



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

Búsqueda de nuevos analgésicos mediante modulación del canal iónico TRPV1 implicado en mecanismos de transducción de señales nociceptivas

Autor

Sergio Manresa Vera

Tutora

Asia Fernández Carvajal

Área de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Experimentales
Curso académico 2016/2017

Elche, junio de 2017

Resumen

El canal iónico TRPV1 constituye una diana terapéutica potencial en la búsqueda de nuevos analgésicos debido a su implicación en mecanismos de transducción de señales nociceptivas. En concreto, participa en la detección de estímulos nocivos de naturaleza mecánica, térmica y química, dando lugar a la sensación de dolor nociceptivo. Adicionalmente, su actividad se ha visto incrementada bajo condiciones patológicas de dolor e inflamación, por ello su modulación supone un desafío en la generación de nuevas terapias más seguras y efectivas. A lo largo de este trabajo, se ha avanzado en la caracterización farmacológica de compuestos derivados de la capsaicina, todos ellos moduladores de este receptor, ya sean con actividad agonista como antagonista. Las técnicas de cribado de alto rendimiento han permitido su identificación inicial, a partir de la cual continuar con el estudio de propiedades importantes para su posible aplicación clínica, entre ellas potencia, citotoxicidad, modelado molecular y selectividad. Como resultado de estos experimentos, los moduladores C12 y C49 han mostrado ser potenciales candidatos para proseguir con su desarrollo como futuros fármacos analgésicos.

Abstract

The TRPV1 ion channel is a potential therapeutic target in the search for new analgesics due to its involvement in mechanisms of nociceptive signal transduction. Specifically, they participate in the detection of noxious stimuli (mechanical, thermal and chemical), giving rise to nociceptive pain sensation. Additionally, its activity is increased under pathological conditions of pain and inflammation, thus its modulation is a challenge in the generation of new safer and more effective therapies. Throughout this work, there has been progress in the pharmacological characterization of compounds derived from capsaicin, all of them modulators of this receptor, either with agonist or antagonist activity. High throughput screening techniques have allowed an initial identification, from which to continue the study of important properties for its possible clinical application, including potency, cytotoxicity, molecular modeling and selectivity. As a result, modulators C12 and C49 have shown to be potential candidates to continue their development as future analgesic drugs.

Palabras clave

dolor, analgesia, canal iónico, TRPV1, cribado de alto rendimiento, agonista, antagonista

Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Dolor y analgesia	1
1.2.	Superfamilia TRP	3
1.3.	Canal iónico TRPV1	5
1.3.1.	Estructura molecular	5
1.3.2.	Modulación	6
1.3.3.	Desensibilización	8
1.3.4.	Localización tisular	8
1.3.5.	Papel en mecanismos de transducción de señales nociceptivas.....	8
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1.	Sistemas celulares.....	12
3.2.	Agonistas, antagonistas y quimioteca.....	13
3.3.	Técnicas fluorométricas basadas en sondas sensibles a calcio.....	14
3.3.1.	Introducción a la técnica	14
3.3.2.	Metodología	15
3.3.3.	Procesado de datos	17
3.4.	Ensayo de MTT.....	19
3.4.1.	Metodología	19
3.5.	Modelado molecular.....	20
3.5.1.	Metodología	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1.	Cribado y primera selección.....	22
4.2.	Potencia (EC50 e IC50).....	23
4.3.	Citotoxicidad	26
4.4.	Acoplamiento molecular, SAR y segunda selección.....	29
4.5.	Selectividad.....	34
5.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	37
	<i>Anexo I</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dolor y analgesia

La percepción del dolor es una parte intrínseca de la vida. El término "doloroso" puede ser empleado para describir tanto una lesión en el cuerpo como una emoción. Sin embargo, esta dicotomía presenta su origen en la evolución de la idea de dolor, el cual podría definirse actualmente como *una sensación específica o emocional, iniciada por la actividad de neuronas periféricas y centrales*^[1].

El dolor ha acompañado al ser humano a lo largo de los años. Por ello, tanto las teorías para intentar explicar el porqué de su existencia, como las numerosas y a su vez diversas formas de combatirlo, han evolucionado a lo largo de la historia de la humanidad. Desde culturas arcaicas a la actualidad, pasando por Aristóteles, quien definió el dolor como *lo opuesto al placer*, se le ha otorgado a la idea de dolor desde orígenes mágicos, demoníacos y religiosos, hasta su comprensión actual facilitada por la llegada de los procedimientos empíricos y el método científico^[2].

El mundo a nuestro alrededor está lleno de diferentes estímulos, tanto físicos como químicos. Todos los organismos, desde una bacteria hasta el ser humano, presentan la capacidad de recibir, transducir y transmitir estas señales, coordinando y modificando su comportamiento como respuesta. Este fenómeno es conocido como somatosensación, e incluye la detección de estímulos nocivos mecánicos, térmicos o químicos, causantes finalmente de una sensación desagradable denominada dolor nociceptivo^[3].

En animales superiores, sobre todo en mamíferos, el proceso de detección de estímulos sensoriales se realiza a través de neuronas sensitivas primarias, células especializadas que inervan una gran porción del cuerpo recogiendo datos sensoriales. De este modo, aquellas neuronas sensitivas primarias responsables de la nocicepción son conocidas como nociceptores, y su activación genera la sensación de dolor^[4]. El proceso de nocicepción comienza con la activación de receptores específicos por parte de estímulos nocivos, despolarizando las neuronas aferentes y generando, de esta manera, un potencial de acción que se propaga hasta la médula espinal o el asta dorsal. En este lugar, se produce la sinapsis con las neuronas sensitivas secundarias, capaces de llevar la señal hasta el cerebro, quien interpretará una sensación de incomodidad o dolor y por último tomará la decisión adecuada con el fin de prevenir cualquier daño. Por ello, la percepción del dolor es esencial para los organismos vivos, ya que además de interactuar con el ambiente permite evitar estímulos potencialmente perjudiciales, así como aquellos capaces de comprometer la vida^[5].

Bajo condiciones normales, el dolor nociceptivo es un sistema de protección esencial con el fin de detectar y minimizar el contacto con estímulos dañinos. A pesar de su importancia, en determinadas ocasiones puede perder su significado de alerta inicial, convirtiéndose en un dolor patológico. Por consiguiente, si el dolor nociceptivo se prolonga en el tiempo puede transformarse en crónico, en ocasiones debido a lesiones tisulares y sensibilización de la región afectada, tratándose de un dolor inflamatorio. Los síntomas de este estado de sensibilización son la alodinia, un fenómeno donde estímulos normalmente inocuos dan lugar a una sensación desagradable, y la hiperalgesia, cuando se produce un incremento en el dolor sufrido durante un estímulo normalmente capaz de provocar dolor moderado^[6]. Adicionalmente, existe otro tipo de dolor patológico resultante de una lesión en un nervio, conocido como dolor neuropático, donde al contrario que el dolor inflamatorio no consiste en un síntoma de una enfermedad sino en un estado de ella (algunas patologías relacionadas serán, por ejemplo, herpes zóster, isquemia o neuropatías diabéticas)^[7].

De forma paralela a la evolución de la idea de dolor, la humanidad ha intentado luchar contra esta sensación tan incómoda y a su vez compleja, apareciendo el concepto de analgesia. Con el paso del tiempo, se ha buscado eliminar la sensación de dolor, empleando para ello diversos analgésicos, desde el consumo de opio hasta productos de síntesis química. Concretamente, en los últimos años el tratamiento del dolor se ha basado en el empleo de dos tipos de fármacos: antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales incluyen la aspirina, el paracetamol o anestésicos locales como la lidocaína; y narcóticos, como la morfina o el tramadol. Aunque consisten en fármacos eficaces, todos ellos presentan efectos secundarios no deseados, ya sean problemas gástricos y renales en el caso de AINEs, o vértigos y pérdida de funciones cognitivas en anestésicos. Por otro lado, el uso prolongado de narcóticos puede resultar en una adicción caracterizada por la aparición de inquietud, insomnio, diarreas, vómitos o dolor muscular y óseo en el paciente tras la finalización del tratamiento^[8].

En conclusión, resulta oportuna la búsqueda de nuevos analgésicos en este combate contra el dolor nociceptivo, ya que la sociedad requiere de tratamientos más seguros y novedosos. En este camino, el descubrimiento de los canales iónicos TRP ha representado una revolución, revelando un nuevo sistema complejo capaz de regular los mecanismos moleculares del dolor^[4]. De este modo, la superfamilia TRP presenta la posibilidad de desarrollo de moduladores de su actividad con efecto analgésico, actuando directamente sobre los componentes implicados en el inicio del proceso nociceptivo y controlando, de esta manera, la generación de la señal de dolor desde su origen. Además, estas características podrían conducir a la ausencia de efectos secundarios asociados a este tipo de fármacos^[5,6].

1.2. Superfamilia TRP

En los últimos años, la caracterización de diversos receptores sensoriales ha contribuido a la comprensión de los mecanismos periféricos relacionados con la detección de estímulos nocivos, ya sean mecánicos, térmicos o químicos, capaces de dar lugar a la sensación de dolor nociceptivo. Estas entidades moleculares se denominan nocisensores, destacando entre ellas a los canales iónicos TRP (*Transient Receptor Potential*), una superfamilia de receptores que presentan un papel crucial en la generación y el desarrollo de la percepción del dolor patológico^[9].

La superfamilia multigénica TRP codifica proteínas de membrana que actúan como canales iónicos, cuyos miembros de cada subfamilia se encuentran altamente conservados en levaduras, invertebrados y vertebrados. En lo que respecta a mamíferos, actualmente está compuesta por 28 receptores, distribuidos en 6 subfamilias: TRPC1-7 (*canonical*), TRPM1-8 (*melastatin*), TRPV1-6 (*vanilloid*), TRPA1 (*ankyrin*), TRPP1-3 (*polycystin*) y TRPML1-3 (*mucoilipin*). Además, podemos encontrar isoformas pertenecientes a otras subfamilias, como TRPN (*NOMPC-like*, en invertebrados y peces) o TRPY (en levaduras)^[10]. **Figura 1.**

A su vez, entre las dianas farmacológicas constituyentes de la superfamilia TRP podemos distinguir un conjunto de canales iónicos termosensibles, conocidos como termoTRP, responsables de la detección de un amplio rango de estímulos nocivos térmicos. En concreto, cuatro canales responden ante el calor (TRPV1-TRPV4) y dos frente al frío (TRPA1 y TRPM8)^[11].

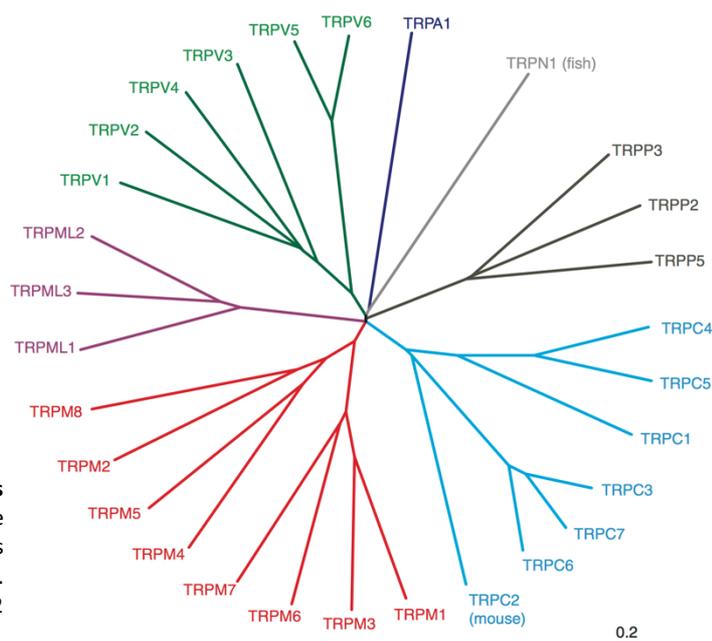


Figura 1 | Árbol filogenético de canales iónicos TRP humanos^[10]. Resultado de análisis de homología de secuencias, donde las diversas subfamilias se representan en colores distintos. La barra de escala hace referencia a 0.2 sustituciones nucleotídicas.

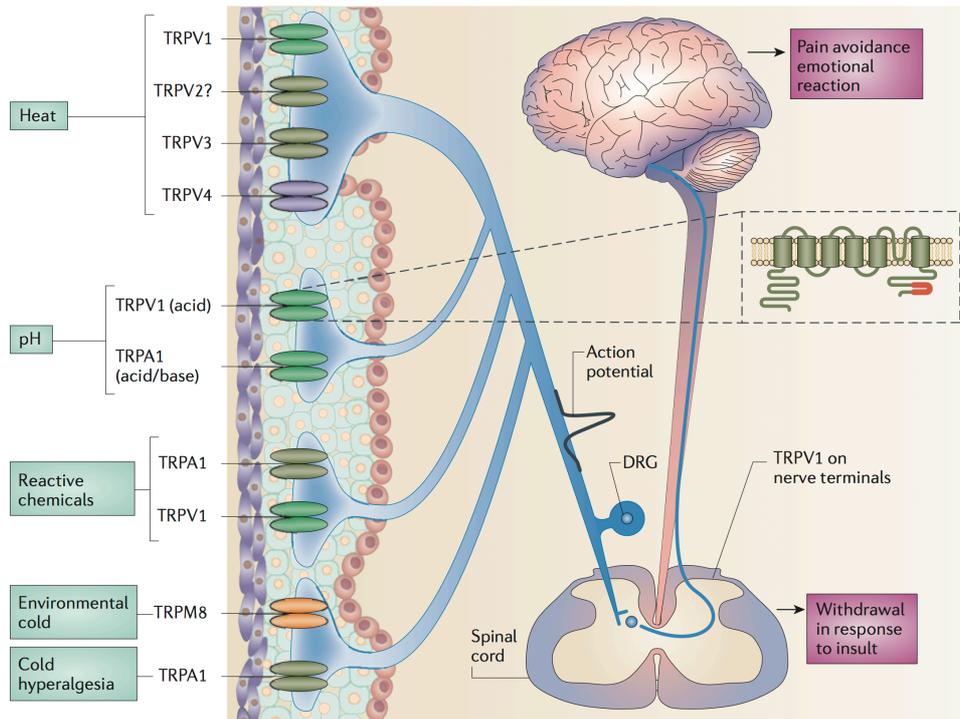


Figura 2 | Canales iónicos TRP como nocisensores^[5]. Las neuronas sensoriales expresan receptores TRP. Entre ellos, canales catiónicos pertenecientes a la subfamilia V (TRPV1, TRPV3 y TRPV4) responden ante temperaturas elevadas, mientras TRPV2 lo hace frente a temperaturas extremas. Los ácidos son activadores de TRPV1 y las bases de TRPA1, un quimiorreceptor capaz de responder ante una gran diversidad de compuestos químicos. En cuanto a TRPM8, es activado por el frío ambiental, mientras TRPA1 también se relaciona con la hiperalgesia al frío. La activación de cualquier canal iónico TRP da lugar a la generación de un potencial de acción en la neurona sensorial correspondiente. Además, algunos de ellos, por ejemplo TRPV1, también se expresan en la médula espinal, donde presentan importancia en el sistema nervioso central.

La mayoría de receptores TRP consisten en canales catiónicos no selectivos, los cuales permiten el flujo de iones Ca^{2+} , Na^{+} e incluso Mg^{2+} , aunque su permeabilidad y selectividad dependerá de su isoforma. Presentan una gran variedad de mecanismos de activación, desde la unión de ligandos, voltaje y temperatura, hasta modificaciones covalentes en residuos nucleofílicos^[10]. **Figura 2.** En cuanto a su distribución tisular, se encuentran ampliamente expresados en diversos tejidos y tipos celulares, razón por la cual juegan un papel importante en fisiología sensorial, ya que además de la nocicepción se encuentran relacionados con olfato, oído, visión, tacto u homeostasis iónica y térmica. Numerosos estudios han hallado relaciones entre los canales TRP y un amplio rango de enfermedades humanas, entre ellas problemas respiratorios, displasia esquelética, condiciones neurodegenerativas o desórdenes del dolor^[12].

Para finalizar, entre los miembros de la superfamilia TRP descrita anteriormente, numerosos esfuerzos se han centrado en el nocisensor TRPV1. Desde estudios de función *in vitro* hasta las deficiencias en procesos nociceptivos e inflamatorios mostradas por ratones *knockout*, validan este receptor vanilloide como una diana terapéutica potencial en la búsqueda de nuevos analgésicos^[9,13].

1.3. Canal iónico TRPV1

Actualmente uno de los miembros de la superfamilia TRP mejor conocido, el canal iónico TRPV1 pertenece a la subfamilia V, debido al anillo vanilloide característico de su ligando natural. Fue clonado por primera vez en 1997 a partir de neuronas DRG (*Dorsal Root Ganglion*) de rata y conocido inicialmente como VR1 (*Vanilloid Receptor 1*) o, más comúnmente, como "receptor de capsaicina", su agonista natural y componente activo de los pimientos picantes, es decir, la sustancia responsable de producir sensación de ardor^[14].

1.3.1. Estructura molecular

El termorreceptor TRPV1 es una proteína de membrana constituida por cuatro subunidades idénticas, dispuestas en torno a un poco acuoso central, dando lugar a un tetrámero. A su vez, cada subunidad proteica contiene una región de membrana compuesta por seis segmentos transmembrana (S1-S6), con una región anfipática entre los segmentos S5 y S6 la cual conforma el poro del canal^[15]. **Figura 3.**

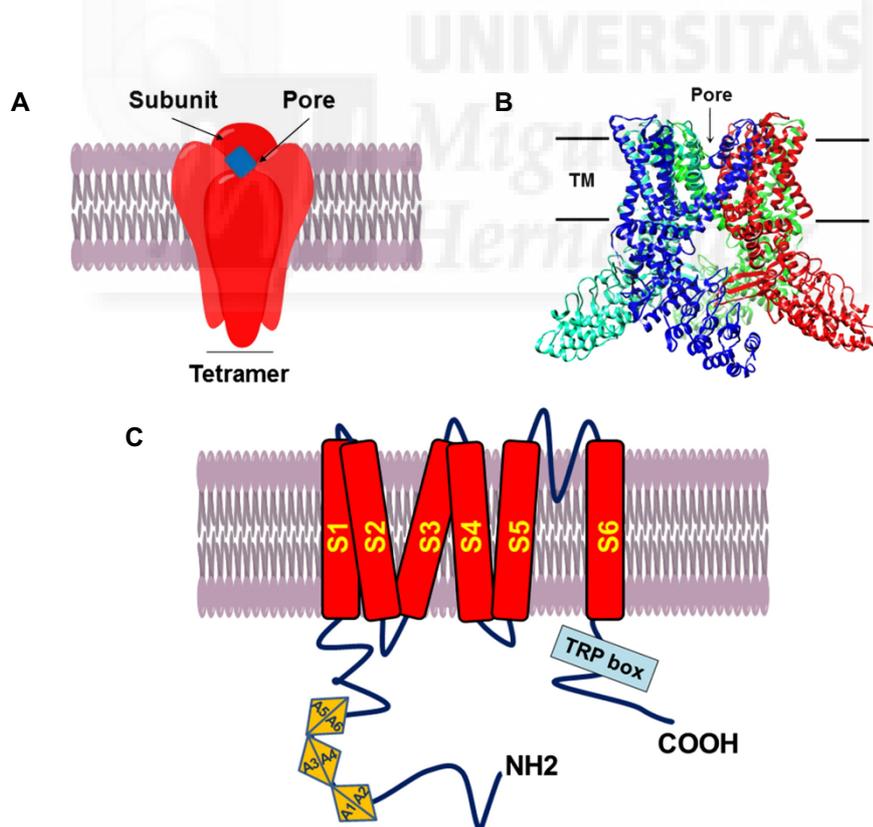


Figura 3 | Estructura molecular del canal iónico TRPV1^[15]. (A) Esquema representativo del tetrámero TRPV1, el cual presenta cuatro subunidades idénticas en torno a un poro central. (B) Estructura cristalográfica de TRPV1 en estado cerrado determinada mediante crio-EM. El poro está formado por las hélices transmembrana (TM) S5 y S6, además de la región *loop* situada entre ambas. (C) Representación de una única subunidad proteica constituida por seis segmentos transmembrana (S1-S6), donde destaca la presencia del extremo N-terminal (junto a seis motivos de repeticiones de anquirina, ANCI) y el extremo C-terminal (en el cual se encuentra el dominio TRP característico de la superfamilia a la que pertenece).

En cuanto a su región intracelular, en ella podemos encontrar los extremos N-terminal y C-terminal. En el primero de ellos, los 432 aminoácidos constituyentes del extremo amino-terminal se caracterizan por la presencia de dominios de interacción proteína-proteína, entre ellos regiones ricas en prolina y seis motivos de repeticiones de anquirina (ANCI) determinados mediante cristalografía de rayos X de alta resolución, los cuales resultan esenciales para la función del canal. Por otro lado, el extremo carboxi-terminal se encuentra formado por 145 aminoácidos, entre los que contiene una secuencia de 25 residuos altamente conservados en la superfamilia TRP, conocida como dominio TRP. Esta región ha sido ampliamente descrita como un dominio importante en la apertura del canal; en concreto, incluye una región rica en prolina y una secuencia de seis residuos conservados denominada *TRP box*. Esta región ha sido relacionada con la detección de estímulos sensoriales y la apertura del poro, mientras el dominio TRP también lo ha sido con la tetramerización del canal, aunque este fenómeno continúa siendo una controversia, debido a que se han hallado otros motivos implicados en la asociación de subunidades del canal TRPV1^[16]. **Figura 3C**. Finalmente, se han encontrado interacciones entre este extremo C-terminal y ciertas proteínas, algunas implicadas en el tráfico de membranas, como *Snapin*, y otras en la estabilización del canal en la bicapa lipídica, como *Whirlin*^[17].

1.3.2. Modulación

La capsaicina ha suscitado un gran interés durante siglos debido a sus notables propiedades medicinales. El descubrimiento de su receptor, la proteína TRPV1, provocó el desarrollo de moduladores de su función, ya sean con actividad agonista o antagonista^[9,14]. Además de la capsaicina, otros compuestos vanilloides como la resiniferatoxina (RTX) son capaces de activar este tipo de canal. Posteriormente, se ha caracterizado a TRPV1 como un detector molecular de un amplio rango de estímulos nocivos, tanto físicos como químicos. De este modo, el "receptor de capsaicina" consiste en un nocisensor polimodal capaz de ser activado por voltaje, altas temperaturas (≥ 42 °C) y pH ácidos (≤ 6), además de una gran diversidad de ligandos químicos^[3,18]. **Figura 4A**.

El nocisensor TRPV1 presenta un papel crucial en la detección de diferentes estímulos fisicoquímicos. Por ello, se han realizado numerosos estudios de estructura-función con el fin de identificar los mecanismos de apertura subyacentes a su importancia en la nocicepción^[16]. De este modo, análogos de capsaicina y distintas especies animales insensibles a ella se han empleado para hallar el sitio de unión de compuestos vanilloides, localizado en un *loop* citoplásmico entre los segmentos transmembrana S2, S3 y S4. Además, recientemente otros estudios mediante criomicroscopía electrónica han identificado nuevas regiones las cuales contribuyen a definir este bolsillo de unión, entre ellas el *linker* S4-S5 y ciertos aminoácidos de S6^[19].

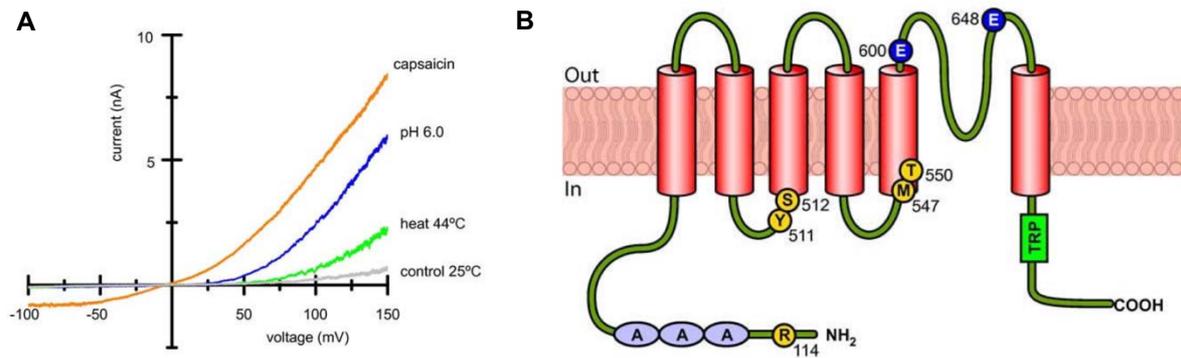


Figura 4 | Modulación del canal iónico TRPV1^[3]. (A) Relación I-V del receptor polimodal TRPV1, donde se muestran las corrientes de activación provocadas por capsaicina (100 nM), pH bajo (6.0) y calor (44 °C). (B) Representación esquemática de la topología de una subunidad proteica de TRPV1, el cual consiste en un homotetrámero constituido por cuatro subunidades de este tipo. Los residuos en amarillo se relacionan con la unión de capsaicina, mientras aquellos en azul son dos aminoácidos extracelulares implicados en la activación por protones (condiciones de pH ácidos).

Respecto a la respuesta de la proteína TRPV1 ante la presencia de protones (condiciones de pH ácidos), dos residuos glutamato extracelulares se han relacionado con esta sensibilidad al pH. El primero de ellos, E600, localizado al final de S5, es responsable de potenciar la apertura del canal bajo condiciones de pH bajos moderados; mientras el segundo, E648, situado en un *loop* entre S5 y S6, resulta crucial para la activación del canal debida a pH muy ácidos^[20]. **Figura 4B.** De modo similar a los protones, otros cationes son capaces de influir en la regulación de TRPV1, aunque su mecanismo de activación se ha relacionado con variaciones en cargas electrostáticas^[18].

Por otro lado, el receptor TRPV1 presenta una dependencia de voltaje muy reducida y, por ende, una probabilidad de apertura muy baja a potenciales de membrana fisiológicos, siendo las bases estructurales responsables de esta respuesta todavía inciertas. Sin embargo, la capsaicina y el calor son capaces de producir de forma paralela a su mecanismo de activación un desplazamiento en la dependencia de voltaje de TRPV1 hacia valores más negativos, permitiendo así la apertura del canal ante potenciales fisiológicos. Este hecho ha permitido la identificación de residuos tanto ácidos como básicos localizados en S4 y el *linker* S4-S5, cuya sustitución es capaz de alterar la activación por voltaje de esta proteína^[21].

Finalmente, a pesar de numerosos esfuerzos realizados en la determinación de aquellas regiones responsables de la sensibilidad de TRPV1 frente a la temperatura, todavía no se encuentra conocida por completo. Algunos autores relacionan los extremos N-terminal y C-terminal con esta respuesta, mientras otros sugieren que se trata de una propiedad íntegra de este termorreceptor, sin existir regiones proteicas específicas involucradas^[16,22].

1.3.3. Desensibilización

Una propiedad importante del canal iónico TRPV1, sobre todo en su aplicación como diana terapéutica, es su desensibilización. Este fenómeno es definido como *una disminución en la actividad de un canal iónico a causa de su estimulación prolongada durante un periodo de tiempo*. Sin embargo, este periodo puede ser rápido (durante la aplicación continua de un modulador del canal con actividad agonista, conocido como desensibilización) o lento (mediante la adición de dicho agonista en dosis repetidas, tratándose de un fenómeno distinto denominado taquifilaxis)^[14].

En cuanto a su mecanismo molecular, se ha sugerido la vía de señalización Ca^{2+} /calmodulina como responsable de este fenómeno, ya que el bloqueo de una región localizada en el extremo C-terminal y encargada de interactuar con esta proteína da lugar a la inhibición parcial de la desensibilización^[23].

1.3.4. Localización tisular

Una gran diversidad de tejidos presentan la capacidad de expresar el nocisensor TRPV1. Sus niveles más altos se encuentran en neuronas somatosensoriales primarias, cuyos cuerpos celulares se localizan en ganglios de la raíz dorsal (DRG), ganglios del trigémino (TG) y ganglios nodosos (NG)^[11]. Además, el canal TRPV1 se expresa de manera predominante en neuronas peptidérgicas y, en menor extensión, en nociceptores no peptidérgicos de diámetro pequeño y mediano. En cuanto a las primeras, las neuronas peptidérgicas presentan una gran importancia en el desarrollo de la inflamación y el dolor neurogénico; en cambio, las neuronas no peptidérgicas desempeñan un papel fundamental en la mediación del dolor crónico. Esta proteína también se encuentra en diversas regiones del cerebro, incluyendo hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral, hipocampo o tálamo. En último lugar, este canal se ha localizado incluso en tejidos no neuronales, ya sean queratinocitos de la epidermis, urotelio de vejiga, músculo liso, granulocitos polimorfonucleares, células madre o macrófagos^[24].

1.3.5. Papel en mecanismos de transducción de señales nociceptivas

El canal iónico TRPV1 presenta un papel muy importante en procesos de nocicepción y transducción de señales dolorosas, especialmente en la etiología del dolor inflamatorio^[14]. Su extensa distribución celular y tisular, sobre todo en neuronas de diámetro pequeño y mediano del sistema nervioso periférico agrupadas en fibras A δ y C, junto al desarrollo de moduladores con actividad agonista y antagonista de su función, han potenciado el papel del nocisensor TRPV1 como diana terapéutica en la búsqueda de nuevos analgésicos, y con ello su caracterización farmacológica^[18,24].

A lo largo de los diferentes apartados de esta sección de *Introducción* se han detallado los motivos por los cuales el canal iónico TRPV1 presenta un papel crucial en el dolor nociceptivo. De este modo, estudios en ratones *knockout* para este receptor no solamente han revelado una pérdida completa de sensibilidad por la capsaicina, sino además una dificultad significativa en su habilidad para detectar y responder ante estímulos nocivos como el calor o la imposibilidad de desarrollar hiperalgesia tras la administración de capsaicina o adyuvante completo de Freund (CFA)^[13]. Sin embargo, la respuesta de este canal se encuentra potenciada por agentes proalgésicos o proinflamatorios, tales como bradiquinina, neurotrofinas o prostaglandinas, los cuales producen hipersensibilidad al calor^[25].

Durante un proceso inflamatorio, una amplia variedad de mediadores proinflamatorios son capaces de modular el receptor TRPV1, entre ellos citoquinas, pruritógenos, neuropéptidos o ATP^[26]. **Figura 5.** Estos mediadores activan sus receptores correspondientes expresados en neuronas sensoriales y producen, de este modo, una gran variedad de rutas de señalización intracelulares las cuales resultan en la activación de proteínas quinasas, como la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) o quinasas II dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII); y fosfolipasas, como la fosfolipasa C (PLC). Dichas proteínas son capaces de fosforilar y desfosforilar determinados residuos del nocisensor TRPV1, produciendo la sensibilización de estos canales. De este modo, generan cambios en la percepción del estímulo, es decir, aumentan su probabilidad de apertura bajo condiciones de potenciales de membrana normales o en respuesta a otros estímulos (incluyendo respuestas exageradas a estímulos nocivos medios y/o respuestas ante estímulos no nocivos, fenómenos conocidos como hiperalgesia y alodinia, respectivamente)^[6]. Por último, durante un proceso inflamatorio también se produce un aumento en la expresión de TRPV1, a su vez dando lugar a un mayor número canales en la membrana celular y, por ende, potenciando la señalización de dolor mediada por TRPV1. Así, estas entidades moleculares presentan un papel fundamental en el desarrollo del dolor crónico inflamatorio^[27].

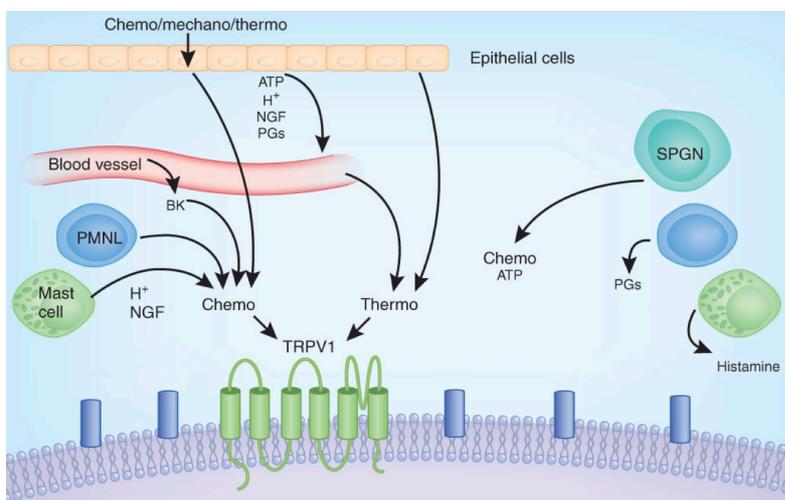


Figura 5 | Sensibilización del receptor TRPV1 debido a diferentes estímulos^[26].

Los mecanismos de transducción consisten en rutas tanto directas como indirectas. El canal iónico TRPV1 puede ser activado directamente por calor o indirectamente a través de compuestos químicos producidos por diversos tipos celulares, entre ellos células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares (PMNL), mastocitos o neuronas simpáticas postganglionares (SPGN). Estas células son capaces de liberar factores de crecimiento nervioso (NGF), histamina, prostaglandinas (PG), bradiquininas (BK) u otros mediadores proinflamatorios.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El descubrimiento y comercialización de nuevos analgésicos es un proceso largo y costoso. Hoy en día, los principales fármacos analgésicos distribuidos son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los narcóticos^[8]. A pesar de esta dificultad, la industria farmacéutica busca nuevas rutas patológicas implicadas en dolor, con el objetivo de conseguir fármacos con un mejor índice terapéutico, es decir, cuya eficacia y/o seguridad sea superior a la presentada por los tratamientos descritos en la actualidad.

Los canales iónicos, entre ellos los conocidos como termoTRP, han sido entidades moleculares de gran interés en la búsqueda de nuevos analgésicos debido a su capacidad de promover la actividad y sensibilización de neuronas nociceptivas mediante la transducción de estímulos nocivos de naturaleza mecánica, térmica y química^[9]. En concreto, el nocisensor TRPV1 ha sido validado como una diana terapéutica potencial para el desarrollo de este tipo de compuestos, ya sea por su expresión en una amplia diversidad de tejidos, permitiendo su implicación en el tratamiento de patologías muy distantes, como por su actividad influenciada por una amplia diversidad de ligandos químicos, desde moduladores con actividad agonista o antagonista de su función hasta diferentes mensajeros secundarios relacionados con vías de señalización intracelulares^[11].

La aplicación de capsaicina por vía tópica se ha empleado durante muchos años en el tratamiento de dolor de origen periférico (en neuropatías, mastectomías, amputaciones o cáncer de piel, entre otras enfermedades). Este agonista es capaz de producir inicialmente una sensación de dolor a causa de la activación de nociceptores, aunque a continuación da lugar a una desensibilización prolongada del receptor TRPV1, el cual será incapaz de ser activado por estímulos nocivos posteriores. Entre los productos comercializados actualmente se encuentran parches y cremas de capsaicina tópica, los cuales han mostrado efectos analgésicos, pero también inconvenientes asociados a la activación inicial del canal iónico, tales como ardor, prurito, irritación y disminución o pérdida de eficacia debido a la interrupción del tratamiento. Adicionalmente, estudios han demostrado que la aplicación de capsaicina de forma continua en pacientes de dolor crónico es potencialmente cancerígena^[28].

En cuanto a moduladores con actividad antagonista, una gran variedad de compuestos potentes y selectivos para el canal TRPV1 han demostrado eficacia en modelos animales de inflamación, osteoartritis, dolor neuropático, dolor asociado cáncer o dolor postoperatorio. No obstante, la mayoría de ellos presentan efectos adversos no deseados, entre ellos hipertermia. Los efectos hipertérmicos mostrados por estos antagonistas revelan que este receptor se encuentra implicado en rutas de regulación de la temperatura corporal, tratándose de un factor limitante en el desarrollo clínico de

este tipo de compuestos^[11]. Por último, a pesar de los efectos adversos indeseados, tanto moduladores con actividad agonista como antagonista de TRPV1 están siendo evaluados como potenciales analgésicos en diferentes ensayos clínicos^[5,29].

En conclusión, después del gran esfuerzo científico y económico realizado en los últimos años en la búsqueda y desarrollo de moduladores del canal iónico TRPV1, muy pocos compuestos han podido llegar a fase clínica y muchos de ellos han sido descartados al ser probados en humanos. Surge, por ende, la necesidad de identificación y validación de este tipo de compuestos moduladores en el desarrollo de fármacos analgésicos.

De este modo, en este trabajo se identifican nuevos compuestos con potencial actividad analgésica a través de una plataforma de cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening, HTS*). Dichos compuestos se caracterizan por ser derivados hidrolizables de la capsaicina obtenidos de manera sintética, los cuales constituyen una quimioteca cuya finalidad reside en ser capaces de actuar a nivel local, evitando su distribución sistémica con el fin de no presentar efectos secundarios indeseados. A diferencia de la capsaicina, esta quimioteca ha sido diseñada mediante la inserción de un grupo éster en la región intermedia lipofílica de los capsaicinoides, dando lugar a la desactivación tópica del compuesto *in situ* por la actividad hidrolítica de las enzimas esterases presentes en la piel. Por tanto, esta estrategia permite una rápida metabolización de los moduladores y consecuentemente una minimización en el número de efectos adversos no deseados asociados a la manipulación sistémica del nocisensor TRPV1.

En este contexto, se fijan los objetivos del trabajo:

- Aplicar los conocimientos teóricos cursados a lo largo del grado a nivel práctico en un laboratorio de investigación científica.
- Descubrir nuevos compuestos moduladores con actividad agonista y antagonista del canal iónico TRPV1 mediante una plataforma de cribado de alto rendimiento.
- Caracterización de propiedades farmacológicas (potencia, citotoxicidad y selectividad) de compuestos seleccionados como posibles candidatos analgésicos con el fin de evaluar su potencial terapéutico.
- Análisis *in silico* del bolsillo de unión vanilloide de la proteína TRPV1 y predicción de parámetros teóricos característicos de la unión ligando-receptor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sistemas celulares

A lo largo de la caracterización farmacológica de moduladores del canal iónico TRPV1 se han empleado diversas líneas celulares con el objetivo de llevar a cabo la determinación de la actividad de los compuestos y el posterior estudio de algunas de sus propiedades más importantes a tener en cuenta en la búsqueda de nuevos analgésicos, las cuales serán analizadas a lo largo de este trabajo.

Para la realización del cribado inicial y determinación de la potencia de aquellos compuestos seleccionados, se empleó una técnica fluorométrica basada en una sonda sensible a calcio, además de la línea celular SH-SY5Y-VR1 procedente de neuroblastoma humano y transfectada con un plásmido de manera que exprese el receptor TRPV1 de rata de forma estable. Durante su mantenimiento, las células se cultivaron en monocapa en frascos de 25 mL a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera modificada con 5 % de CO₂. Dichas células se encontraban en presencia de medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) suplementado con 10 % (v/v) de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de solución de antibióticos penicilina-estreptomina, L-glutamina 2 mM y 0.4 µg/mL del antibiótico puromicina. Cuando la confluencia superaba el 90 %, las células eran tratadas con una solución al 0.05 % de tripsina-EDTA y se les daba un nuevo pase y/o se empleaban para la preparación de las placas de ensayo.

En cuanto a la línea celular modelo para el estudio de citotoxicidad de los compuestos indicados mediante ensayos de MTT, se utilizaron células HEK293-WT, las cuales consisten en células humanas embrionarias de riñón sin modificaciones genéticas adicionales (*wild-type*). Durante su mantenimiento, se siguieron las mismas condiciones y protocolos descritos para la línea celular anterior, a excepción del medio celular empleado, el cual se trató de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10 % (v/v) de FBS y 1 % de solución penicilina-estreptomina. En este caso, cuando su confluencia superaba el 90 % las células fueron tratadas con una solución al 0.25 % de tripsina-EDTA con el fin de dar lugar a un nuevo pase y/o a la realización de experimentos.

Finalmente, para la determinación de la selectividad de aquellos compuestos eficaces en la modulación del receptor TRPV1, se empleó la línea celular HEK293-CR1. De nuevo, consiste en una línea de células humanas embrionarias de riñón, pero en esta ocasión transfectadas con el ADN correspondiente al canal iónico TRPM8 de rata. Su mantenimiento y tripsinización, al igual que las características del medio celular empleado, fueron idénticas con respecto a la línea anterior.

3.2. Agonistas, antagonistas y quimioteca

Durante los ensayos realizados a lo largo de este trabajo, se recurrió al empleo de agonistas y antagonistas conocidos del canal iónico TRPV1, pudiendo emplearlos como controles positivos y negativos, respectivamente.

En cuanto a su agonista natural, el compuesto empleado fue la capsaicina. Para preparar las disoluciones correspondientes se utilizó tampón de ensayo 1X HBSS (*Hanks Balanced Salts Solution*) y se partió de una solución stock con una concentración de 33 mM resuspendida en dimetil sulfóxido (DMSO). En los ensayos realizados con capsaicina como control positivo, se realizaron con una disolución de dicho compuesto a una concentración de 10 μM . El antagonista consistió en rojo de rutenio (RR), preparado en 1X HBSS y empleado a concentraciones de 10 μM como control negativo en los experimentos correspondientes.

Por otro lado, durante los ensayos de selectividad en el receptor TRPM8 su agonista consistió en mentol como control positivo, a una concentración final de 100 μM en pocillo. El compuesto antagonista empleado fue N-(3-aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(tiofen-2-ilmetil)benzamida (AMTB), utilizándose como control negativo a una concentración en pocillo igual a 10 μM .

A continuación, uno de los elementos más importantes en un ensayo HTS es la quimioteca o librería de compuestos empleada durante el cribado. Para la realización de este trabajo, se partió de un total de 52 compuestos (denominados de C1 a C52), todos ellos basados en el anillo vanilloide de la capsaicina y modificados mediante la combinación de diferentes radicales a partir de una estructura química inicial, conocida como fórmula Markush (**figura 6**), obteniendo tanto agonistas como antagonistas del canal iónico a estudio. Además, a su estructura molecular se le ha añadido un enlace éster con el fin de que enzimas esterasas presentes en la piel puedan producir su hidrólisis, ya que la vía tópica será una de las formas de administración más importantes a tener en cuenta en la posible aplicación de estos capsaicinoides como futuros analgésicos, evitando de esta manera posibles efectos adversos indeseados.

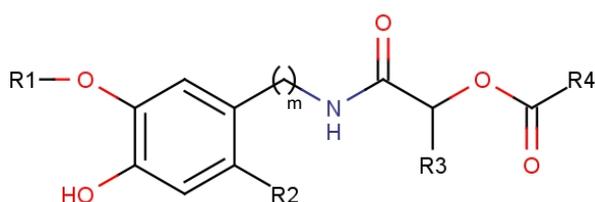


Figura 6 | Fórmula Markush. Estructura química común para los 52 compuestos constituyentes de la quimioteca empleada. Los radicales ($R\#$) corresponden a los diferentes sustituyentes, mientras m es un número entero entre 1 y 2.

La gran diversidad química de la librería de compuestos empleada presenta su origen en los numerosos sustituyentes capaces de unirse a la estructura inicial, destacando la importancia de R2, ya que en base al efecto conocido de la capsaicina y la 5-iodo-resiniferatoxina, la quimioteca está diseñada de manera que los compuestos con comportamiento agonista se caracterizan por la presencia de un átomo de hidrógeno en dicha posición, mientras aquellos que actúan como antagonistas presentan un átomo de yodo en este lugar del anillo vanilloide^[30]. Todas las combinaciones de diferentes radicales a partir de la estructura Markush, las cuales dan lugar a la formación de los 52 compuestos empleados a lo largo de este trabajo, pueden ser comprobadas en el **Anexo I**.

Para finalizar, la preparación de los compuestos a estudio se realizó mediante su resuspensión en DMSO hasta alcanzar una concentración igual a 100 mM (stock) y posteriormente las diversas disoluciones se prepararon en dicho disolvente orgánico.

3.3. Técnicas fluorométricas basadas en sondas sensibles a calcio

La superfamilia de receptores TRP se compone, como se ha explicado a lo largo de la introducción, de canales iónicos los cuales permiten el paso no selectivo de diversos cationes, fundamentalmente Ca²⁺. Esta propiedad será empleada para, a través de técnicas fluorométricas basadas en sondas sensibles a dicho ion, llevar a cabo el cribado inicial y los posteriores estudios de potencia y selectividad.

3.3.1. Introducción a la técnica

Durante estos experimentos se empleó el kit de ensayo Fluo-4 NW (*No-Wash*), un indicador fluorescente de iones Ca²⁺ ampliamente empleado en ensayos de alto rendimiento (HTS) para la determinación de agonistas y antagonistas relacionados con rutas celulares de señalización de iones calcio. Su principal ventaja es que no requiere ninguna etapa de lavado ni colorantes fluorescentes adicionales, siendo estable en soluciones con pH 7-7.5 durante varias horas.

Inicialmente, el kit incluye la sonda Fluo-4 AM, la cual se encuentra en su forma acetoximetil éster (no fluorescente), cuyo enlace será escindido en el interior celular dando lugar a su forma libre Fluo-4 (fluorescente verde). Por ello, se emplea junto a un detergente de baja toxicidad conocido como *probenecid*, con el fin de facilitar la carga de las células con el indicador. Además, este compuesto es un inhibidor de transportadores de aniones orgánicos, permitiendo reducir la pérdida de fluorescencia debida a la salida de la sonda hacia el exterior celular a través de dichos transportadores.

A continuación, una vez la sonda se haya introducido en el interior celular, las esterases allí presentes se encargarán de su activación, permitiendo su unión a iones calcio y finalmente dando lugar a un incremento en la fluorescencia. La sonda molecular Fluo-4 presenta una longitud de onda de excitación de 494 nm y de emisión de 516 nm, además de elevada sensibilidad. De este modo, la adición de un modulador con actividad agonista producirá la apertura del receptor TRPV1 y en consecuencia un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, provocando un aumento en la fluorescencia emitida por la sonda Fluo-4. Por el contrario, un compuesto antagonista del canal iónico a estudio provocará su cierre y por tanto un bloqueo en la entrada de iones calcio al interior celular, imposibilitando la observación del incremento en la señal de fluorescencia.

De este modo, aquellos cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular producirán las variaciones correspondientes en la intensidad de fluorescencia, permitiéndonos el estudio del paso de iones calcio a través del receptor TRPV1 y, por ende, la aplicación de esta técnica fluorométrica en la búsqueda de moduladores de actividad del canal iónico a estudio durante el cribado y posterior determinación de la potencia y selectividad de aquellos compuestos seleccionados.

3.3.2. Metodología

Como se introdujo anteriormente en la sección de *Sistemas celulares*, la línea celular empleada para los ensayos HTS mediante la sonda Fluo-4 NW fue SH-SY5Y-VR1. Estos ensayos se realizan en placas de 96 pocillos, tratadas anteriormente con una solución 0.01 % de poli-L-lisina para permitir la adhesión celular y a continuación se siembran las células a una densidad inicial de 40 000 células por pocillo. Posteriormente, se incuban en presencia de su medio celular correspondiente durante un periodo de 72 horas previo a la realización del experimento.

En lo que respecta a la caracterización de la selectividad de los compuestos seleccionados, también realizada mediante esta técnica fluorométrica, la línea celular utilizada se trató de HEK293-CR1. En esta ocasión, las células se siembran en placas de 96 pocillos, tratadas previamente con una solución 0.01 % de poli-L-lisina, a una densidad inicial de 30 000 células por pocillo. A continuación, se incuban junto a su medio celular correspondiente durante un periodo de 72 horas hasta la realización del ensayo.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, se retira el medio celular, se añaden 100 μL de sonda en cada pocillo y la placa se incuba durante un periodo de 1 hora a diferentes temperaturas (30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 30 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$).

Finalmente, la intensidad de fluorescencia emitida por las células en función de la acción del compuesto añadido al pocillo correspondiente es medida a través del espectrofotómetro lector de placas POLARstar Omega (BMG LABTECH GmbH). El interior del lector mantiene una temperatura interna constante e igual a 30 °C y realiza 20 ciclos de medida durante cada ensayo. Tras las medidas correspondientes a los 3 primeros ciclos, se añaden manualmente los compuestos a estudio en sus concentraciones deseadas, además del control negativo en los pocillos seleccionados (rojo de rutenio, 10 µM). A continuación, el instrumento continúa con la realización del resto de ciclos de medidas hasta el número 10, tras el cual se inyecta automáticamente el compuesto agonista (capsaicina, 10 µM) a todos los pocillos que componen la placa, continuando con las medidas de fluorescencia hasta finalizar tras el ciclo 20.

El diseño del protocolo descrito permite la obtención de controles positivos y negativos en cada uno de los ensayos. En primer lugar, el control positivo se obtiene tras la inyección de agonista al finalizar el ciclo 10 en aquellos pocillos en los que previamente no se haya adicionado ningún otro compuesto, obteniendo por tanto un incremento en la intensidad de fluorescencia mostrada en el ciclo 11. Por otro lado, el control negativo se caracteriza por la ausencia de aumentos significativos tras dicha inyección de capsaicina, a causa de la adición previa de un antagonista conocido (rojo de rutenio) entre los ciclos número 3 y 4. **Figura 7.**

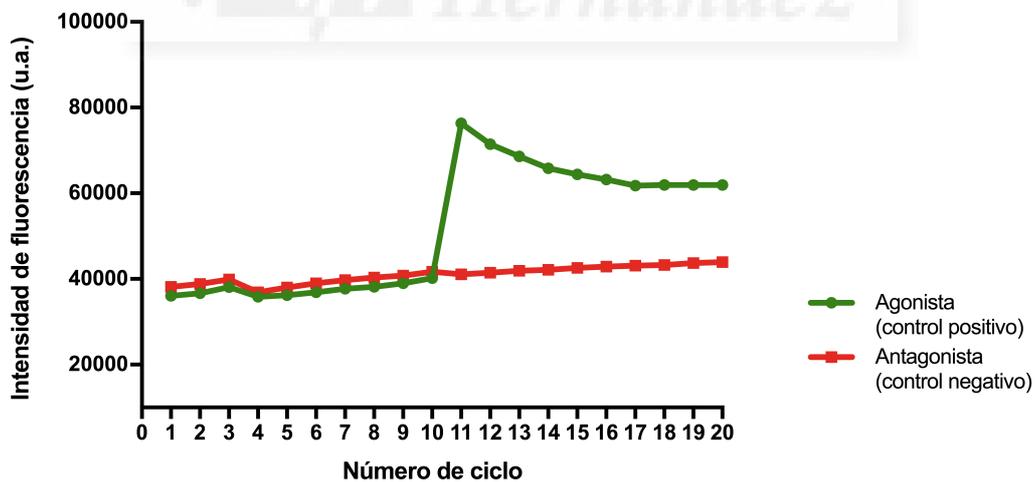


Figura 7 | Esquema de la obtención de controles positivo y negativo. La serie verde, correspondiente al control positivo, se obtiene mediante la adición del agonista capsaicina tras el ciclo 10, produciéndose un aumento en la intensidad de fluorescencia a partir del ciclo 11. Por otro lado, la serie roja hace referencia al control negativo, en la cual debido a la presencia del antagonista rojo de rutenio tras el ciclo 3, no se permite la acción específica del agonista introducido, continuando la intensidad de fluorescencia en sus niveles basales a lo largo de los 20 ciclos del ensayo.

3.3.3. Procesado de datos

Una vez finalizadas las medidas de intensidad de fluorescencia durante 20 ciclos, se realizó el análisis de los resultados mediante la ayuda del programa informático Microsoft Excel. Además, para determinar la fiabilidad y la validación de los resultados, se utilizó un parámetro estadístico denominado factor Z ^[31]. Este valor fue descrito con el fin de poder evaluar ensayos HTS, debido a la gran dificultad de comparar directamente la calidad de distintos experimentos. Consiste en un coeficiente adimensional, único para cada ensayo HTS, cuya expresión matemática es:

$$\text{factor } Z = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_+ + \sigma_-)}{|\mu_+ - \mu_-|}$$

donde: σ , desviación estándar; μ , media aritmética; +, control positivo; -, control negativo.

De este modo, el factor Z puede ser calculado a partir de los cambios en la intensidad de fluorescencia registrados tras la inyección de agonista en ausencia o presencia de antagonista, es decir, a partir de los controles positivo y negativo, respectivamente. La resta de sus medias aritméticas representa el rango dinámico del ensayo, es decir, la banda de separación entre datos. Esta banda o distancia entre medias deberá ser lo suficientemente grande con el fin de evitar errores debidos a la variabilidad entre datos, la cual vendrá determinada por las desviaciones estándar de los controles positivo y negativo. De este modo, se consideran ensayos de alto rendimiento válidos aquellos en los cuales el valor calculado para el factor Z se encuentra entre 0.5 y 1.

A continuación, una vez comprobado el factor Z del ensayo realizado y por tanto su fiabilidad, el siguiente paso fue el estudio de los resultados mostrados por cada uno de los compuestos ensayados. Para ello, se representó la intensidad de fluorescencia obtenida frente a cada uno de los ciclos de medidas realizadas, teniendo en cuenta que los compuestos se añadían manualmente tras el ciclo 3, tal y como se ha descrito anteriormente. De este modo, se determinaron aquellos compuestos que presentaron actividad agonista o antagonista, ya que los primeros eran capaces de mostrar un aumento significativo de fluorescencia en el ciclo 4, mientras los segundos no permiten la aparición de dicha subida en la intensidad de fluorescencia tras la adición de capsaicina de manera automática tras finalizar el ciclo 10. **Figura 8.**

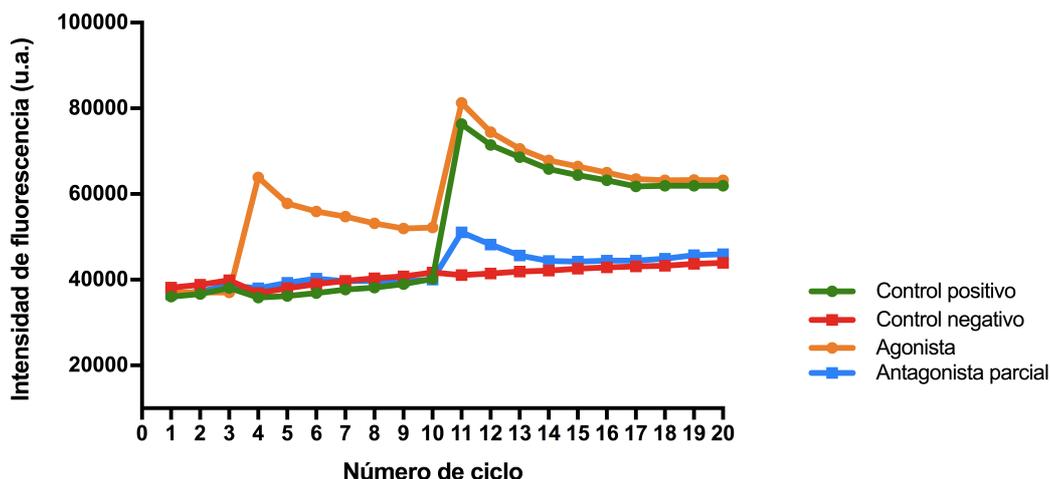


Figura 8 | Esquema de la identificación de moduladores con actividad agonista y antagonista. La serie verde y roja corresponden a los controles positivo y negativo, respectivamente. La serie naranja hace referencia a un compuesto agonista, debido a que su adición tras el ciclo 3 provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia. Por último, la serie azul corresponde a un compuesto antagonista parcial, ya que su presencia tras el ciclo 3 produce que la adición del agonista capsaicina produzca un incremento en la fluorescencia a partir del ciclo 11, pero de manera reducida con respecto al control positivo.

Posteriormente, se determinó el porcentaje de activación o bloqueo del canal iónico TRPV1 para cada uno de los compuestos agonistas o antagonistas, respectivamente. Para su cálculo se emplearon las siguientes ecuaciones, donde la intensidad de fluorescencia control corresponde a la activación del receptor producida por la capsaicina, su agonista conocido y control positivo.

$$\% \text{ activación} = \frac{\mu(IF_{\text{ciclo } 4} - IF_{\text{ciclo } 3})}{\mu(\Delta IF_{\text{control}})_{\text{ciclo } 11 - \text{ciclo } 10}} \cdot 100$$

$$\% \text{ bloqueo} = 1 - \frac{\mu(IF_{\text{ciclo } 11} - IF_{\text{ciclo } 10})}{\mu(\Delta IF_{\text{control}})_{\text{ciclo } 11 - \text{ciclo } 10}} \cdot 100$$

En lo que respecta a la caracterización de la potencia de los compuestos seleccionados, de nuevo se empleó la técnica fluorométrica descrita anteriormente junto con la sonda Fluo-4 NW, aunque en esta ocasión los compuestos ensayados se estudiaron a diferentes concentraciones deseadas. Del mismo modo, también se calcularon sus porcentajes de activación o bloqueo correspondientes y, finalmente, se realizó la representación gráfica de los porcentajes obtenidos en función del logaritmo de las diversas concentraciones de compuesto (escala semilogarítmica), mediante el programa de cálculo GraphPad Prism 7. Por último, con el fin de ajustar la sigmoide de la curva dosis-respuesta obtenida y determinar los valores de potencia, esta herramienta aplica la ecuación de Hill (también conocida como ecuación logística de tres parámetros), la cual consiste en la expresión matemática:

$$Y = Y_{max} + \frac{(Y_{max} - Y_{min})}{1 + 10^{\log K - X}}$$

donde X es el logaritmo de la concentración de compuesto ensayado e Y la respuesta obtenida. La variable Y_{max} hace referencia al máximo efecto, mientras Y_{min} al mínimo observado. El valor EC50 o IC50 (*half-maximal effective or inhibitory concentration*, concentración a la cual producen un 50 % de activación o inhibición ya sean moduladores con actividad agonista o antagonista, respectivamente) se calcula a partir del término $\log K$.

3.4. Ensayo de MTT

Tras la finalización de los ensayos descritos en el apartado anterior, se estudió el posible efecto citotóxico de aquellos compuestos seleccionados, con el fin de conocer mejor algunas de las propiedades de cada una de las moléculas estudiadas, como su toxicidad, y avanzar en la identificación de aquellas con mayor potencial para su desarrollo posterior.

Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante un método colorimétrico, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando lugar a un compuesto de color azul denominado formazán. De este modo, se determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y, en consecuencia, nos permite medir la supervivencia y proliferación celular, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido^[32].

3.4.1. Metodología

En este ensayo se emplean placas transparentes de 96 pocillos, previamente tratadas con una solución 0.01 % de poli-L-lisina para permitir la adhesión celular y a continuación sembradas con células pertenecientes a la línea HEK293-WT a una densidad de 10 000 células por pocillo. A continuación, se incuban en presencia de su medio celular correspondiente durante un periodo de 24 horas, a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera modificada con un 5 % de CO₂.

Los compuestos ensayados se preparan en DMSO a las distintas concentraciones finales deseadas (hasta cuatro órdenes de magnitud superior a su valor EC50 o IC50). En los pocillos correspondientes al control positivo (control vehículo) no se añade ningún compuesto a ensayar, sino que en su lugar se adiciona 1 µL de DMSO, mientras en aquellos pocillos empleados como control negativo (control de

muerte celular) de nuevo no se añade ningún modulador sino tampón de lisis RIPA. Posteriormente, las células se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir que los compuestos actúen en todas las células y durante un amplio periodo, en caso de que su acción citotóxica afecte a una fase específica del ciclo celular.

Tras la preparación de una solución a 5 mg/mL de MTT en PBS, se añaden 5 µL de ésta a todos los pocillos de la placa de ensayo. De nuevo, las células se incuban durante un periodo de 4 horas a 37 °C para permitir la formación de los cristales de formazán producido por las mitocondrias metabólicamente activas de las células vivas. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se retira el contenido de cada pocillo para añadir finalmente 100 µL de DMSO puro, el cual permite que los cristales formados se disuelvan tras unos 10 minutos a temperatura ambiente, favoreciendo una correcta medición.

Por último, se procede a la determinación de la absorbancia de los 96 pocillos de la placa de ensayo mediante el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG LABTECH GmbH). Esta lectura se realiza a una longitud de onda de 570 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

En lo que respecta al procesado de datos, el porcentaje de viabilidad celular se calcula siguiendo la ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{absorbancia}_{\text{células tratadas}}}{\text{absorbancia}_{\text{células control positivo}}} \cdot 100$$

3.5. Modelado molecular

Las herramientas de modelado molecular nos permiten realizar una gran variedad de experimentos *in silico*, aportando predicciones de gran ayuda en ensayos HTS. Entre sus posibilidades, el acoplamiento molecular (*docking*) consiste en un método computacional capaz de predecir la orientación preferida de dos moléculas cuando están unidas entre sí dando lugar a un complejo estable. De este modo, en este trabajo se han empleado los programas informáticos necesarios para estudiar, tanto visual como teóricamente, la interacción entre cada uno de los compuestos seleccionados de la quimioteca inicial y el canal iónico TRPV1 (es decir, interacciones ligando-receptor).

3.5.1. Metodología

En primer lugar, se realizó un acoplamiento global entre la estructura cristalográfica del receptor TRPV1 y la capsaicina, con el fin de determinar su sitio de unión y a partir de él predecir las interacciones del canal iónico con el resto de compuestos seleccionados, ya que sus estructuras moleculares derivan de dicho agonista. Para ello, se obtuvo de la base de datos *RCSB Protein Data Bank* la estructura de TRPV1 determinada en nanodiscos lipídicos mediante microscopía electrónica (PDB ID: 5IRZ; resolución: 3.28 Å; organismo: *Rattus norvegicus*)^[33]. Las estructuras químicas correspondientes tanto a la capsaicina como al resto de compuestos de la quimioteca empleadas en modelado molecular fueron creadas, modificadas y visualizadas con el programa informático Marvin.

A continuación, para llevar a cabo el acoplamiento se empleó un programa específico denominado YASARA, junto con los archivos anteriores necesarios y un *script* previamente modificado. Dicho *script* se configuró para utilizar el método AutoDockLGA, 500 ejecuciones (*flexible docking runs*) y utilizar el ligando flexible manteniendo el receptor rígido^[34]. Los resultados obtenidos finalmente se analizaron y representaron mediante el programa informático PyMOL.

Los resultados correspondientes al primer acoplamiento permitieron la creación de una celdilla de simulación, de un tamaño de 10 Å en torno a la posición de la capsaicina con mayor energía de unión, a partir de la cual poder realizar acoplamientos locales con cada uno de los compuestos deseados. De nuevo, se empleó el programa YASARA, aunque en esta ocasión su *script* fue modificado para realizar 300 ejecuciones y un acoplamiento semiflexible. Este método se caracteriza por emplear el ligando flexible, es decir, permitiendo la movilidad de los enlaces rotables presentes en su estructura molecular, mientras el esqueleto y la mayoría de cadenas laterales de los residuos correspondientes a la estructura del receptor permanecen rígidos. De este modo, las cadenas laterales indicadas como flexibles de la proteína TRPV1 corresponden a los aminoácidos Y511 y T550 de la subunidad C del tetrámero, debido a que numerosos trabajos sugieren a estos dos residuos como unos de los más influyentes en la unión. En concreto, comparaciones entre proteínas TRPV1 de rata (sensible a capsaicina) y pollo (insensible), concluyeron que el residuo Y511 de la hélice transmembrana S3 era esencial para la interacción proteína-ligando^[35]. Además, otras comparaciones entre rata (sensible) y conejo (insensible), condujeron a la identificación de la mutación puntual T550I en S4 como causante de la disminución en la unión de capsaicina^[36].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cribado y primera selección

Los 52 compuestos pertenecientes a la quimioteca empleada a lo largo de este trabajo fueron sometidos a un cribado inicial mediante técnicas fluorométricas, tal y como se detalla en su apartado correspondiente de *Materiales y métodos*. De este modo, se determinó el porcentaje de efecto sobre el canal iónico TRPV1 para cada una de las moléculas ensayadas, permitiendo además realizar su distinción en moduladores con actividad agonista o antagonista. **Anexo I. Figura 9.**

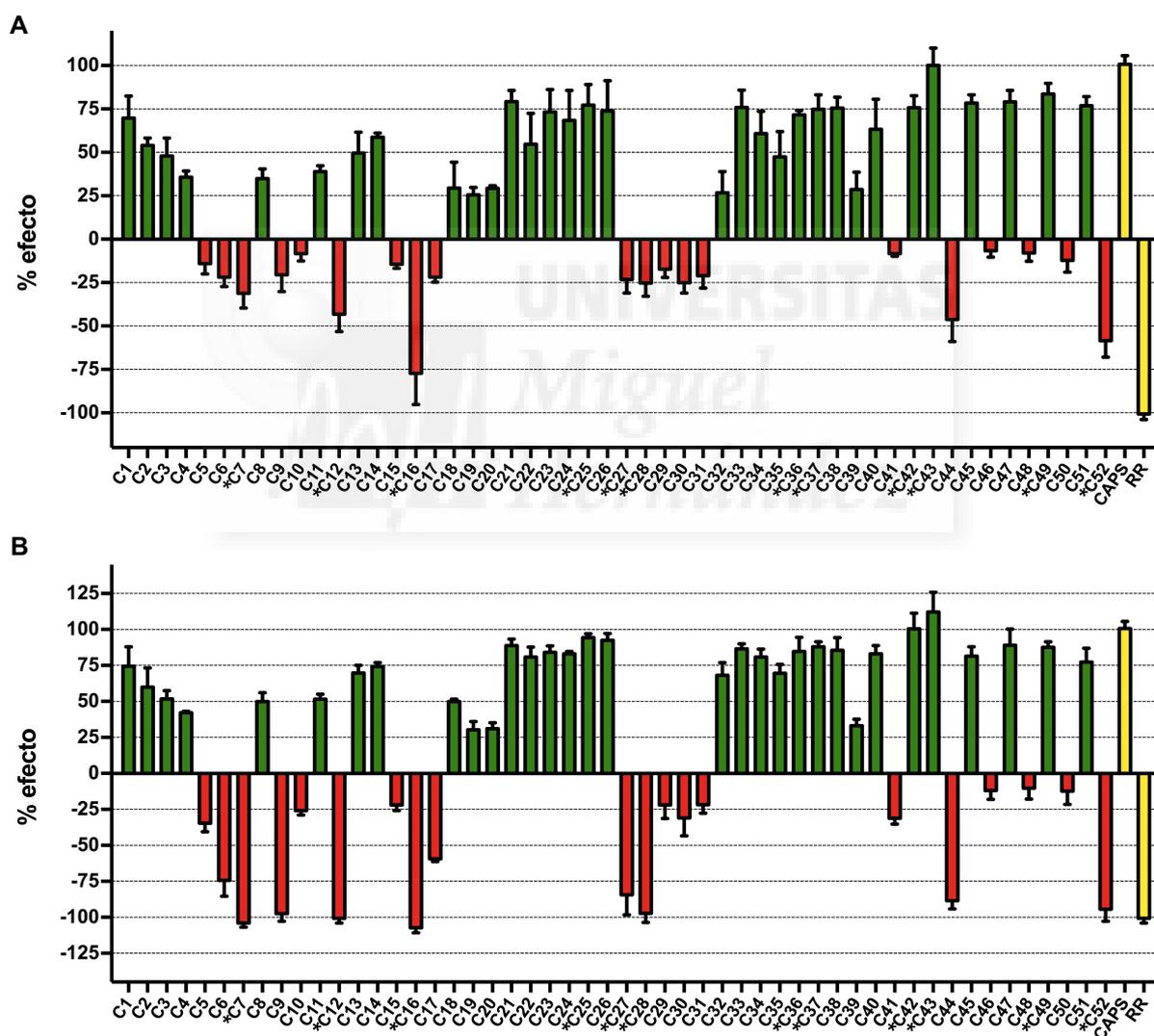


Figura 9 | Cribado de la quimioteca en el receptor TRPV1. Representación de los resultados obtenidos para cada uno de los 52 compuestos constituyentes de la quimioteca a una concentración de (A) 10 µM y (B) 100 µM. En verde aparecen los moduladores con actividad agonista, mientras en rojo lo hacen aquellos con actividad antagonista; en amarillo se muestran los controles positivos (capsaicina, 10 µM) y negativos (rojo de rutenio, 10 µM). Cada barra representa su resultado normalizado con respecto al control positivo en % de efecto medio \pm SD; $n = 3$, $N \geq 3$, $0.5 < \text{factor } Z < 1$. El símbolo * hace referencia a los compuestos seleccionados para continuar con su caracterización farmacológica.

Los resultados obtenidos han permitido una rápida evaluación del comportamiento de distintos moduladores, además de su distinción en 32 agonistas y 20 antagonistas del canal iónico a estudio. De este modo, los datos obtenidos convierten a la técnica descrita como una plataforma de cribado de alto rendimiento (HTS) idónea para la búsqueda de compuestos moduladores del receptor TRPV1. Asimismo, la baja variabilidad en los resultados y valores del factor Z obtenidos en cada experimento demuestran su reproducibilidad. No obstante, esta técnica fluorométrica no solamente aporta información para la identificación de compuestos moduladores, sino también permite la caracterización de su potencia y selectividad, tal y como será discutido posteriormente.

En definitiva, la técnica fluorométrica basada en una sonda sensible a calcio empleada para la realización del cribado inicial permite incrementar la velocidad de descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas. Sin embargo, tan solo proporciona una identificación primaria de dichos compuestos, ya que sus limitaciones no permiten el estudio de cinéticas de apertura y cierre de canales iónicos, los mecanismos de acción o la reversibilidad del bloqueo producido por aquellos compuestos con actividad antagonista.

A continuación, el número de moduladores a estudio se redujo de 52 a 12 mediante una primera selección en base a los resultados obtenidos durante el cribado mediante fluorescencia, teniendo en cuenta el porcentaje de efecto mostrado a concentraciones de 10 y 100 μM . En esta selección se determinaron 6 agonistas (C25, C36, C37, C42, C43 y C49) y 6 antagonistas (C7, C12, C16, C27, C28 y C52) para continuar con el resto de ensayos correspondientes a su caracterización farmacológica.

4.2. Potencia (EC50 e IC50)

El siguiente ensayo realizado en este trabajo consistió en la determinación de los valores EC50 e IC50 para cada uno de los compuestos seleccionados en el apartado anterior. Para ello, se recurrió de nuevo a las técnicas fluorométricas descritas, obteniendo el porcentaje de actividad o bloqueo del receptor TRPV1 a concentraciones crecientes de moduladores agonistas o antagonistas, respectivamente. Finalmente, se realizaron las curvas dosis-respuesta correspondientes, obteniendo las sigmoides a partir de las cuales obtener los valores de potencia deseados, previa aplicación de un ajuste mediante la ecuación de Hill. **Tabla 1.**

Agonistas (EC50 ± SD, μM)		Antagonistas (IC50 ± SD, μM)	
C25	0.17 ± 0.06	C7	11.58 ± 4.55
C36	0.28 ± 0.08	C12	0.86 ± 0.51
C37	0.08 ± 0.03	C16	0.32 ± 0.25
C42	0.33 ± 0.07	C27	11.04 ± 3.52
C43	1.05 ± 0.19	C28	14.96 ± 6.07
C49	0.03 ± 0.01	C52	6.82 ± 1.38

Tabla 1 | Determinación de la potencia de los compuestos seleccionados. Resultados obtenidos para los valores EC50 e IC50 de moduladores con actividad agonista o antagonista, respectivamente.

La determinación de la potencia de los compuestos seleccionados permite la identificación de aquellos moduladores con propiedades más adecuadas para su posible aplicación terapéutica. En cuanto a los resultados de agonistas, destaca la potencia mostrada por C37 y C49, ambos con valores EC50 en un rango inferior a 0.10 μM. **Figura 10A.** Por tanto, estos compuestos presentan mayor potencia con respecto al resto de moduladores agonistas caracterizados, donde se encuentra C43 como la molécula menos potente. Sin embargo, la potencia mostrada por todos los agonistas es superior a la definida para la capsaicina, cuyo valor EC50 es igual a 1.55 μM^[37].

La capsaicina de aplicación tópica se encuentra en uso clínico durante muchos años para el tratamiento de dolor crónico, pudiendo encontrar actualmente diversos compuestos comerciales y en distintas fases clínicas basados en este ligando natural del canal TRPV1. Entre ellos, *Qutenza Astellas* consiste en un parche dérmico con un 8 % de capsaicina que se utiliza para tratar el dolor neuropático, mientras *Civamide* es un isómero *cis* de la capsaicina, empleado como fármaco de uso tópico para el dolor artrítico, el cual se encuentra en fase III de ensayos clínicos. La capsaicina *Adlea (AlgrX-4975)* es un inyectable intra-articular indicado para tratar diversas condiciones de dolor que también se encuentra en fase III de sus ensayos clínicos correspondientes^[11]. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de dolor crónico es controvertida debido a sus efectos secundarios no deseados. Estudios han demostrado que la aplicación de capsaicina por vía tópica produce, además de sensación de ardor, prurito o irritación, un incremento en el riesgo de cáncer de piel tras su empleo continuo^[28].

Con el objetivo de evitar la acumulación de capsaicina y sus derivados, y por tanto minimizar la generación de efectos adversos indeseados, la quimioteca empleada a lo largo de este trabajo se ha diseñado mediante la síntesis de análogos de capsaicina, pero con la característica adicional de la presencia de un enlace éster hidrolizable *in situ* por las enzimas esterasas presentes en la piel.

De este modo, a diferencia de los productos comerciales basados en capsaicina comentados, los moduladores con actividad agonista del receptor TRPV1 caracterizados en este trabajo serán potencialmente capaces de reducir los efectos secundarios producidos por la activación de dicho canal, además de sus valores de potencia superiores, lo cual los convierte en nuevos fármacos candidatos para su aplicación clínica en el tratamiento del dolor.

Por otro lado, los compuestos antagonistas también se han empleado para tratar el dolor, aunque su administración en humanos se encuentra limitada debido a la aparición de efectos adversos severos, entre ellos hipertermia^[11]. Un ejemplo son las moléculas *SB-705498* y *AS-192837*, las cuales inducen antinocicepción en ratas sin presencia de efectos hipertérmicos, presentando valores IC50 iguales a 0.30 y 0.88 μM , respectivamente^[29].

Algunos de los compuestos antagonistas estudiados muestran valores IC50 superiores a 10 μM , entre ellos C7, C27 y C28. No obstante, destaca la potencia presentada por los moduladores C12 y C16, ambos con valores IC50 en un rango inferior a 1 μM . **Figura 10B**. En concreto, ambos muestran valores de potencia similares a los descritos para *SB-705498* (0.30 con respecto a $0.32 \pm 0.25 \mu\text{M}$ para C16) y *AS-192837* (0.88 con respecto a $0.86 \pm 0.51 \mu\text{M}$ para C12), lo cual apoya el desarrollo de estos compuestos como candidatos a nuevos fármacos contra el dolor mediante modulación de una diana común, el nocisensor TRPV1.

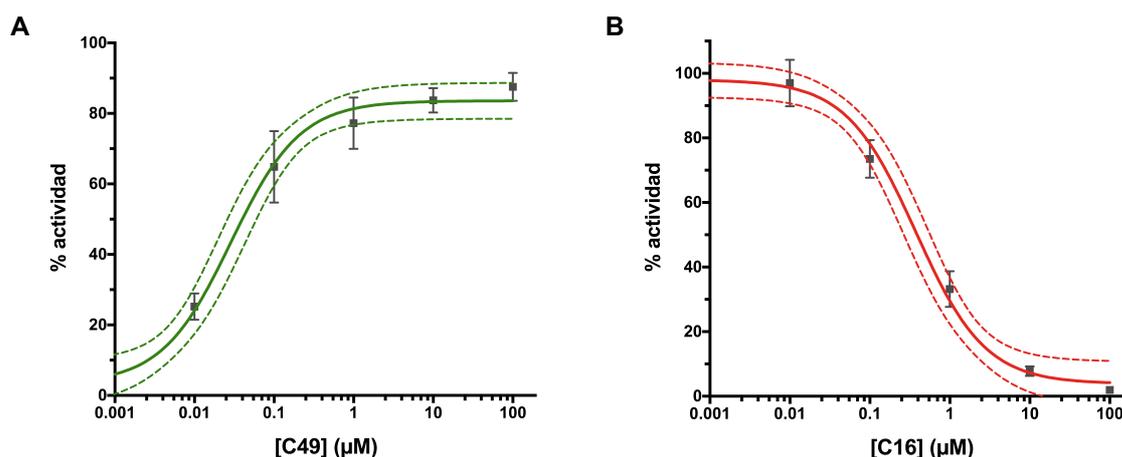


Figura 10 | Determinación de la potencia de los compuestos seleccionados. Curvas dosis-respuesta correspondientes a los dos moduladores de mayor potencia, en concreto **(A)** un agonista (C49, $EC_{50} = 0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$) y **(B)** un antagonista (C16, $IC_{50} = 0.32 \pm 0.25 \mu\text{M}$). Representación del porcentaje de actividad del canal TRPV1 en función del logaritmo de diferentes concentraciones de compuesto, donde cada punto muestra su resultado normalizado con respecto al control positivo en % de actividad medio \pm SD; $n = 3$, $N \geq 3$, $0.5 < \text{factor } Z < 1$. La línea continua representa la sigmoide ajustada por la ecuación de Hill, mientras la línea discontinua hace referencia a su intervalo de confianza al 95 %.

4.3. Citotoxicidad

Avanzando en la búsqueda de nuevos analgésicos, el siguiente paso consistió en el estudio de la toxicidad de cada uno de los compuestos seleccionados como potenciales moduladores de TRPV1. Para ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante MTT, empleando distintas concentraciones en base a la potencia obtenida para cada compuesto. **Figura 11.**

Con el fin de estudiar la citotoxicidad inespecífica producida por los diversos moduladores seleccionados y no causada por cambios en la homeostasis del calcio, estos experimentos fueron realizados empleando la línea celular HEK293-WT, la cual carece de modificaciones genéticas responsables de la sobreexpresión de la proteína TRPV1. Este receptor consiste en un canal catiónico no selectivo cuya apertura permite la entrada de iones Ca^{2+} al compartimento intracelular, mientras cambios en la homeostasis del calcio están relacionados con lesiones celulares. De esta manera, la citotoxicidad producida por aquellos compuestos con actividad agonista capaces de provocar la apertura del canal y en consecuencia la entrada de Ca^{2+} al interior celular será debida a la acumulación de estos iones en el citoplasma. En concreto, una desregulación en la concentración intracelular de Ca^{2+} resulta en una serie de fenómenos, como la activación de mecanismos de señalización o alteraciones en la estructura celular y la expresión génica, dando origen a la toxicidad celular y pudiendo finalizar en carginogénesis y muerte celular^[38].

En cuanto a los resultados obtenidos, en la mayoría de compuestos ensayados (a excepción de C42 y C52) solamente se observan diferencias significativas de viabilidad celular a partir de concentraciones de dos o tres órdenes de magnitud por encima de su valor de potencia determinado en el apartado anterior, para el cual no se observa ningún efecto tóxico significativo en ninguno de los moduladores estudiados.

Por último, a lo largo del desarrollo de un fármaco el estudio de su seguridad presenta un papel muy importante, por lo que los resultados obtenidos permiten continuar con la caracterización farmacológica de la mayoría de moduladores ensayados, debido a la ausencia de toxicidad significativa en el rango de concentraciones a las cuales son activos. Sin embargo, los compuestos C42 y C52 presentan un 86.73 ± 7.54 y 73.94 ± 8.01 % de viabilidad celular a concentraciones de 1 y 10 μM , respectivamente, lo cual no resulta adecuado para continuar con su desarrollo en lo que respecta a su futura aplicación clínica, debido a la cercanía de estas concentraciones a sus valores EC_{50} e IC_{50} correspondientes.

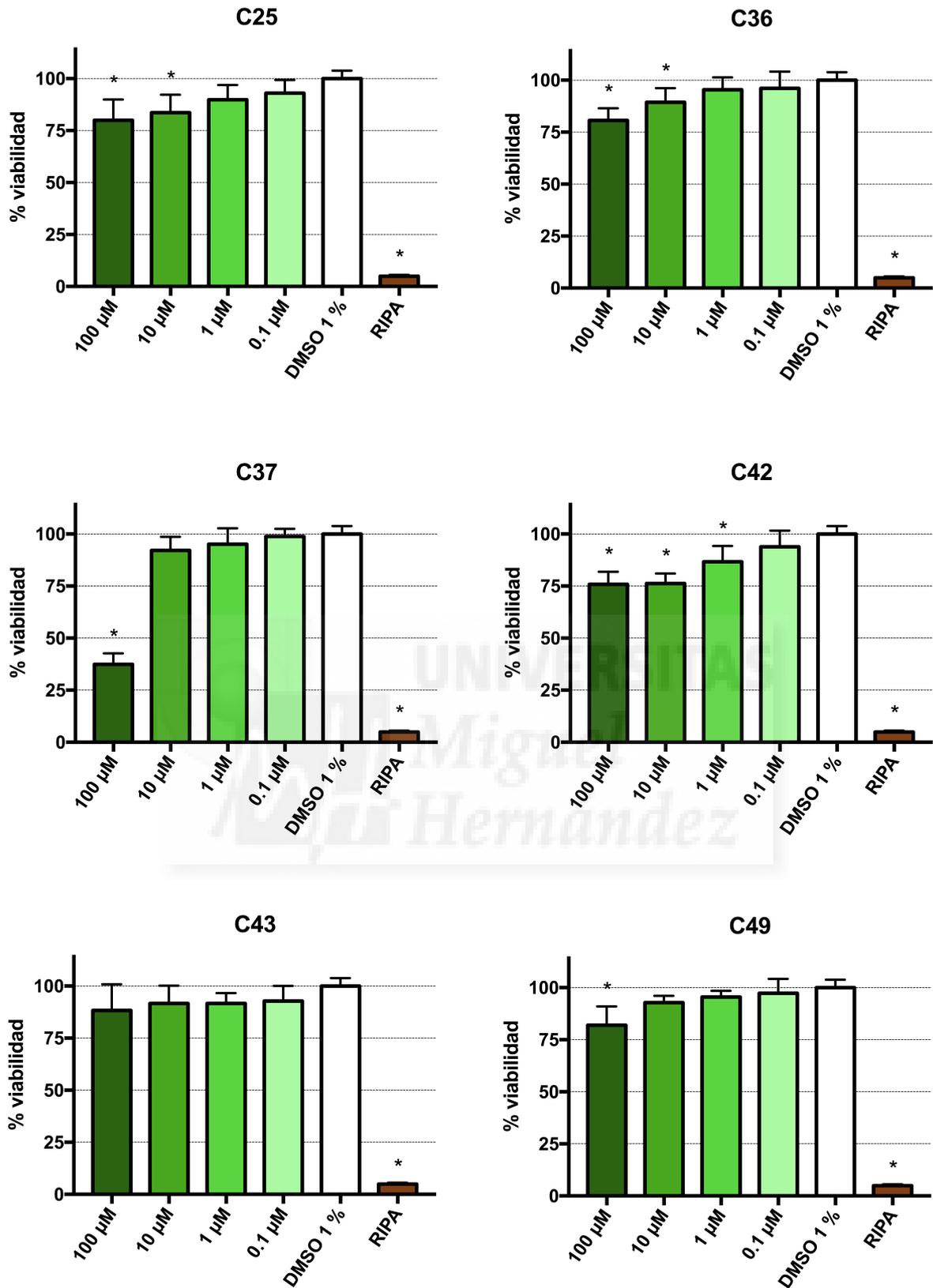


Figura 11A | Caracterización de la citotoxicidad de los compuestos agonistas seleccionados. Representación del porcentaje de viabilidad celular en función de diversas concentraciones de moduladores con actividad agonista. El control positivo consistió en DMSO 1 % (control vehículo), mientras el control negativo fue tampón de lisis celular RIPA. Cada barra muestra su resultado correspondiente normalizado con respecto al control positivo en media \pm SD; $n = 3$, $N \geq 3$. El símbolo * hace referencia a p -valor < 0.001 (ANOVA con método *Dunnett's post hoc*, $\alpha = 0.05$).

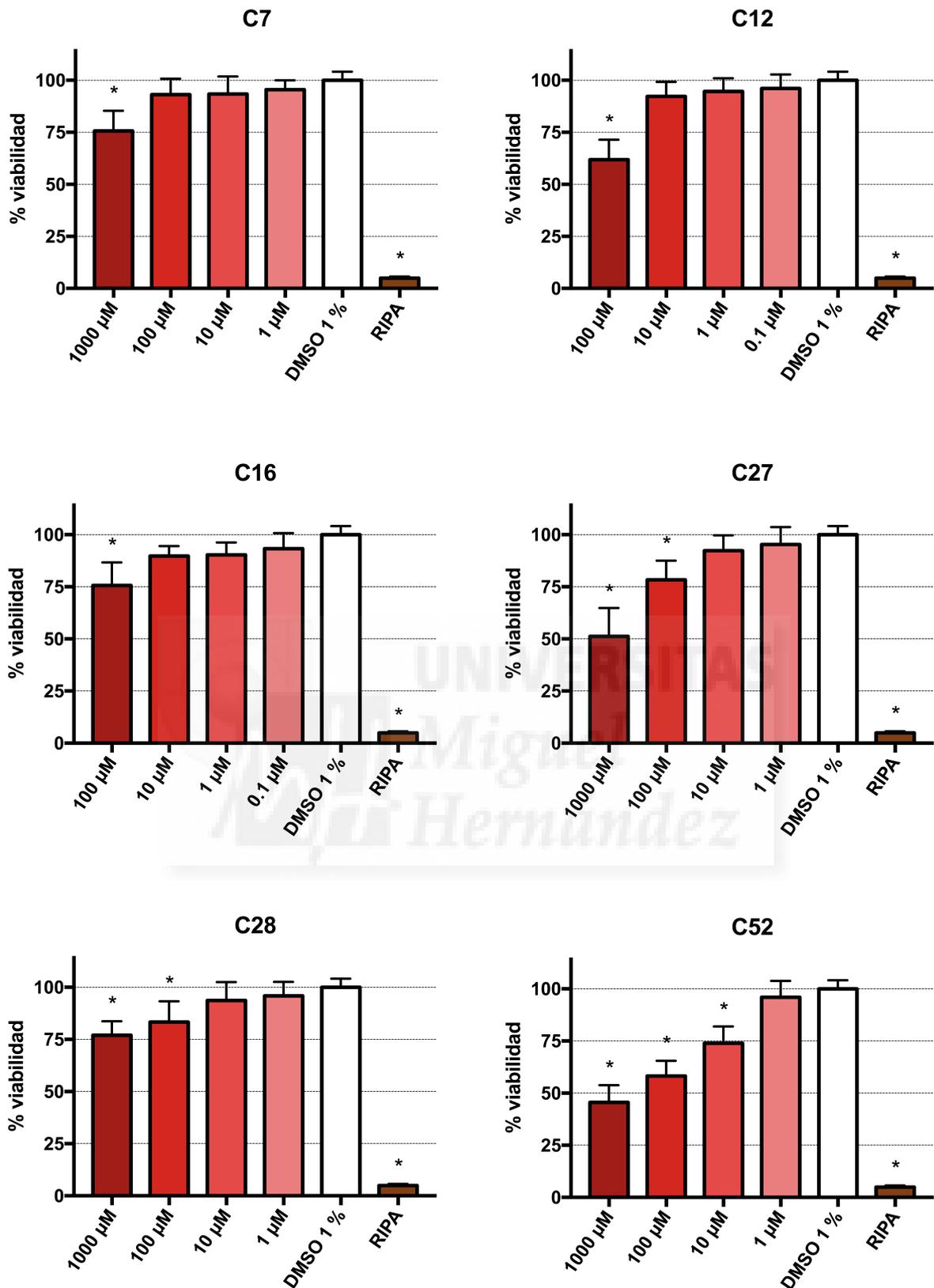


Figura 11B | Caracterización de la citotoxicidad de los compuestos antagonistas seleccionados. Representación del porcentaje de viabilidad celular en función de diversas concentraciones de moduladores con actividad antagonista. El control positivo consistió en DMSO 1 % (control vehículo), mientras el control negativo fue tampón de lisis celular RIPA. Cada barra muestra su resultado correspondiente normalizado con respecto al control positivo en media \pm SD; n = 3, N \geq 3. El símbolo * hace referencia a p-valor < 0.001 (ANOVA con método *Dunnett's post hoc*, α = 0.05).

4.4. Acoplamiento molecular, SAR y segunda selección

El acoplamiento molecular (*docking*) permite la predicción *in silico* de la orientación preferida entre dos moléculas, las cuales se encuentran interaccionando entre sí dando lugar a un complejo estable. Además de esta información visual, nos proporciona una serie de parámetros teóricos característicos de la unión ligando-receptor, tales como la energía de unión o la constante de disociación.

El cribado inicial se ha realizado mediante el canal iónico TRPV1 y una quimioteca diseñada a partir de la molécula de capsaicina, por ello se asume que todos los análogos de este agonista empleados durante su estudio computacional comparten su sitio de unión. De este modo, el primer ensayo realizado consistió en un acoplamiento global entre la estructura cristalográfica del receptor y la capsaicina, con el fin de determinar el bolsillo vanilloide donde se produce su interacción y contrastarlo posteriormente con los datos experimentales descritos en la bibliografía.

Por consiguiente, este primer ensayo resultó en 350 posibles sitios de unión de los cuales el primero de ellos, ordenados de mayor a menor energía de unión, presenta un valor de 9.38 kcal/mol. Además, también muestra las principales características de la interacción ligando-receptor descritas en la bibliografía, en lo que respecta a orientación y aminoácidos implicados en la unión. Estudios realizados mediante dinámica molecular concluyen que la molécula de capsaicina interacciona con el canal TRPV1 en un bolsillo de unión característico, localizado en un *loop* citoplásmico entre los segmentos transmembrana S2, S3 y S4, destacando la importancia de un residuo tirosina (Y511, en S3) el cual forma puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo presente en el anillo vanilloide del ligando. Otros aminoácidos estabilizadores de este acoplamiento ligando-receptor son T550 (S4), E570 (*linker* S4-S5) y L669 (S6 de la subunidad adyacente)^[35,36]. Además, el agonista se encuentra en una conformación denominada *VR_{down}*, donde su anillo vanilloide apunta hacia el *linker* S4-S5 mientras su cola lipídica lo hace en sentido contrario, adentrándose en la hélice transmembrana S4^[19].

La aplicación de técnicas *in silico* muestran resultados similares a los descritos anteriormente, donde la capsaicina interacciona con su receptor mediante enlaces por puente de hidrógeno entre su anillo vanilloide y los residuos Y511 y E570, además de R557 y Q700. Por otro lado, el resto de la estructura química del ligando también es capaz de dar lugar a interacciones, entre ellas un enlace por puente de hidrógeno con T550 y otras interacciones hidrofóbicas, destacando a los aminoácidos A546, F591 y L669 (los dos últimos pertenecientes a una subunidad adyacente). **Figura 12.**

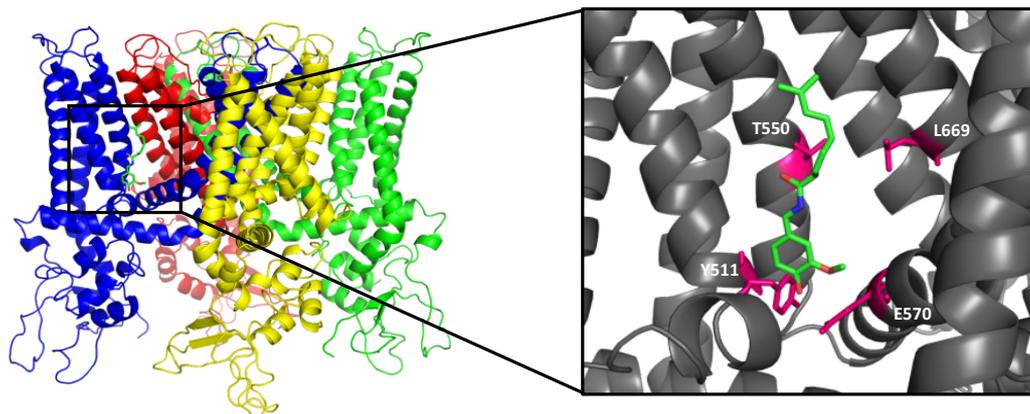


Figura 12 | Representación de la unión entre el canal iónico TRPV1 y su agonista capsaicina. En la izquierda se representa una vista general del tetrámero TRPV1, mientras que a la derecha se muestra una ampliación del bolsillo vanilloide en el cual se sitúa la molécula de capsaicina en su conformación VR_{down} interaccionando con los residuos correspondientes del receptor. Se destaca el color de los aminoácidos Y511, T550 y E570, formadores de enlaces por puente de hidrógeno, y L669, mediante interacciones hidrofóbicas.

A continuación, los resultados anteriores permitieron la creación de una celdilla unidad a partir de la cual realizar los acoplamientos locales correspondientes entre la proteína TRPV1 y cada uno de los compuestos seleccionados, obteniendo así los parámetros teóricos de dichas uniones. Todos los moduladores ensayados presentan las interacciones ligando-receptor más importantes descritas para el agonista capsaicina, donde las variaciones en las energías de unión calculadas se deben a diferentes interacciones entre la región opuesta al anillo vanilloide de su estructura química y el receptor, a causa de los distintos radicales presentes en cada uno de ellos. **Tabla 2.**

Agonistas			Antagonistas		
C#	Energía de unión (kcal/mol)	Constante de disociación (nM)	C#	Energía de unión (kcal/mol)	Constante de disociación (nM)
C43	10.52	19.47	C16	11.74	2.47
C42	9.99	47.18	C52	11.14	6.81
C37	9.62	87.20	C7	10.54	18.94
C49	9.60	91.64	C12	9.97	49.03
C36	9.50	108.37	C27	9.33	144.26
C25	8.55	536.17	C28	8.52	564.88

Tabla 2 | Estudio mediante modelado molecular de la interacción entre los compuestos seleccionados y la estructura cristalográfica de la proteína TRPV1. Resultados obtenidos para los cálculos *in silico* de la energía de unión (kcal/mol) y la constante de disociación (nM), ordenados de mayor a menor energía de unión, para cada una de las interacciones ligando-receptor estudiadas.

Respecto a los resultados obtenidos, entre los moduladores con actividad agonista destaca la energía de unión de C43 por encima de 10 kcal/mol, el cual muestra también el mayor porcentaje de actividad *in vitro* obtenido durante el cribado inicial, a pesar de su valor EC_{50} superior con respecto al resto de

agonistas. Los compuestos de mayor potencia, C37 y C49, ambos con valores EC50 inferiores a 0.10 μM , también presentan energías de unión cercanas a 10 kcal/mol. Entre los moduladores antagonistas, las dos moléculas con mayor potencia, C12 y C16, con valores IC50 inferiores a 1 μM , muestran energías de unión iguales a 9.97 y 11.74 kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, el compuesto C28 se caracteriza por presentar tanto el valor IC50 más elevado ($14.96 \pm 6.07 \mu\text{M}$) como la energía de unión más pequeña (8.52 kcal/mol) con respecto al resto de moduladores antagonistas. En esta ocasión, de nuevo se puede establecer una relación entre los resultados obtenidos computacional y experimentalmente durante el cribado y determinación de la potencia, lo cual valida estos métodos como una herramienta importante en la identificación de compuestos bioactivos y un complemento económico a los ensayos *in vitro*.

Una vez obtenidos los complejos ligando-receptor deseados, las herramientas de modelado molecular permiten la realización de análisis adicionales a partir de la estructura creada. Entre ellos, un estudio de SAR (*Structure-Activity Relationship*) consiste en determinar la relación entre la estructura química o tridimensional de una molécula y su actividad biológica. Así, este análisis permite la caracterización de los grupos químicos responsables del efecto mostrado sobre la diana a estudio. Por tanto, a partir de los datos de eficacia obtenidos en el cribado de la quimioteca (**Anexo I**) y los resultados de modelado molecular, se pueden realizar los análisis correspondientes con el fin de predecir algunas de estas relaciones estructura-actividad.

En primer lugar, se realizó un estudio de las diferencias de interacción mostradas por moduladores con actividad agonista y antagonista, tomando como estructuras químicas modelo las correspondientes a los compuestos C51 y C52, respectivamente. Ambos moduladores se caracterizan por compartir todos los radicales de su fórmula Markush, a excepción de R2, el cual consiste en un átomo de hidrógeno en el agonista y uno de iodo en el antagonista. Los resultados del análisis indican que el agonista C51 presenta una energía de unión igual a 10.77 kcal/mol, estableciendo enlaces por puente de hidrógeno con los aminoácidos Y511, T550, E570 y Q700, además de mostrar interacciones hidrofóbicas con los residuos A546, F591 y L669 (los dos últimos pertenecientes a una subunidad adyacente). De manera similar, el antagonista C52 presenta una energía de unión de 11.14 kcal/mol, además de todas las interacciones ligando-receptor descritas anteriormente, tanto los puentes de hidrógeno como el resto de interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos indicados, a excepción del enlace por puente de hidrógeno entre el anillo del capsaicinoide y E570. Adicionalmente, este compuesto establece un enlace por puente de halógeno entre su átomo de iodo y un oxígeno perteneciente al residuo S512 de la proteína TRPV1. **Figura 13.**

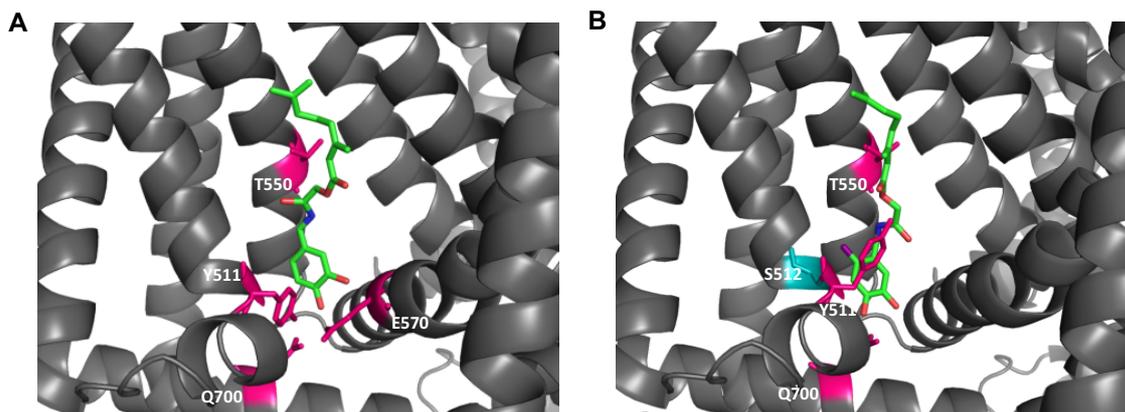


Figura 13 | Representación del estudio de SAR para el átomo de yodo característico de moduladores antagonistas. (A) El compuesto agonista C51 establece interacciones ligando-receptor mediante enlaces por puente de hidrógeno con los aminoácidos Y511, T550, E570 y Q700. **(B)** El antagonista C52, por su parte, solamente establece enlaces por puente de hidrógeno con los residuos Y511, T550 y Q700, además de un enlace por puente de halógeno entre el átomo de yodo de su anillo vanilloide y el aminoácido S512 (en azul) del canal iónico TRPV1.

La interacción descrita entre el átomo de yodo característico del antagonista C52 y el aminoácido S512 situado en la hélice transmembrana S3, podría implicar a este tipo de interacción como la responsable de las diferencias de actividad mostradas por moduladores agonistas y antagonistas. En concreto, algunos estudios relacionan la introducción de un átomo de halógeno (Cl, Br o I) en la posición 5 del anillo vanilloide de la capsaicina como responsable de su actividad antagonista del receptor TRPV1, sugiriendo además que este fenómeno sea debido a la dificultad adquirida por el anillo bencénico para interactuar con el *linker* S4-S5, mientras el resto de la molécula de ligando permanece intacto para la unión, ya que la interacción con dicha región resulta crucial en el mecanismo de apertura del canal conocido como *pull-and-contact*^[30,39]. De nuevo, analizando los resultados obtenidos se encuentra que la interacción entre el átomo de yodo y el residuo S512 provoca, a su vez, la pérdida del enlace por puente de hidrógeno entre el anillo del modulador y el residuo E570 del receptor, localizado en el *linker* S4-S5, apoyando la posible relación entre la interacción descrita y el comportamiento antagonista presentado por los moduladores con este halógeno en su estructura química.

Continuando con el análisis de la actividad antagonista mostrada por compuestos con un átomo de yodo en R2, posteriormente se estudió la importancia del tipo de átomo de halógeno insertado en la posición 5 del anillo de los capsaicinoides. Para ello, se empleó la estructura ligando-receptor obtenida mediante modelado molecular para el modulador C52, sobre la cual se modificó el átomo de yodo por otros halógenos, entre ellos cloro, bromo o flúor. Los resultados, calculados mediante un campo de fuerzas distinto al anterior, muestran que el átomo de yodo proporciona la mayor energía de unión de todos ellos (12.48 kcal/mol), seguido por bromo (11.78 kcal/mol), cloro (11.03 kcal/mol) y en último lugar flúor (9.05 kcal/mol); además de la baja energía de unión presentada por la introducción de un átomo de hidrógeno en esta conformación (8.56 kcal/mol). De este modo, los datos obtenidos

permiten establecer una relación estructura-actividad, según la cual la energía de unión del complejo ligando-receptor es mayor a medida que aumenta el radio atómico del halógeno (I > Br > Cl >> F)^[30]. Por tanto, los moduladores con actividad antagonista más potentes serán aquellos con un átomo de yodo en su anillo bencénico, el cual consiste en el sustituyente presente en la quimioteca utilizada en este trabajo.

Sorprendentemente, algunos de los antagonistas potenciales ensayados muestran actividad agonista a pesar de la presencia de un átomo de yodo en R2, por lo que se realizaron los estudios *in silico* con el fin de determinar sus posibles causas. En esta ocasión, se emplearon las estructuras químicas de los compuestos C11 y C40, presentando ambos una energía de unión igual a 6.78 y 7.67 kcal/mol, respectivamente. Los resultados muestran que el modulador C11 es capaz de girar sus enlaces rotables estableciendo interacciones entre su región central lipofílica y los aminoácidos característicos del bolsillo vanilloide, mientras C40 presenta un anillo bencénico en la parte opuesta de su estructura química, el cual interacciona con el bolsillo de unión correspondiente en lugar de su anillo vanilloide, pudiendo explicar el fenómeno descrito inicialmente. **Figura 14.**

Para finalizar, el número de moduladores a estudio se redujo de 12 a 4 en base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores de potencia, citotoxicidad y acoplamiento molecular, los cuales han sido previamente discutidos. De este modo, 2 compuestos con actividad agonista (C37 y C49) y 2 antagonistas (C12 y C16) fueron seleccionados para continuar con la realización de los estudios correspondientes a su caracterización farmacológica.

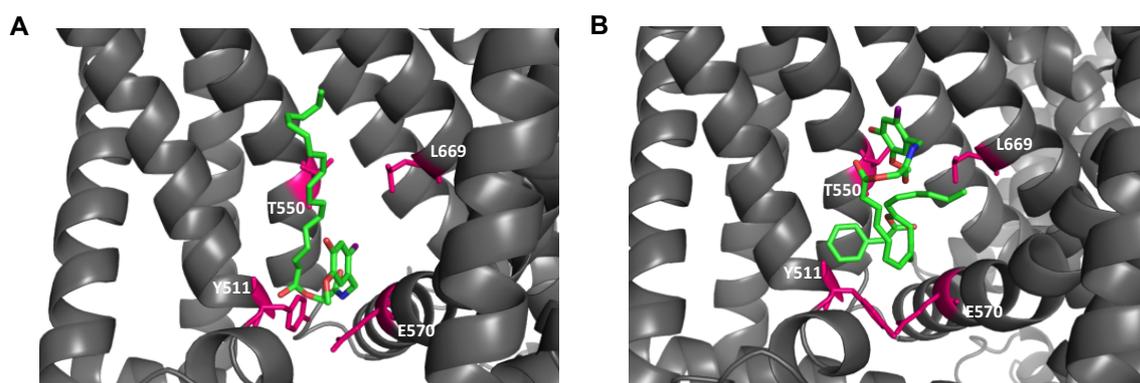


Figura 14 | Representación del estudio de SAR para moduladores agonistas con un átomo de yodo en su anillo vanilloide. (A) El compuesto C11 establece interacciones ligando-receptor mediante enlaces por puente de hidrógeno con los aminoácidos Y511, T550 y E570, además de interacciones hidrofóbicas con el residuo L669. El giro de sus enlaces rotables posibilita la conformación adoptada, en la cual interacciona con los aminoácidos descritos mediante su región central lipofílica. **(B)** La molécula C40, por otro lado, presenta un anillo bencénico en la parte opuesta de su estructura molecular, el cual es capaz de interactuar con los residuos del receptor TRPV1 característicos de su unión a capsaicinoides.

4.5. Selectividad

El cribado inicial permitió comprobar cómo la quimioteca de capsaicinoides empleada es capaz de modular la actividad del canal iónico TRPV1, pero el siguiente paso consistió en determinar la selectividad de los compuestos seleccionados en el apartado anterior en otro miembro de la superfamilia TRP. Para ello, se empleó la isoforma TRPM8 expresada en la línea celular HEK293-CR1, de nuevo mediante técnicas fluorométricas y la sonda Fluo-4 NW. Además, esta proteína juega un papel importante en la sensación de dolor y frío, por lo que su modulación presenta un rol similar al del termorreceptor TRPV1^[9].

Entre los resultados obtenidos, no se encuentran variaciones en la actividad del canal TRPM8 a concentraciones de 1 y 10 μM . Sin embargo, dos de los compuestos ensayados, C16 y C37, son capaces de modular este canal a la concentración de 100 μM , presentando un 77.08 ± 9.25 y 93.27 ± 7.91 % de bloqueo, respectivamente. **Figura 15.**

De este modo, el modulador C16 muestra actividad antagonista en ambos receptores, mientras C37 actúa como agonista en TRPV1 y antagonista en TRPM8. Estos datos, junto a la importancia descrita de la selectividad dentro de la superfamilia TRP, contribuyen a la selección final de los compuestos C12 (antagonista) y C49 (agonista) como candidatos para continuar con su caracterización y desarrollo farmacológico como futuros analgésicos entre todos los constituyentes de la quimioteca inicial.

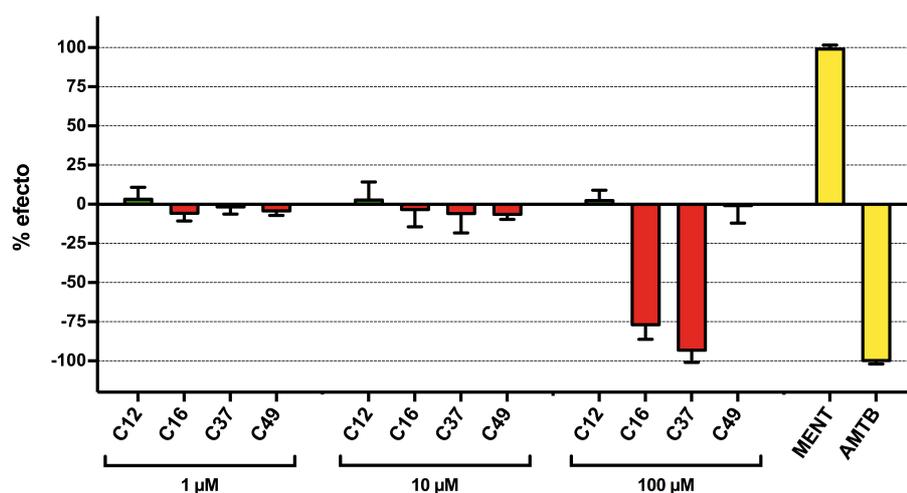


Figura 15 | Determinación de la selectividad de los compuestos seleccionados. Representación de los resultados obtenidos para cada uno de los 4 compuestos seleccionados anteriormente a las concentraciones de 1, 10 y 100 μM . En verde aparecen los moduladores con actividad agonista, mientras en rojo lo hacen aquellos con actividad antagonista; en amarillo se muestran los controles positivos (mentol, 100 μM) y negativos (AMTB, 10 μM). Cada barra representa su resultado normalizado con respecto al control positivo en % de efecto medio \pm SD; $n = 3$, $N \geq 3$, $0.5 < \text{factor } Z < 1$.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

A lo largo del presente trabajo sobre la búsqueda de nuevos compuestos moduladores del canal iónico TRPV1 y caracterización de su potencial terapéutico, se ha determinado que:

- Los ensayos fluorométricos han mostrado ser una plataforma de cribado de alto rendimiento (HTS) idónea para la búsqueda e identificación de moduladores del receptor TRPV1. La quimioteca empleada, constituida por 52 compuestos, ha resultado estar formada por 32 agonistas y 20 antagonistas de la diana a estudio.
- La primera selección de 12 moduladores, entre ellos 6 con actividad agonista (C25, C36, C37, C42, C43 y C49) y otros 6 antagonista (C7, C12, C16, C27, C28 y C52) en base a los resultados obtenidos en el cribado inicial, ha permitido continuar con la realización de estudios más complejos correspondientes a su caracterización farmacológica.
- La citotoxicidad mostrada por los moduladores C42 y C52, junto a los resultados en la determinación de la potencia y los parámetros teóricos obtenidos *in silico* mediante modelado molecular, han permitido descartar aquellos compuestos con propiedades menos deseadas, además de una segunda selección de 4 moduladores, 2 agonistas (C37 y C49) y 2 antagonistas (C12 y C16), con el fin de continuar con el estudio de su potencial farmacológico.
- Las técnicas de acoplamiento molecular también han contribuido en la predicción de las interacciones entre el canal TRPV1 y diversos compuestos moduladores, los cuales se unen en el mismo bolsillo vanilloide descrito para el agonista capsaicina. Entre las principales interacciones ligando-receptor estudiadas, destaca la formación de enlaces por puente de hidrógeno con los aminoácidos Y511, T550 y E570 del receptor, junto con la posible causa de la actividad antagonista mostrada por algunos moduladores, un enlace por puente de halógeno entre el átomo de yodo presente en los capsaicinoides y el residuo S512 de la proteína TRPV1.
- La selectividad estudiada en la isoforma TRPM8 ha propiciado el descarte de los compuestos C16 y C37 y, por tanto, la selección final de los moduladores C12 (antagonista) y C49 (agonista) como dos moléculas con potencial aplicación farmacológica, en concreto nuevos analgésicos mediante modulación del canal iónico TRPV1.

El estudio realizado en este trabajo constituye la fase inicial de caracterización de compuestos moduladores de una diana con potencial farmacológico, como es el termorreceptor TRPV1. Por tanto, continuar investigando la capacidad terapéutica de estas moléculas implicará profundizar en su estudio y con ello descubrir su mecanismo de acción, recurriendo a la realización de ensayos electrofisiológicos. Estos experimentos permiten confirmar los resultados obtenidos mediante el empleo de técnicas fluorométricas, además de estudiar las cinéticas de apertura y cierre del canal en presencia de dichos moduladores, es decir, su mecanismo molecular. En el caso de moduladores con actividad agonista, estos estudios aportarán información sobre su competitividad por el sitio de unión o el tiempo de desensibilización del receptor TRPV1, mientras en antagonistas permitirán su distinción en bloqueadores de poro, antagonistas competitivos o moduladores alostéricos.

Adicionalmente, análisis sobre costes de producción y estabilidad química de cada uno de los diferentes compuestos serán importantes en lo que respecta a su aplicación farmacológica.

Para finalizar, aquellos moduladores los cuales muestren buenas propiedades y hayan sido completamente caracterizados *in vitro* podrán ser probados *in vivo* en diversos modelos animales de dolor. Por último, el siguiente paso consistiría en su estudio en humanos mediante la realización de los ensayos clínicos pertinentes, llegando a convertirse, si su seguridad y eficacia resultan ser adecuadas, en nuevos fármacos analgésicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Perl ER. (2007) Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*; 8(1), 71-80.
- [2] Sabatowski R, Schäfer D, Kasper SM, Brunsch H, Radbruch L. (2004) Pain treatment: a historical overview. *Current Pharmaceutical Design*; 10(7), 701-716.
- [3] Belmonte C, Viana F. (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular Pain*; 4, 14.
- [4] Julius D. (2013) TRP channels and pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 29, 355-384.
- [5] Moran MM, McAlexander MA, Biro T, Szallasi A. (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*; 10(8), 601-620.
- [6] Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. (2005) Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*; 72(5), 359-371.
- [7] Nicholson B. (2006) Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *American Journal of Managed Care*; 12(9), 256-262.
- [8] Bonica JJ. (1999) History of pain concepts and pain therapy. *Mount Sinai Journal of Medicine*; 58(3), 191-202.
- [9] Ferrer-Montiel A, Fernandez-Carvajal A, Planells-Cases R, Fernandez-Ballester G, Gonzalez-Ros JM, Messeguer A, Gonzalez-Muniz R. (2012) Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*; 22(9), 999-1017.
- [10] Nilius B, Owsianik G. (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*; 12(3), 218.
- [11] Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Devesa I, Gonzalez-Ros JM, Ferrer-Montiel A. (2012) New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals*; 5(1), 16-48.
- [12] Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*; 87(1), 165-217.
- [13] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*; 288(5464), 306-313.
- [14] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*; 389(6653), 816-824.
- [15] Morales-Lazaro SL, Rosenbaum T. (2015) A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life Sciences*; 125, 15-24.
- [16] Valente P, Garcia-Sanz N, Gomis A, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Viana F, Belmonte C, Ferrer-Montiel A. (2008) Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor 1. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*; 22(9), 3298-3309.
- [17] Ciardo MG, Andres-Borderia A, Cuesta N, Valente P, Camprubi-Robles M, Yang J, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. (2015) Whirlin increases TRPV1 channel expression and cellular stability. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1863(1), 115-127.
- [18] Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*; 21(3), 531-543.
- [19] Darre L, Domene C. (2015) Binding of capsaicin to the TRPV1 ion channel. *Molecular Pharmaceutics*; 12(12), 4454-4465.
- [20] Jordt SE, Tominaga M, Julius D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of National Academy of Sciences*; 97(14), 8134-8139.

- [21] Boukalova S, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. (2010) Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels. *Journal of Biological Chemistry*; 285(53), 41455-41462.
- [22] Clapham DE, Miller C. (2011) A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proceedings of National Academy of Sciences*; 108(49), 19492-19497.
- [23] Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of National Academy of Sciences*; 100(13), 8002-8006.
- [24] Pingle SC, Matta JA, Ahern GP. (2007) Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 179, 155-171.
- [25] Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*; 405(6783), 183-187.
- [26] Gold MS, Gebhart GF. (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*; 16(11), 1248-1257.
- [27] Devesa I, Planells-Cases R, Fernandez-Ballester G, Gonzalez-Ros JM, Ferrer-Montiel A, Fernandez-Carvajal A. (2011) Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *Journal of Inflammation Research*; 4, 67-81.
- [28] Bode AM, Dong Z. (2011) The two faces of capsaicin. *Cancer Research*; 71(8), 2809-2814.
- [29] Wong GY, Gavva NR. (2009) Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews*; 60(1), 267-277.
- [30] Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L, Daddario N, Bianchi F, Schiano Moriello A, Di Marzo V. (2003) Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *British Journal of Pharmacology*; 139(8), 1417-1424.
- [31] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*; 4(2), 67-73.
- [32] Denizot F, Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*; 89(2), 271-277.
- [33] Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. (2016) TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature*; 534(7607), 347-351.
- [34] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*; 19(14), 1639-1662.
- [35] Jordt SE, Julius D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*; 108(3), 421-430.
- [36] Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ. (2004) Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *Journal of Biological Chemistry*; 279(19), 20283-20295.
- [37] Lam PM, Hainsworth AH, Smith GD, Owen DE, Davies J, Lambert DG. (2007) Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases $[Ca^{2+}]_i$, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *Journal of Neurochemistry*; 102(3), 801-811.
- [38] Trump BF, Berezesky IK, Laiho KU, Osornio AR, Mergner WJ, Smith MW. (1980) The role of calcium in cell injury: a review. *Scanning Electron Microscopy Journal*; 492(2), 437-462.
- [39] Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, Yarov-Yarovoy V, Zheng J. (2015) Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*; 11(7), 518-524.

ANEXO I

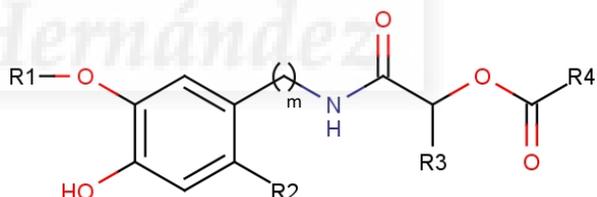
C#	Estructura química					% efecto		Potencia (μM)	E. unión (kcal/mol)
	R1	R2	R3	R4	m	10 μM	100 μM		
C1	CH ₃	H	H	c	1	69.85 ± 12.66	74.41 ± 13.65	-	-
C2	CH ₃	H	H	d	1	54.08 ± 4.19	59.86 ± 13.44	-	-
C3	CH ₃	H	H	e	1	47.91 ± 10.32	51.71 ± 5.72	-	-
C4	CH ₃	H	H	f	1	35.82 ± 3.48	42.16 ± 1.02	-	-
C5	CH ₃	I	H	g	1	-13.98 ± 5.98	-34.69 ± 5.85	-	-
C6	CH ₃	I	H	c	1	-21.80 ± 5.41	-74.23 ± 11.11	-	-
C7	CH ₃	I	H	d	1	-31.23 ± 8.34	-103.91 ± 2.83	11.58 ± 4.55	10.54
C8	CH ₃	I	H	h	1	34.94 ± 5.51	49.88 ± 6.24	-	-
C9	CH ₃	I	H	e	1	-20.48 ± 9.67	-97.37 ± 5.44	-	-
C10	CH ₃	I	H	f	1	-8.35 ± 4.10	-25.71 ± 3.07	-	-
C11	CH ₃	I	H	i	1	38.89 ± 3.53	51.50 ± 3.61	-	-
C12	CH ₃	I	H	j	1	-43.18 ± 10.07	-100.76 ± 3.25	0.86 ± 0.51	9.97
C13	CH ₃	H	a	h	1	49.65 ± 11.97	69.70 ± 5.46	-	-
C14	CH ₃	H	b	h	1	58.76 ± 2.33	74.31 ± 2.72	-	-
C15	CH ₃	I	H	k	1	-14.44 ± 2.27	-21.99 ± 3.75	-	-
C16	CH ₃	I	H	l	1	-77.28 ± 17.85	-107.26 ± 3.55	0.32 ± 0.25	11.74
C17	CH ₃	I	H	m	1	-21.85 ± 2.85	-59.42 ± 1.79	-	-
C18	CH ₃	H	H	m	1	29.43 ± 14.90	49.97 ± 1.62	-	-
C19	CH ₃	H	H	k	1	25.59 ± 4.29	30.37 ± 5.64	-	-
C20	CH ₃	I	H	n	1	29.35 ± 1.46	31.05 ± 4.06	-	-
C21	CH ₃	H	H	n	1	79.31 ± 6.41	88.77 ± 4.60	-	-
C22	CH ₃	H	H	i	1	54.74 ± 17.75	80.86 ± 6.96	-	-
C23	CH ₃	H	H	o	1	73.32 ± 12.83	84.16 ± 4.50	-	-
C24	CH ₃	H	H	p	1	68.45 ± 17.20	83.03 ± 1.79	-	-
C25	CH ₃	H	H	q	1	77.19 ± 11.95	94.30 ± 2.76	0.17 ± 0.06	8.55
C26	CH ₃	H	H	r	1	73.80 ± 17.42	92.50 ± 4.61	-	-
C27	CH ₃	I	H	o	1	-23.14 ± 7.81	-84.39 ± 13.90	11.04 ± 3.52	9.33
C28	CH ₃	I	H	p	1	-25.23 ± 7.63	-97.26 ± 6.36	14.96 ± 6.07	8.52
C29	CH ₃	I	H	s	1	-17.27 ± 4.75	-21.82 ± 9.50	-	-
C30	CH ₃	I	H	r	1	-25.08 ± 5.87	-30.85 ± 12.46	-	-
C31	CH ₃	I	H	t	1	-21.06 ± 7.05	-21.74 ± 5.88	-	-
C32	CH ₃	I	H	q	1	26.68 ± 12.26	68.11 ± 8.91	-	-
C33	CH ₃	H	H	s	1	75.96 ± 9.86	86.65 ± 3.38	-	-
C34	CH ₃	H	H	t	1	60.84 ± 12.80	80.85 ± 5.45	-	-
C35	CH ₃	H	H	h	1	47.40 ± 14.56	69.56 ± 6.23	-	-
C36	CH ₃	H	H	l	1	71.66 ± 2.49	84.74 ± 9.72	0.28 ± 0.08	9.50
C37	CH ₃	H	H	j	1	74.80 ± 8.30	88.00 ± 3.49	0.08 ± 0.03	9.62
C38	CH ₃	H	H	g	1	75.69 ± 6.25	85.48 ± 8.81	-	-

Tabla I | Detalle de la estructura química de los moduladores constituyentes de la quimioteca empleada, junto con sus resultados de cribado (% efecto), potencia y modelado molecular (energía de unión). Su estructura química está compuesta por distintos radicales en base a su fórmula Markush: R1 (CH₃ o H), R2 (H o I), R3 (H, "a" o "b") y R4 (resto de letras, de "c" a "u", pertenecientes a los sustituyentes de la Figura II); además de m (número 1 o 2).

C#	Estructura química					% efecto		Potencia (μM)	E. unión (kcal/mol)
	R1	R2	R3	R4	m	10 μM	100 μM		
C39	CH ₃	H	H	u	1	28.70 \pm 9.97	33.16 \pm 4.59	-	-
C40	CH ₃	I	H	u	1	63.29 \pm 17.41	83.10 \pm 5.79	-	-
C41	H	I	H	n	2	-8.26 \pm 1.53	-31.06 \pm 4.18	-	-
C42	H	H	H	n	2	75.76 \pm 6.84	100.50 \pm 9.89	0.33 \pm 0.07	9.99
C43	H	H	H	l	2	100.14 \pm 9.01	112.22 \pm 9.64	1.05 \pm 0.19	10.52
C44	H	I	H	l	2	-46.30 \pm 12.70	-88.47 \pm 5.67	-	-
C45	H	H	H	q	2	78.48 \pm 4.61	81.51 \pm 6.46	-	-
C46	H	I	H	q	2	-6.66 \pm 3.75	-11.96 \pm 6.03	-	-
C47	H	H	H	r	2	79.04 \pm 6.59	89.13 \pm 11.24	-	-
C48	H	I	H	r	2	-7.98 \pm 4.64	-10.18 \pm 7.55	-	-
C49	H	H	H	n	1	83.71 \pm 6.00	87.56 \pm 3.99	0.03 \pm 0.01	9.60
C50	H	I	H	n	1	-12.15 \pm 6.78	-12.23 \pm 9.31	-	-
C51	H	H	H	l	1	76.96 \pm 5.17	77.42 \pm 9.58	-	-
C52	H	I	H	l	1	-58.38 \pm 9.47	-94.26 \pm 8.40	6.82 \pm 1.38	11.14

Tabla I (continuación) | Detalle de la estructura química de los moduladores constituyentes de la quimioteca empleada, junto con sus resultados de cribado (% efecto), potencia y modelado molecular (energía de unión). Su estructura química está compuesta por distintos radicales en base a su fórmula Markush: R1 (CH₃ o H), R2 (H o I), R3 (H, "a" o "b") y R4 (resto de letras, de "c" a "u", pertenecientes a los sustituyentes de la Figura II); además de m (número 1 o 2).

Figura I | Fórmula Markush. Estructura química común para los 52 compuestos ensayados. Los radicales (R#) corresponden a los diferentes sustituyentes, mientras m es igual a 1 o 2.



Anexo I

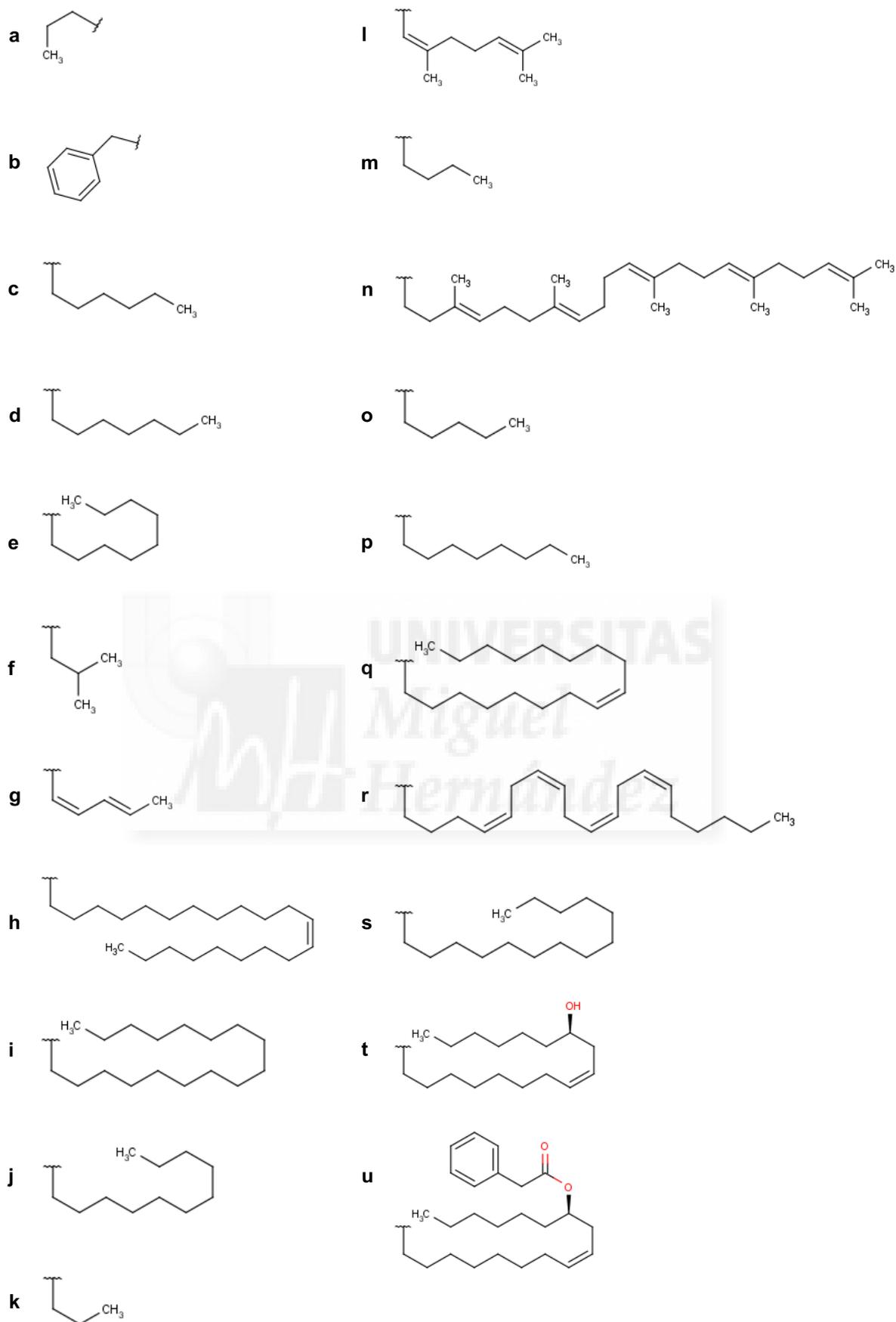


Figura II | Estructura química de los diferentes sustituyentes de la quimioteca. Representación de los posibles radicales R2 y R3 de la fórmula Markush, junto con su letra correspondiente en la Tabla I.