ANTONIO FERRER MONTIEL

### RESUMEN

Los canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) constituyen una extensa familia subdividida en 8 subfamilias, a saber, TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, la familia TRPN presente en invertebrados, y la distante TRPY expresada en levaduras. Estos receptores juegan un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la termosensación, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, la nocicepción y el dolor. Cada vez es más claro que los canales TRP son cardinales en la fisiología sensorial y que su alteración funcional, bien mediante mutaciones o por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios, conduce a estados patológicos en humanos. Por tanto, los canales TRP han sido validados como dianas terapéuticas para intervención farmacológica. El desarrollo de compuestos que reviertan o controlen su actividad patológica es, por tanto, un objetivo fundamental de la neurofarmacología.

**Palabras clave:** Canales iónicos. Nocicepción. Neurobiología sensorial. Sinpatogénesis. Termosensación.

### ABSTRACT

#### **TRP channels of sensory communication as pharmacological targets**

TRP channels (Transient Receptor Potential) encompass a large family which is subclassified in 8 distinct subfamilies, namely TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, the TRPN subfamily found in invertebrates and the dis-

tant TRPY subfamily present in yeast. These receptors play a pivotal role in the transduction of the different somatosensory modalities in mammals, including thermosensation, pheromone reception, regulation of the vascular tone, nociception and pain. Cumulative evidence is substantiating the tenet that these channels are central in sensorial physiology and that their dysfunction, either because of mutation or by their interaction with noxious stimuli and pro-inflammatory agents, results in human pathologies. Thus, these TRP channels are being validated as therapeutic targets for drug intervention. The development of compounds that reverse or abrogate their pathological activity is, therefore, a central goal of current neuropharmacology.

**Keywords:** Ion channels. Nociception. Sensory neurobiology. Synaptogenesis. Thermosensation.

## INTRODUCCIÓN

La capacidad de explorar el entorno mediante los sentidos supone una clara ventaja evolutiva que permite una adaptación idónea salvaguardando la integridad del organismo. Esta habilidad es el resultado de un sistema nervioso altamente especializado, capaz de reconocer, integrar, interpretar y responder a las distintas modalidades sensoriales. El sistema nervioso periférico (SNP) está constituido por fibras nerviosas que transducen la información sensorial en actividad eléctrica que es transmitida desde las terminales periféricas al cerebro. La comunicación desde la periferia al cerebro es realizada por fibras nerviosas que reciben el nombre de aferentes, mientras que la respuesta desde el sistema nervioso central al periférico es conducida por fibras eferentes (1). Las fibras aferentes constituidas por neuronas de conducción rápida, altamente mielinizadas, se ocupan, principalmente, de transducir fenómenos propioceptivos y mecánicos; mientras que, las fibras formadas por neuronas de conducción media y lenta son responsables de interpretar y responder a estímulos potencialmente nocivos actuando, por tanto, como nociceptores (1). Las neuronas nociceptivas reconocen estímulos mecánicos, térmicos y químicos que pueden ser dañinos para el organismo. Por ello, los nociceptores son considerados como guardianes de la integridad tisular y la nocicepción como un mecanismo de seguridad esencial para la vida.

A nivel molecular, los nociceptores poseen en sus terminales un conjunto de receptores proteicos preparados para reconocer y transducir los estímulos nocivos de tipo físico (mecánicos, osmóticos, y térmicos) y químicos. En este sentido, disponemos de los receptores capaces de reconocer el espectro de temperaturas desde muy frías ( $\leq 17^{\circ}\text{C}$ ) a muy calientes ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ) (1-7). Una propiedad

similar es esperable en los mecanorreceptores, aunque su identidad molecular es todavía ignota. No obstante, a pesar de esta propiedad esencial de los termorreceptores y, probablemente de los mecanorreceptores, es importante señalar que la transducción nociceptiva por parte de los nociceptores es el balance de la activación e inhibición de más de un receptor y/o canal proteico presente en su membrana (1). Por ello, intentar reducir la especificidad nociceptora a la presencia de un determinado sensor molecular es, cuando menos, una simplificación excesiva de la transducción somatosensorial (1).

## LA FAMILIA DE LOS CANALES TRP

La neurobiología sensorial ha sufrido un notable avance desde el reconocimiento que la familia de receptores TRP (por Transient Receptor Potential;), originalmente descubierta en *Drosophila melanogaster* (2), juega un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la termosensación, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, nocicepción y el dolor. Los canales TRP se expresan en una gran variedad de organismos multicelulares que comprende las levaduras, los gusanos, la mosca de la fruta, el pez cebra, y los mamíferos. Sorprendentemente, todavía no se han descrito ortólogos en los procariotas. Desde su descubrimiento, la familia de receptores TRP ha ido creciendo estando en la actualidad formada por 28 miembros agrupados en 7 subfamilias (TRPC1-7, TRPM1-8, TRPV1-6, TRPA1, TRPP1-3, y TRPML1-3) y, la subfamilia TRPN presente únicamente en invertebrados (Figura 1) (2). Existe un familia adicional (TRPY) evolutivamente más distanciada de las anteriores y que se expresa en levaduras (2). La diversidad de la familia es incrementada por el descubrimiento de nuevas isoformas que aparecen por procesamiento posttranscripcional (2). Estas variantes normalmente poseen una función moduladora de la actividad de las proteínas silvestres.

Todos los receptores TRP son canales catiónicos que permiten el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , aunque según la isoforma, la permeabilidad y la selectividad para cationes mono o divalentes varía sustancialmente de 100:1 a 0.05:1. Su patrón de distribución tisular es muy amplio, apareciendo expresado en prácticamente todos los tejidos, especialmente en los sistemas nerviosos central y periférico, en los que juegan un papel crucial en la transducción sensorial convirtiendo los estímulos ambientales en cambios de excitabilidad de la membrana neuronal (2). Además, su permeabilidad al catión  $\text{Ca}^{2+}$  implica la activación de señales de transducción celular que también contribuyen a la transmisión sensorial. Estudios de asociación genética han relacionado mutaciones en estos receptores con

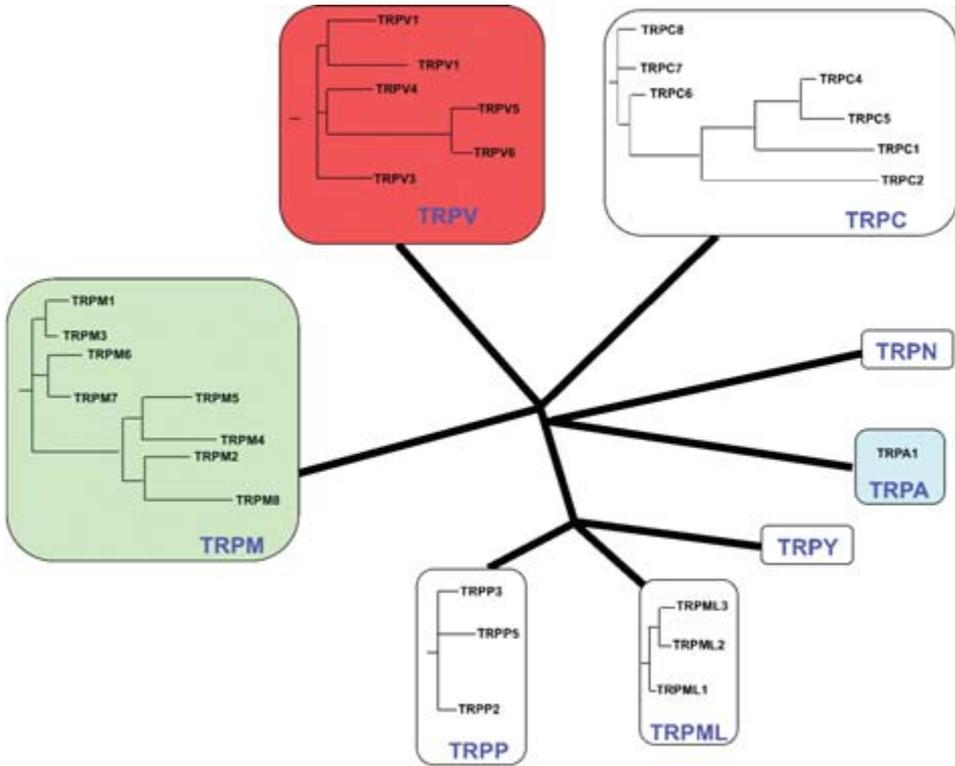


FIGURA 1. *Árbol filogenético de la familia de receptores TRP. Se muestran las subfamilias de los canales TRP, con cada uno de los miembros identificados en mamíferos. De las familias TRPN y TRPY no existen todavía miembros en mamíferos. Modificada de la referencia (20).*

enfermedades humanas (Tabla I). Así, mutaciones en la familia TRPP produce la enfermedad autosómica dominante conocida como policistitis renal, la mutación de TRPML conduce a la mucopolidosis tipo IV, la alteración de TRPC6 produce glomeruloesclerosis segmental, una condición autosómica dominante, y la mutación de TRPM6 causa hipomagnesemia e hipocalcemia (2, 4).

Estructuralmente, los canales TRP son homo o heterooligómeros formados por la asociación de cuatro subunidades alrededor de un eje de simetría central que coincide con el poro iónico. Cada subunidad está formada por 6 segmentos transmembrana (S1-S6), un lazo hidrofílico entre el quinto y sexto segmento transmembrana que estructura el poro iónico y dos dominios intracelulares en los extremos N- y C-terminales (2) (Figura 2). La región N-terminal puede contener dominios de unión a anquirinas que juegan un papel clave en la interac-

ción de estos receptores con proteínas citosólicas construyendo complejos proteicos esenciales para su función (2, 8, 9). El dominio C-terminal contiene una región importante para la asociación de las subunidades y zonas de interacción con fosfoinosítidos y proteínas reguladoras (2, 8). Algunos miembros de la familia TRPM tienen la singularidad de contener actividad enzimática en su extremo C-terminal por lo que reciben el nombre de canalzimas (2).

TABLA I. *Enfermedades asociadas a canales TRPs*

<i>Canal</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Síntomas</i>
TRPC3	Degeneración retiniana	Muerte fotorreceptores
TRPC6	Glomeruloesclerosis focal y segmental	Pérdida renal
TRPM2	Estrés oxidativo y neurodegeneración	Neurodegeneración
TRPM6	Hipomagnesemia con hipocalcemia	Pérdida renal secundaria
TRPM7	Estrés oxidativo y neurodegeneración	Neurodegeneración
TRPP2/TRPP1	Policistitis renal autosómica dominante	Fallo renal, quistes renales
TRPML1	Mucopolipidosis tipo IV	Retraso mental, neurodegeneración, degeneración retiniana
TRPV1	Dolor inflamatorio y neuropático	Inflamación y dolor

Información tomada de referencias (2) y (4).

## LAS SUBFAMILIAS TRPV, TRPM Y TRPA EN TERMOSENSACIÓN

Dentro de la familia de los canales TRP destacan las subfamilias de TRPV, TRPM y TRPA1 por ser receptores ionotrópicos que responden a estímulos térmicos que comprenden desde temperaturas nocivas frías a calientes (Tabla II). El primer grupo (TRPV) contiene los llamados termo-TRPs que se activan por calor, transformando la energía térmica en excitabilidad neuronal. La familia TRPV en mamíferos está formada por 6 miembros divididos en 2 grupos según el grado de homología, a saber, TRPV1-4 y TRPV5-6. Los receptores que reconocen estímulos térmicos son TRPV1-4, y entre ellos destaca el receptor TRPV1 por ser un sensor molecular del umbral de temperaturas nocivas para el organismo (10). Aunque ya se sospechaba de su existencia desde hacía mucho tiempo debido a la observación de que las neuronas sensoriales eran excitadas por la capsaicina, un vanilloide presente en los chiles, su clonación no se produjo hasta el año 1997 por el grupo del Prof. David Julius de la Universidad de

California en San Francisco (10). Utilizando una estrategia de expresión-clonación en células HEK293 este equipo identificó la proteína de membrana que respondía a la capsaicina incrementando el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. La racionalidad de utilizar la capsaicina como ligando específico del receptor TRPV1 (originalmente llamado VR1) fue la sensación de quemadura que se siente tanto al ingerir una comida picante como con la aplicación tópica del vanilloide (3, 6, 7, 10). Por tanto, no resultó sorprendente que el receptor clonado también era activable por calor de intensidad quemante, concretamente con temperaturas que sobrepasan los  $42^{\circ}\text{C}$ , convirtiéndolo en una especie de termómetro molecular. Además, este receptor es activado por pH ácido extracelular y, recientemente se ha descrito su respuesta a alicina, componente activo del ajo (2, 3, 6, 7). Por tanto, el canal TRPV1 es un receptor polimodal que transduce estímulos físicos y químicos. La clonación de TRPV1 fue un hito que impulsó notablemente el avance de la neurobiología sensorial.

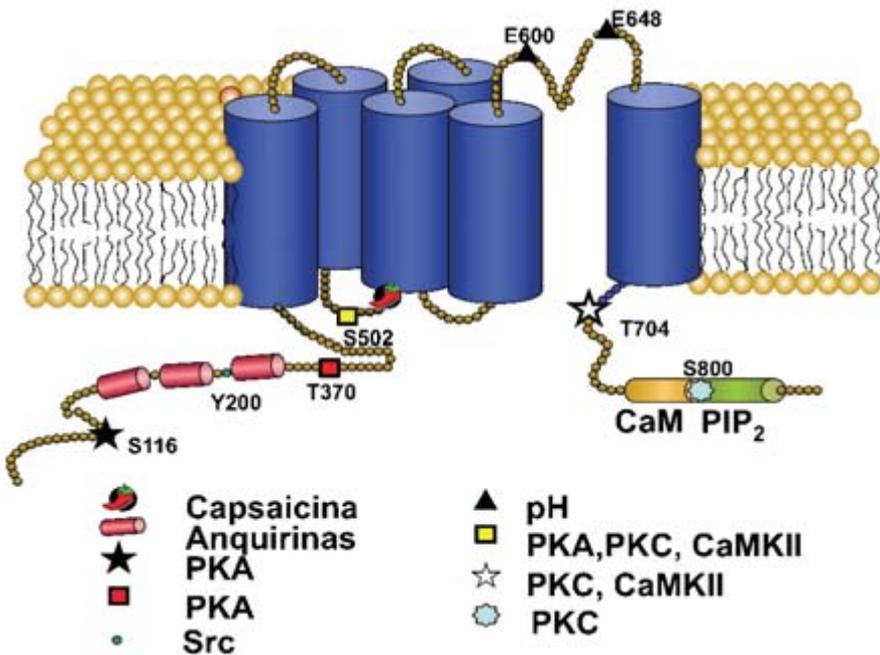


FIGURA 2. *Topología molecular de una subunidad del receptor TRPV1.* En azul se ilustran los segmentos transmembrana. Se indican los diversos sitios de modulación identificados por diferentes rutas de señalización intracelular. La asociación de cuatro de estas subunidades alrededor de un eje de simetría central produciría un receptor funcional. Entre la T704 y el sexto segmento transmembrana se localiza el dominio de asociación TRP.

TABLA II. *Canales TRP activados por temperatura*

Canal	Cromosoma	Umbral térmico	Sensibilidad Mecánica	Selectividad $P_{Ca}^{2+}/P_{Na}^{+}$	Razón nulo	Agonistas	Antagonistas	Moduladores	Expresión Tisular
<b>TRPV1</b>	17p13.3	>42°C	Hiperosmolaridad	3.8 (calor) 9.6 (vanilloides)	Reducida hiperalgesia térmica, química y mecánica. Alterada nocicepción térmica.	Capsaicina, pH, resiniferatoxina, alicina, alcanfor, eugenol, amandamida, 2-APB, hidroxi- $\alpha$ -sanshool, clortrimazol, piperina, etanol, nicotina.	Rojo rutenio, capsacepina, BCTC, DD01050, yodo-resiniferatoxina, SB-452533, SDZ-249482, nuvamil, SB-705498, AMG-517, NGD-8243	Voltaje, fosforilación, exocitosis, PIP <sub>2</sub> , citoquinas, bradiquina, triptasa, histamina, NGF.	DRG, TG, neuronas, vejiga, queratinocitos, mastocitos, células dendríticas, testículos, próstata, adipocitos, folículos pilosos,
<b>TRPV2</b>	17p11.2	>53°C	Hipoosmolaridad	3.0	—	2-APB, D9-THC, probenecid	Rojo rutenio, SKPF6365	Exocitosis	DRG, medula espinal, cerebro, bazo, intestino.
<b>TRPV3</b>	17p13.3	30-39°C	—	2.6	Alterada percepción térmica	Alcanfor, carvacrol, eugenol, timol, carveol, dihidrocarveol, ácido araquidónico, 6-tert-butil-m-cresol	Rojo rutenio, difeniltetrahidrofurano	Ácidos grasos poliinsaturados	DRG, TG, cerebro, medula espinal, lengua, queratinocitos.

TABLA II. *Canales TRP activados por temperatura. (Continuación)*

Canal	Cromosoma	Umbral térmico	Sensibilidad Mecánica	Selectividad $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}}$	Razón nulo	Agonistas	Antagonistas	Moduladores	Expresión Tissular
<b>TRPV4</b>	12q24.1	25-35°C	Mecánico, hiposmolaridad	6	Alterada hiperalgesia térmica, mecánica y osmótica	4 $\alpha$ -PPD, anandamida, bisandrografolide A, ácido epoxieicosatrienoico.	Rojo ruténio	Exocitosis	DRG, riñón, bazo, pulmón, testículos, corazón, hígado, endotelio, queratinocitos.
<b>TRPM5</b>	11p15.5	15-35°C	—	0.2	—	—	—	Voltaje, $PIP_2$ , $Ca^{2+}$	Intestino, hígado, pulmón, células gustativas.
<b>TRPM8</b>	2q37.2	23-28°C	Tensión membranal	3.3	Alterada percepción al frío.	Mentol, icilina, eucalipto, WS23, LPC	BCTC, SKF96365, clotrimazol, DD01050, 2-APB	Voltaje, pH, $PIP_2$	DRG, TG, próstata, hígado.
<b>TRPA1</b>	8q13	<18°C	Mecánico	0.8	Respuesta alterada a bradiquina, irritantes y hiperalgesia al frío reducida.	Alicina, icilina, mentol, aceite mostaza, hidroxinonal, hidroxisanshool, cinnamaldehído, metilo de parahidroxibenzoato, formaldehído, acroleína.	Alcanfor, $Gd^{3+}$ , rojo ruténio, gentamicina, amiloride, HC-030031, mentol, clopromazine, AP18	Voltaje, bradiquina, diaciglicerol, ácidos grasos polinsaturados	DRG, células pilosas, ovario, testículos, bazo.

Información tomada de referencias (1, 2, 3 y 4).

Tras la clonación de TRPV1, se identificaron otros receptores que respondían a estímulos térmicos. Así, destaca la clonación de TRPV2 (inicialmente nombrado VRL-1) que se activa con estímulos de calor intenso, activándose cuando la temperatura supera los 52°C (2, 3, 6, 7). Por otro lado, se identificó el receptor TRPV3 que responde a temperaturas templadas alrededor de 33°C. Recientemente se ha descrito que es también el receptor de las sustancias pungentes presentes en el orégano y los clavos, así como el alcanfor (2, 6, 7). Un umbral de activación similar posee el receptor TRPV4 que originalmente se catalogó como un receptor activado por estímulos osmosensibles y, posteriormente, se ha observado que también transduce estímulos térmicos moderados entre 25-37°C (2, 3, 7).

Los receptores capaces de responder a estímulos fríos no tardaron mucho en ser identificados. De nuevo, el grupo de David Julius, mediante una estrategia de expresión-clonación utilizando como ligando específico el mentol, identificó un receptor neuronal que se activaba por esta sustancia al que se le acuñó el nombre de CMR1 (de Cold Menthol Receptor I) (5). Al igual que con TRPV1, el fundamento de utilizar mentol fue la sensación de frescor que produce este compuesto en la boca o en la piel, sugiriendo una relación con la nocicepción al frío. Efectivamente, el receptor CMR1 era activado por temperaturas inferiores a 25°C (Tabla II). Sorprendentemente, el análisis de la secuencia aminoacídica de CMR1 en las bases de datos reveló que era idéntica a la de la proteína TRPM8, un polipéptido que se sobreexpresaba en cáncer de próstata y cuya función se desconocía (2, 3, 5, 7). Otro miembro de la familia TRPM implicado en termosensación es TRPM5 (Tabla II) (3, 7). Sin embargo, este receptor es más conocido por su participación sensorial al gusto, mediando la respuesta a sabores amargos, dulces y a aminoácidos (2, 3).

La sospecha de que podía haber un receptor que respondiera a temperaturas frías nocivas, condujo a la identificación de TRPA1 (originalmente ANKTM1). Este receptor se activa a temperaturas inferiores a 17°C (2, 6, 7), aunque existe cierta controversia sobre la activación por frío de este receptor en nociceptores (1, 2, 7). Trabajos recientes han demostrado que este receptor es activado por compuestos psicoactivos de la marihuana, así como sustancias irritantes y agentes pungentes, incluyendo acroleína, aceites de mostaza y canela y la alicina (Tabla II) (2, 6, 7). Por la particular estructura de su dominio N-terminal, compuesto por un gran número de dominios de anquirina, se pensó que este receptor podría también transducir estímulos mecánicos, pero los datos existentes en ratones carentes del canal TRPA1 cuestionan dicho papel (1, 2, 7).

## TRPV1 UNA DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

De entre los canales TRP, el receptor TRPV1 se ha erigido como una diana crucial para en la transducción de señales dolorosas, especialmente en la etiología del dolor inflamatorio (2, 4, 8, 9). Su extensa distribución tisular y celular (Tabla III), junto a la potenciación de su actividad de canal iónico por mediadores pro-inflamatorios liberados durante un daño tisular, han situado a este receptor como un mediador crítico de la sensibilización inflamatoria de los nociceptores que resulta en la manifestación de hipersensibilidad en la zona dañada (1, 8, 11). Un cúmulo de resultados indica que TRPV1 participa en el inicio y mantenimiento de la inflamación neurogénica que suele acompañar a una injuria tisular. En este sentido la eliminación genética o farmacológica del receptor en animales produce una reducción del proceso inflamatorio que se traduce en una atenuación de la hiperalgesia térmica (2, 8, 10, 11).

A nivel celular, el receptor TRPV1 esta en una encrucijada de distintas rutas de señalización que son activadas por factores pro-algésicos produciendo la potenciación de su funcionalidad que, en último término, resulta en un incremento de la excitabilidad de los nociceptores (Figura 3). La sensibilización de TRPV1 puede deberse bien a activación directa de metabolitos que actúan como endovanilloides o a la potenciación de la función. La activación directa ha sido documentada para los compuestos anandamida, N-araquidonoil-dopamina (NADA), N-oleoildopamina y el ácido 12-hidroxiperoxicosatotetraenoico (12-HPETE) que actúan como agonistas incrementando la entrada de calcio al citosol neuronal (12, 13). Además, el pH ácido que se desarrolla en la zona inflamada también activa el receptor contribuyendo a incrementar más los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y a despolarizar la membrana de los nociceptores. El  $\text{Ca}^{2+}$  a su vez ejerce de segundo mensajero activando rutas de señalización como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CAMKII) que fosforilan al receptor alterando su funcionalidad. Hay que destacar la mayoría de estos agonistas reducen el umbral de activación térmica del receptor desde  $42^{\circ}\text{C}$  a  $35^{\circ}\text{C}$ , lo que se traduce en la activación del receptor a temperatura corporal produciendo hiperalgesia (8, 9, 11, 12). Este fenómeno es el que media la hipersensibilidad de una piel quemada por el sol a una ducha de agua templada.

TABLA III. *Distribución tisular de TRPV1*

<i>Tejido/Órgano</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Función</i>	<i>Patología</i>	<i>Síntomas</i>
Sistema Nervioso Periférico	Neuronas de DRG, TG, NG	Detección de estímulos nocivos físicos y químicos. Termorregulación.	Dolor inflamatorio y neuropático (neuralgia del trigémino, neuropatía diabética, neuralgia postherpética, quemaduras, amputación; vulvodinia, inflamación ocular.	Hiperalgesia térmica y alodinia mecánica
Cerebro	Hipotálamo y sustancia negra, hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatorio, mesencéfalo y cerebro anterior.	Termorregulación, regulación de la saciedad, control motor y cognitivo.	Neurodegeneración, Alzheimer, Esquizofrenia, obesidad, migraña.	Alteraciones cognitivas, memoria, regulación temperatura corporal, dolor de cabeza.
Piel	Queratinocitos, corpúsculos de Meissner, folículos pilosos, fibroblastos, mastocitos, células dendríticas, estructuras epiteliales de anclaje.	Diferenciación y proliferación de los queratinocitos, regulación nociceptiva, apoptosis, prurito, crecimiento capilar.	Dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, prurigo nodulares, eczema, psoriasis, alopecia, quemaduras solares.	Inflamación, prurito, hipersensibilidad.
Sistema cardiovascular	Fibras sensoriales simpáticas cardíacas.	Modulación presión arterial, modulación contracción biogénica de Bayliss, cardioprotección.	Isquemia cardíaca, hipertensión, migraña.	Dolor de pecho, hipertensión, dolor de cabeza.

TABLA III. *Distribución tisular de TRPV1. (Continuación)*

<i>Tejido/Órgano</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Función</i>	<i>Patología</i>	<i>Síntomas</i>
Tracto intestinal	Células de la región gastroduodenal. Plexo submucoso y mientérico.	Mantenimiento barrera mucosa.	Movilidad exagerada tracto gastrointestinal, enfermedad funcional del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, hemorroides.	Dolor abdominal crónico, isquemia, color de pecho, hipersensibilidad.
Páncreas	Células de los islotes pancreáticos.	Regulación glucemia y liberación insulina.	Pancreatitis. Diabetes no dependiente de insulina, cáncer de páncreas.	Dolor abdominal medio y superior, vómitos, shock e isquemia.
Vejiga	Terminales nerviosas sensoriales. Células epiteliales (urotelio). Músculo detrusor y fibroblastos.	Contracción vejiga.	Cistitis intersticial, sobreactividad neurogénica del músculo detrusor, cistitis hemorrágica dolorosa.	Hiperalgesia, alodinia. Aumento actividad refleja de la isquemia.
Hueso	Líquido sinovial de las articulaciones.	Papel mecánico.	Osteoartritis, osteosarcomas.	Alodinia mecánica, hiperalgesia. Cambios artríticos marcados en las articulaciones tibiotarsales.
Tracto respiratorio	Fibras sensoriales.	Papel sensorial, generación tos no productiva.	Asma.	Obstrucción pulmonar (tos).
Órgano de Corti	Células pilosas, células de Hensen y célula satélite.	Homeostasis coclear, audición.		

TABLA III. *Distribución tisular de TRPV1. (Continuación)*

<i>Tejido/Órgano</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Función</i>	<i>Patología</i>	<i>Síntomas</i>
Estómago	Células epiteliales del estómago.	Protección mucosa.	Enfermedad del reflujo gastroesofageal, úlceras.	Ardor de estómago.
Boca	Células de la papila gustativa, TG	Nocicepción.	Inflamación bucal, inflamación dental.	Hiperalgesia y alodinia.

Información tomada de referencias (1, 2, 3, y 4).

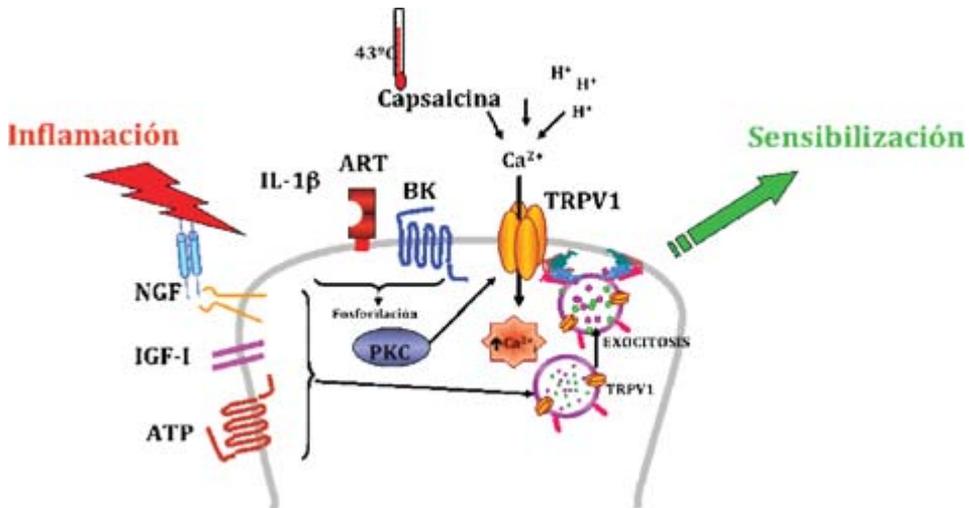


FIGURA 3. *Rutas de señalización activadas por los agentes pro-inflamatorios que convergen en el receptor TRPV1, bien modificando su actividad o aumentando su expresión superficial y que conducen a la sensibilización de los nociceptores.*

Complementariamente, los agentes pro-inflamatorios (neurotrofinas, interleuquinas, histamina, triptasa, bradiquina, ATP, etc), actuando a través de sus receptores (Figura 3), activan rutas de señalización intracelular que convergen en el receptor TRPV1 modificando su funcionalidad y/o incrementando su expresión superficial. Así, los factores pro-algésicos estimulan rutas que involucran a la PKC, la proteína quinasa A (PKA), la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), la fosfolipasa C (PLC), y la quinasa de residuos de tirosina Src (2, 8, 11) (Figuras 2 y 3). La acción de estas quinasas sobre el receptor se traduce en un incremento de su actividad de canal iónico, resultante de una reducción de la temperatura de activación y una facilitación de la cinética de apertura del canal (8, 11). En paralelo, algunas de estas rutas, como la mediada por la PKC, también puede favorecer la movilización rápida a la superficie neuronal de una población vesicular de receptores TRPV1 residente cerca de la membrana plasmática (14, 15, 16). Por tanto, la mayor actividad y expresión del receptor TRPV1 en tejidos inflamados es una de las causas principales de la hiperexcitabilidad de los nociceptores que conduce a la manifestación de los dos síntomas característicos de la inflamación, a saber, la hiperalgesia y la alodinia. Consecuentemente, el control farmacológico de la actividad y/o expresión superficial de TRPV1 emergen como dos estrategias terapéuticas para el control de la inflamación y del dolor que la acompaña.

## FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR TRPV1

La validación como diana terapéutica de TRPV1, y su implicación en una pléthora de patologías, desde el dolor inflamatorio al oncológico (Tabla III), han propiciado el desarrollo de gran número de activadores e inhibidores del receptor para su uso como anti-inflamatorios y analgésicos. Entre los agonistas más populares y de mayor aplicación se encuentra la capsaicina ( $IC_{50} = 10 \text{ nM}$ ), que se ha venido utilizando en aplicaciones tópicas para el tratamiento de distintas afecciones (Tabla IV) (9, 12, 17). El fundamento de utilizar activadores de la actividad del receptor radica en que estos compuestos en presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular promueven la desensibilización de TRPV1, un estado inactivo del receptor y altamente refractario a la reactivación. Por este motivo, se han establecido programas de descubrimientos de fármacos dirigidos a obtener agonistas más potentes que induzcan un estado desensibilizado más persistente. Entre estos agonistas cabe destacar el resiniferatoxina, una toxina aislada de *Euphorbia resinifera*, que inhibe la actividad de TRPV1 mucho más potentemente que capsaicina ( $IC_{50} = 10 \text{ pM}$ ). Este compuesto ha mostrado una buena eficacia en modelos animales de incontinencia urinaria y dolor asociado a la neuropatía diabética (12, 17). A pesar del potencial terapéutico mostrado por estos agonistas, su biodisponibilidad oral es muy limitada, y está en parte restringido debido a la sensación de quemazón que acompaña su administración tópica. Es más, el hecho que la resiniferatoxina posea un esqueleto de éster de forbol ha levantado preocupación por su posible tumorigenicidad (12, 17). Todo ello ha incitado a las compañías farmacéuticas a desarrollar compuestos con biodisponibilidad oral, desprovistos de los efectos secundarios mencionados. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, los ligandos de nueva generación no han conseguido eliminar los efectos pungentes de la capsaicina. Como consecuencia, los últimos avances realizados en este campo han sido el uso de nuevas formulaciones galénicas de capsaicina como la transaicina (originalmente NGX-4010, NeurogesX) en parches dérmicos y ALGRX 4975 (Anesiva, originalmente de AlgoRx) para inyecciones localizadas (Tabla IV) (9, 17).

Una alternativa a los agonistas de TRPV1 ha sido el desarrollo de antagonistas que induzcan la inhibición del receptor. El primero de los antagonistas caracterizado fue la capsacepina, un análogo restringido de la capsaicina que contiene un grupo tiourea. La capsacepina actúa como antagonista competitivo por cuanto que se une al sitio de unión de la capsaicina (12, 17). A pesar de comportarse con un antagonista potente *in vitro*, su aplicación en modelos animales ha rendido resultados contradictorios. Así, el compuesto no ha mostrado actividad analgésica ni antiinflamatoria en ratas, pero si ha atenuado la hiperal-

gesia térmica en cobayas. Otro de los compuestos desarrollado y ensayado ha sido la 5-yodo-resiniferatoxina, un derivado halogenado del agonista que lo convierte en un antagonista muy potente (12, 17). Este compuesto muestra una actividad analgésica *in vitro* más constante y reproducible por lo que se está considerando su desarrollo clínico para el tratamiento de la incontinencia urinaria. No obstante, al igual que para la resiniferatoxina, su biodisponibilidad oral es nula, y contiene el éster de forbol que posee un potencial tumorigénico. Además, la síntesis química del compuesto es notablemente elevada, implicando más de 45 etapas de reacción (12).

En un intento de desarrollar antagonistas competitivos con biodisponibilidad oral, las empresas farmacéuticas han usado ensayos de alto rendimiento para rastrear quimiotecas compuestas por miles a millones de compuestos químicos. Como resultado, se han aislado y caracterizado una abundancia de moléculas con una buena actividad antagonista *in vitro* y en modelos animales. La optimización estructural y funcional de los mejores candidatos ha rendido inhibidores orales de TRPV1 con un aparente buen perfil terapéutico (9, 12, 17). Entre estos cabe destacar los compuestos SB-705498, NGD-8243, AMG-517, y GRC-621, que están en estos momentos en distintas fases de desarrollo clínico (Tabla IV).

Una segunda familia de inhibidores de TRPV1 que se ha estado explorando la constituyen los antagonistas no competitivos y acompetitivos, que se unen al receptor en sitios de unión distintos al de la capsaicina (12, 13). Entre estos compuestos destaca el rojo de rutenio y los péptidos ricos en residuos de arginina que actúan como potentes bloqueantes pero sin valor terapéutico debido a su excesiva toxicidad. El uso de una aproximación de química combinatoria identificó a las moléculas DD161515 y DD191515 como potenciales antagonistas no competitivos con actividad analgésica y anti-inflamatoria *in vivo* (12, 13, 17). Estas propiedades farmacológicas fueron mejoradas con la obtención del compuesto DD01050, un análogo 10 veces más potente *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el buen perfil terapéutico de DD01050 quedó enmascarado por su todavía elevada toxicidad que ha frenado su desarrollo clínico (12). No obstante, estos estudios han identificado los principios químicos y farmacológicos requeridos para poder obtener antagonistas acompetitivos con mejores propiedades y baja toxicidad. Un ejemplo de esta nueva generación de moléculas lo representa la identificación de la methoctramina (9, 12). Este compuesto bloquea a TRPV1 en cultivos primarios de nociceptores con un mecanismo dependiente del voltaje, siendo la inhibición mayor a potenciales de membrana negativos que ha positivos. No obstante, la actividad anti-inflamatoria y analgésica de este compuesto no se ha descrito todavía.

TABLA IV. Agonistas y antagonistas de TRPV1 en desarrollo clínico

Nombre	Compuesto	Compañía	Acción	Ruta	Indicaciones	Fase clínica
Transacin	Capsaicina	NeurogenX	Agonista	Parche transdérmico	Dolor asociada a la neuropatía del SIDA	Fase III
WL-1001 WL-1002	Civamide (Cis-capsaicina)	Winston Laboratorios	Agonista	Intranasal, tópico	Migraña, Dolor de cabeza, osteoartritis	Fase III (dolor de cabeza, osteoartritis)
ALGRX4975	Capsaicina	Anesiva	Agonista	Inyección	Dolor	Fase II (migraña)
SB-705498	SB-705498	GlaxoSmith-Kline	Antagonista	Oral	Migraña, dolor dental	Fase II Fase II (migraña)
NGD 8243 AMG 517 GRC 6211	NGD 8243 AMG 517 GRC 6211	Neurogen/Merck Amgen Glenmark	Antagonista Antagonista Antagonista	Oral Oral Oral	Dolor Dolor Osteoartritis, dolor dental, incontinencia urinaria, dolor neuropático	Fase II Fase I Fase I

Información tomada de referencias (9, 12, y 17).

Resulta muy notable que, aun después del enorme esfuerzo científico y económico realizado en los últimos años en la búsqueda y desarrollo de antagonistas de TRPV1, el número de estos compuestos que han progresado a ensayos clínicos en humanos es marcadamente pobre (Tabla IV). La base de datos de ensayos clínicos del NIH registra únicamente tres ensayos clínicos en fase II para el compuesto SB-705498 de GlaxoSmithKline, a saber, NCT-00269022 en el que el compuesto se está ensayando para migraña; NCT-00281684 en que se está testando en dolor dental tras cirugía; y, NCT-00461682 para dolor rectal (9, 17). Además, otras compañías como Amgen (AMG-517) Glenmark (GCR-6211) y Neurogen/Merck (NGD-8243) han declarado la realización de ensayos clínicos en fase I con sus compuestos. El ensayo realizado por Amgen tuvo que ser abortado al observar que el compuesto AMG-517 producía una marcada hipertermia en los voluntarios del estudio. Un posterior análisis en modelos animales reveló que, efectivamente, el bloqueo potente de TRPV1 aumentaba la temperatura corporal entre 1-3°C (18). Este resultado sugiere que TRPV1 está tónicamente activo en condiciones fisiológicas y que esta actividad es fundamental para la regulación de la temperatura corporal (18). En apoyo de esta hipótesis se ha descrito que TRPV1 contribuye a la generación de la fiebre polifásica inducida por el pirógeno bacteriano liposacárido (LPS) (19). Conjuntamente, todos estos estudios sugieren que el bloqueo indiscriminado del receptor TRPV1 con potentes antagonistas puede conllevar a efectos secundarios intolerables terapéuticamente. No es de extrañar, por tanto, que muchas compañías farmacéuticas hayan abortado los ensayos clínicos iniciados. No obstante, aunque el uso sistémico de estos compuestos sea inaceptable, su aplicación tópica es todavía una opción válida que se está explorando.

## **LOS COMPLEJOS PROTEICOS DE TRPV1 COMO DIANAS TERAPÉUTICAS**

Al igual que otros canales TRP, el receptor TRPV1 no se encuentra en la membrana celular como una entidad aislada, sino que está formado parte de complejos proteicos que constituyen redes de señalización celular. Estos ensamblados proteicos controlan desde el transporte del receptor a la membrana neuronal hasta su funcionalidad una vez incorporado en la superficie de la célula. En los últimos años se ha producido un avance notable en la identificación de los componentes moleculares que forman parte de estos macrocomplejos (8, 11). Así, el rastreo de genotecas derivadas de mRNA neuronal mediante la técnica del doble-híbrido en levaduras, ha identificado proteínas que interaccionan

con los dominios intracelulares de TRPV1, algunas de ellas modulan la actividad de canal iónico (8). Uno de estos rastreos identificó las proteínas vesiculares, sinaptotagmina IX y snapin, que están implicadas en la exocitosis neuronal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y mediada por el llamado complejo SNARE (14). A diferencia de la exocitosis constitutiva, la fusión vesicular mediada por proteínas SNARE se produce en respuesta a una señal extracelular que aumenta la concentración del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol celular. La exocitosis regulada juega un papel clave en muchos procesos neuronales, incluyendo la sinaptogénesis y la potenciación de larga duración, un fenómeno sináptico implicado en la memoria y aprendizaje. Por tanto, la interacción de TRPV1 con proteínas del complejo SNARE inmediatamente sugirió que las neuronas podrían modular la actividad del receptor regulando sus niveles de expresión superficial en respuesta a estímulos ambientales (14). En este sentido, la activación de la PKC directamente con ésteres de forbol, o mediante la exposición celular a las neurotrofinas NGF e IGF-1, dos agentes pro-inflamatorios, aumentaba notable y rápidamente la expresión superficial de TRPV1 en las membranas (14-16). Este incremento era prevenido en gran medida por el tratamiento de la toxina botulínica, un bloqueante específico de la exocitosis neuronal (14). Estos estudios claramente sugirieron que la sensibilización inflamatoria de los nociceptores implicaba un incremento en la expresión superficial del receptor TRPV1, y que el bloqueo de este aumento podría tener una relevancia terapéutica importante. De hecho, estudios recientes de nuestro grupo en nociceptores en cultivo han demostrado que la inhibición de la exocitosis neuronal regulada mediante péptidos que interfieren con el complejo SNARE, elimina la sensibilización inflamatoria de TRPV1 y de los nociceptores, sin alterar la actividad del canal. Resultados preliminares en modelos animales muestran que estos péptidos poseen actividad anti-inflamatoria y analgésica.

## CONCLUSIONES Y PANORÁMICA

Cada vez es más claro que los canales TRP son cardinales en la fisiología sensorial y que su alteración funcional, bien mediante mutaciones o por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios, conduce a estados patológicos indicando que estos dispositivos moleculares son dianas terapéuticas. El desarrollo de compuestos que controlen su actividad patológica es, por tanto, un objetivo fundamental en neurofarmacología. De experiencias y resultados previos hemos de aprender que la inhibición indiscriminada de estos receptores (fisiológicos y patológicos) conduce a efectos secundarios que enmascaran su beneficio tera-

péutico. Por ello, es esencial el diseño de compuestos que interaccionen preferentemente sobre los receptores patológicamente activados. Los antagonistas incompetitivos que actúen como bloqueadores de canal abierto son una alternativa válida, por cuanto estos compuestos se unirán mayoritariamente a aquellos canales que están hiperactivados (abiertos). Una estrategia alternativa es actuar sobre los complejos multiproteicos que contienen estos canales y que contribuyen crucialmente a la señalización celular y a la patología. La identificación de los componentes moleculares de estas redes proteicas pavimenta el camino para la validación de nuevas dianas terapéuticas útiles para el tratamiento de las alteraciones patológicas que implican los canales TRP. El futuro nos demostrará si estas aproximaciones rinden compuestos con índices terapéuticos superiores que, especialmente, tengan eliminados, o al menos, marcadamente disminuidos los efectos secundarios de los productos actuales.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco la contribución de todos los miembros de mi grupo de investigación, y a mis colaboradores G. Fernández, R. Planells, C. Belmonte, A. Messeguer, E. Pérez, F. Viana, A. Gomis, A. Fernández, M. Caprini, F. Albericio y C. Carreño, responsables de gran parte del progreso realizado en los últimos años. Los proyectos han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación, La Generalitat Valenciana, La Fundación Ramón Areces, La Fundació la Marató de TV3, y DiverDrugs, SL.

## REFERENCIAS

- (1) BELMONTE, C. Y VIANA, F. (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol. Pain.* 4: 14.
- (2) VENKATACHALAN, K. Y MONTELL, C. (2007) TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 387-417.
- (3) TALAVERA, K.; NILIUS, B. Y VOET, T. (2008) Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci.* 31: 287-295.
- (4) NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T. Y PETERS, J. (2007) Transient receptor potential channels in disease. *Physiol. Rev.* 87: 165-217.
- (5) JORDT, S.E.; MCKEMY, D.D. Y JULIUS, D. (2003) Lessons from Peppers and peppermint: the molecular logic of thremosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:, 487-492.

- (6) BANDELL, M.; MACPHERSON, L.J. Y PATAPOUTIAN, A. (2007) From chilis to chilis: mechanisms of thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 490-497.
- (7) DHAKA, A.; VISWANATH, V. Y PATAPOUTIAN, A. (2006) The ion TRP channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 135-161.
- (8) PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; MORENILLA-PALAO, C. Y FERRER-MONTIEL, A. (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 451: 151-159.
- (9) PLANELLS-CASES, R. Y FERRER-MONTIEL, A. (2007) Drug design and development through the vanilloid receptor. *Exp. Opin. Drug. Discov.* 2: 1053-1063.
- (10) CATERINA, M.J. Y JULIUS, D.D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.
- (11) HUANG, J.; ZHANG, X. Y McNAUGHTON, P.A. (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharm.* 4: 197-206.
- (12) MESSEGUER, A.; PLANELLS CASES, R. Y FERRER-MONTIEL, A. (2006) Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 1-9.
- (13) PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-MARTINEZ, C.; ROYO, M.; PEREZ-PAYÀ, E.; CARREÑO, C.; ALBERICIO, F.; MESSEGUER, A. Y FERRER-MONTIEL, A. (2003) Small molecules targeting the vanilloid receptor complex as drugs for inflammatory pain. *Drugs of Future* 28: 787-795.
- (14) MORENILLA-PALAO, C.; PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, C. Y FERRER-MONTIEL, A. (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 279: 25665-25672.
- (15) ZHANG, X.; HUANG, J. Y McNAUGHTON, A. (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 24: 4211-4223.
- (16) VAN BUREN, J.J.; BHAT, S.; ROTELLO, R.; PAUZA, M.E.; PREMKUMAR, L.S. (2005) Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol. Pain.* 1, 17:1-11.
- (17) SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A. Y EID, S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonists proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6: 357-372.
- (18) GAVVA, N.R.; BANNON, A.W.; SURAPANENI, S.; HOVLAND, D.N. JR.; LEHTO, S.G.; GORE, A.; JUAN, T.; DENG, H.; HAN, B.; KLIONSKY, L.; KUANG, R.; LE, A.; TAMIR, R.; WANG, J.; YOUNGBLOOD, B.; ZHU, D.; NORMAN, M.H.; MAGAL, E.; TREANOR, J.J. Y LOUIS, J.C. (2007) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.* 27: 3366-3374.

- (19) IIDA, T.; SHIMUZI, I.; NEALEN, M.L.; CABBELL, A. Y CATERINA, M. (2005) Attenuated fever response in mice Licking TRPV1. *Neurosci. Lett.* 378: 28-33.
- (20) VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G. Y NILIUS, B. (2005) Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* 1: 85-92.