

El canal TMEM 16A: perspectivas terapéuticas

C. Sanz García y Julio Cortijo Gimeno.

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina, Universitat de Valencia.

Resumen

Los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ (CaCCs) son un grupo heterogéneo de canales de Cl⁻ que pueden ser activados por calcio intracelular o por despolarización. Estos canales se pueden encontrar en casi todas las especies desde invertebrados a mamíferos (Ji et al., 2019).

Un subtipo de estos canales CaCCs fue el primero que se describió en *Xenopus oocytes* y su identificación no se realizó hasta el año 2008 cuando varios laboratorios reportaron que en la proteína transmembrana 16A (TMEM16A) subyace la base molecular de un subgrupo de canales CaCCs (Caputo et al., 2008). La familia TMEM16x está formada por 10 miembros que pueden funcionar bien como canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ (CaCCs) (TMEM16A Y TMEM16B), como canal catiónico activado por Ca²⁺ (TMEM16F) o como escramblasas de fosfolípidos (enzimas que mueven los lípidos de forma aleatoria entre las capas interna y externa de la membrana plasmática para equilibrar su composición) (TMEM16C-K). La TMEM16A fue la primera que se descubrió como canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ y está ubicada en muchos territorios entre los que se encuentran las células epiteliales de las vías aéreas e intestinales, las células acinares de glándulas exocrinas salivares y pancreáticas, el músculo liso de las vías aéreas, las células endoteliales, las células intersticiales de Cajal y las neuronas de las raíces dorsales de los ganglios raquídeos. Observando esta amplia distribución celular, se puede decir que participa en muchos roles fisiológicos como la secreción de las células epiteliales, la contracción del músculo liso, la transmisión de señales nociceptivas y la motilidad gastrointestinal.

Los canales de Cl⁻ activados por Ca²⁺ (CaCCs) codificados por el gen de la proteína TMEM16A son una clase de canales aniónicos activados por el incremento de calcio intracelular provocado por la activación de una proteína Gq acoplada a receptores (GqPCRs). El canal TMEM16A une dos moléculas de calcio de forma que se modifica la actividad eléctrica celular controlando el músculo liso vascular, el tono de los pericitos pericapilares, y la regulación de la secreción de las células epiteliales.

Se han realizado muchos estudios para determinar la estructura del canal TMEM16A y así poder identificar sitios de unión para ligandos endógenos, sintéticos o productos naturales y poder explicar el papel de este canal en los distintos territorios en los que se encuentra distribuido. Se están realizando diversos estudios para descubrir compuestos tanto inhibidores como activadores del canal.

Los inhibidores del canal TMEM16A tienen potencial terapéutico en enfermedades como hipertensión (pulmonar y sistémica), iclus isquémico y vejiga hiperactiva, mientras que los activadores se podrían utilizar para el tratamiento farmacológico de enfermedades asociadas con la disfunción epitelial tales como fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de Sjögren y síndrome del ojo seco.

Summary

THE TMEM16A CHANNEL AS A PHARMACOLOGICAL TARGET

Ca²⁺ activated Cl⁻ channels (CaCCs) are a heterogeneous group of Cl⁻ channels that can be activated by intracellular calcium or by depolarization. These channels can be found in almost all species from invertebrates to mammals (Ji et al., 2019).

A subtype of these CaCCs channels was the first to be described in *Xenopus oocytes* and its identification was not made until 2008 when several laboratories reported that the molecular basis of a subgroup of CaCCs channels (Caputo et al., 2008).

The TMEM16x family consists of 10 members that can function either as Ca²⁺ activated Cl⁻ channels (CaCCs) (TMEM16A and TMEM16B), as a Ca²⁺ activated cation channel (TMEM16F), or as phospholipid scramblases (enzymes that move lipids randomly between the inner and outer layers of the plasma membrane to balance their composition) (TMEM16C-K). TMEM16A was the first to be discovered as a Cl⁻ channel activated by Ca²⁺ and is located in many territories, including the epithelial cells of the airways and intestines, the acinar cells of exocrine salivary and pancreatic glands, smooth muscle of the airways, the endothelial cells, the interstitial cells of Cajal, and the neurons of the dorsal roots of the spinal ganglia. Observing this wide cellular distribution, it can be said that it participates in many physiological roles such as epithelial cell secretion, smooth muscle contraction, transmission of nociceptive signals, and gastrointestinal motility.

Ca²⁺-activated Cl⁻ channels (CaCCs) encoded by the TMEM16A protein gene are a class of anion channels activated by the increase in intracellular calcium caused by the activation of Gq protein-coupled receptors (GqPCRs). The TMEM16A channel binds two calcium molecules in a way that modifies cellular electrical activity, controlling vascular smooth muscle, the tone of pericapillary pericytes, and the regulation of epithelial cell secretion.

Many studies have been carried out to determine the structure of the TMEM16A channel in order to identify binding sites for endogenous ligands, synthetic or natural products and to explain the role of this channel in the different territories in which it is distributed. Various studies are under way to discover compounds that are both inhibitors and activators of the channel.

TMEM16A channel inhibitors have therapeutic potential in diseases such as hypertension (pulmonary and systemic), ischemic stroke and overactive bladder, while activators could be used for the pharmacological treatment of diseases associated with epithelial dysfunction such as cystic fibrosis, obstructive pulmonary disease (COPD), Sjögren's syndrome and dry eye syndrome.

Presentación

El canal de Cl⁻ modulado por Ca²⁺ TMEM16A, participa en diversas funciones fisiológicas vitales tales como el control del tono vascular, el flujo sanguíneo local y el transporte epitelial de solutos, por lo que se podría utilizar farmacológicamente en enfermedades como hipertensión sistémica y pulmonar, ictus isquémico y fibrosis quística entre otras.

LA FAMILIA DE CANALES TMEM16x.

La familia de canales (TMEM16x) tiene una secuencia similar en células eucariotas, los 10 parálogos TMEM16x tienen funciones diferentes:

- TMEM16A y TMEM16B forman canales Cl⁻ activados por Ca²⁺ (CaCCs).
- TMEM16C-K funcionan como escramblasas que facilitan el movimiento bidireccional de lípidos (sobre todo fosfatidilserina) a través de las membranas celulares y podrían tener actividad no selectiva sobre canales iónicos (Agostinelli et al., 2022).
- TMEM16F funciona como canal catiónico activado por Ca²⁺ (Pedemonte y Galletta, 2014).

En un principio las proteínas TMEM16x se llamaron “anoctaminas” ya que TMEM16A es un canal aniónico selectivo primario que tendría una topología de ocho dominios transmembrana TM, sin embargo, las proteínas TMEM16x tienen también otras funciones además de ser canales aniónicos y se ha demostrado la existencia de 10 dominios TM, por eso el término anoctamina ahora se considera incorrecto, por tanto, se debe usar la nomenclatura TMEM16x.

ESTRUCTURA DEL CANAL TMEM16A

La topología de TMEM16A canal de Cl⁻ activado por Ca²⁺ es de diez hélices transmembrana (TM) observadas por microscopía crioelectrónica en la que se revela una arquitectura homodimérica donde cada monómero contiene un poro conductor iónico independiente y dos sitios de unión al calcio. El poro está rodeado por las proteínas TM3-7, asumiendo una forma de reloj de arena con una amplia cavidad intracelular y una pequeña extracelular conectadas por una región que sería el cuello. Sobre las TM3-7 se han identificado diez residuos que revisten los poros que son importantes para la selectividad aniónica de los canales TMEM16A. Los sitios de unión de calcio están formados por cinco aminoácidos (E654,

E702, E705, E734 Y D738) sobre las proteínas TM6-8, lo que concuerda con las observaciones obtenidas con electrofisiología y con datos de estudios genéticos, los sitios de unión de calcio se localizan en el extremo del citosol donde está el poro dentro de la membrana. Por microscopía crioelectrónica se han observado los mecanismos por los que el calcio estimula los canales TMEM16A de forma que induce una reestructuración conformacional de la proteína TM6. En el estado cerrado sin unión de calcio, el borde citosólico de TM6 rodea el residuo glicina (G644) estrechando el poro, cuando ocurre la unión de calcio, el borde citosólico de TM6 se endereza y dilata el poro, lo que se traduce en un estado abierto del canal (Dang et al., 2017 y Paulino et al., 2017).

La secreción de Cl⁻ en el organismo tiene mucha relevancia en diferentes procesos fisiológicos, así, las funciones fisiológicas del canal TMEM16A dependerán de la dirección del flujo de Cl⁻, si éste sale de la célula, conlleva una despolarización, como consecuencia la célula se activará. Si el Cl⁻ entra en la célula, ésta se hiperpolarizará lo que se asocia a una disminución de la actividad.

VISIÓN GENERAL DE LOS MODULADORES FARMACOLÓGICOS DEL CANAL TMEM16A

Para validar este canal como diana farmacológica se requieren moduladores específicos que puedan servir como instrumentos esenciales para la comprensión de su farmacología, por eso existe la necesidad de descubrir moduladores selectivos y potentes que puedan tener como diana farmacológica el canal TMEM16A.

Durante mucho tiempo no se ha podido determinar el sitio de unión de los agentes moduladores pero con técnicas nuevas como mutagénesis de punto único, electrofisiología y modelos moleculares se ha llegado a identificar un posible sitio de

unión para moduladores sintéticos como el A9C y endógenos como el fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP₂). La estructura tanto del canal TMEM16F y del canal TMEM16A ha podido ser determinada con el estudio de dos compuestos, el 1PBC (1-hidroxi-3-(trifluorometil) piridol [1,2] bencimidazol-4-carbonitrilo, que es un potente inhibidor con propiedades antitumorales y la niclosamida, también inhibidor del canal. Las moléculas se unen al borde proximal extracelular de TM6 (puerta estérica) de los canales TMEM16F y TMEM16A, región descrita también para el compuesto A9C en el canal TMEM16A (Al-Hosni et al., 2022). Los inhibidores del canal iónico pueden ser bloqueadores del canal en estado abierto o moduladores de su apertura, si son bloqueadores directos dan lugar como resultado a un bloqueo directo del paso de iones a través del poro lo que se manifiesta por cambios en la corriente del canal. Por otro lado, los modificadores de la apertura del canal se unirán a otras regiones del canal distintas a la vía de permeabilidad iónica y

modularán la apertura o cierre del canal de forma alostérica. (Figura 1)

Los activadores son normalmente modificadores de la apertura del canal, por ejemplo, el antrace- no-9-ácido carboxílico (A9C), muestra un efecto bifásico sobre el canal TMEM16A, inhibe el canal actuando como un bloqueante del poro y de forma alostérica activa el canal estableciendo el estado abierto, esto es una acción contradictoria activando e inhibiendo efectos (Dinsdale et al., 2021). Esto demuestra que el canal TMEM16A puede ser diana farmacológica para el diseño de agentes bloqueantes y activadores. (Figura 1)

Los activadores del canal TMEM16A que activan la despolarización, serían más eficaces en las células excitables como en las neuronas de las raíces dorsales de los ganglios raquídeos, mientras que los inhibidores del canal pueden prevenir la activación del canal en células no excitables como en células del músculo liso vascular.

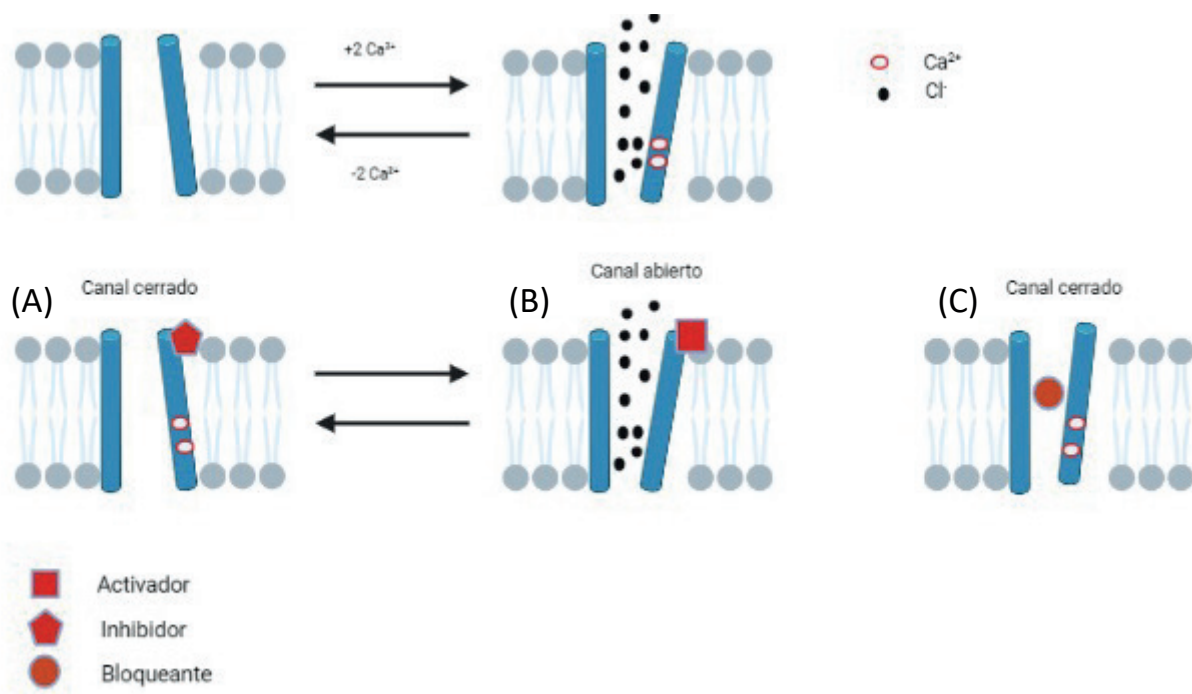


Figura 1. Mecanismos de apertura y cierre del canal TMEM16A y su modulación farmacológica. La parte superior muestra el canal cerrado y abierto cuando se unen dos moléculas de Ca²⁺ que produce la apertura de la proteína transmembrana TM6 y la parte externa del poro (mostrado como basculación hacia la derecha). Los modificadores de la apertura pueden actuar cerrando el poro (A) (inhibidores) o abriendo el poro (B) (activadores). Los inhibidores pueden actuar como bloqueantes que se unen al poro para ocluir la permeabilidad iónica (C). Realizado con el programa Biorender

FÁRMACOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE EL CANAL TMEM16A

Desde la identificación del canal TMEM16A se han descrito distintos inhibidores sintéticos como compuestos de la familia del fenamato que son bloqueantes efectivos de este canal a concentraciones micromolares, otros bloqueantes del canal CaCC tales como ácido estilbenedisulfónico 2,2'- diisotiociano 4,4' (DIDS) y ácido disulfónico 2,2'- 4-acetamido-4'- isotiocianostilbeno (SITS) son menos potentes.

El compuesto MONNA (ácido 5- nitroantranílico N- [(4'-metoxi)-2'naftilo]), un inhibidor sintético, produce relajación de arterias aisladas de roedores (donde el canal TMEM16A se expresa de forma abundante) en presencia de diferentes concentraciones de Cl⁻ extracelular (Al-Hosni et al., 2022).

El Ani9 (2-(4-cloro-2-metoxifenoxi)-N-[(2-metoxifenil) metilideneamino]- acetamida) parece tener alta selectividad por el canal TMEM16A (Al-Hosni et al., 2022).

El TM_{inh}-23 es el inhibidor identificado más potente del canal TMEM16A que produce una inhibición del 50% (CI₅₀) con una concentración de -30 nM para corrientes heterólogas del canal TME-M16A (Al-Hosni et al., 2022), sin embargo, falta describir un perfil detallado de selectividad.

Se ha observado que existen bastantes productos naturales de diferentes plantas que son capaces de inhibir el canal TMEM16A, como el ácido tánico que hay en el té verde y el vino tinto que es capaz de inhibir el canal TMEM16A y TMEM16B, mostrando consecuentemente un efecto inhibitorio sobre la contracción del músculo liso arterial y sobre la secreción intestinal, por tanto, se ha usado como herramienta farmacológica para investigar las características biofísicas y las funciones fisiológicas del canal TMEM16A. Otros productos naturales o sus análogos sintéticos han demostrado inhibir el canal TMEM16A como la idebena con actividad anticancerígena, la plumbagina con actividad antiadiarreica y la matrina con actividad anti adenocarcinoma pulmonar (Liu et al., 2021). Otras sustancias naturales como los galotaninos, la evodiamina y la rutaecarpina tienen

baja potencia inhibitoria sobre los canales TME-M16A (Al-Hosni et al., 2022) (Tabla 1).

También se han descrito recientemente otros fármacos capaces de tener efectos inhibitorios sobre el canal TMEM16A entre ellos la claritromicina, antibiótico sobre el que se ha reportado que disminuye la expresión del canal TMEM16A inducida por IL13 en las células caliciformes de modelos de asma experimental. La benzbromarona, fármaco utilizado en el tratamiento de la gota, muestra efecto antiasmático inhibiendo la secreción de mucina inducida por IL13 e inhibiendo la contracción del músculo liso de la vía aérea producida por metacolina debido a su efecto inhibitorio sobre el canal TMEM16A. La niclosamida y la nitazoxamida son fármacos antihelmínticos que muestran una potente capacidad como inhibidores del canal TMEM16A, pueden bloquear la contracción y despolarización del músculo liso de las vías aéreas. Las avermectinas ampliamente usadas contra gusanos en humanos y animales, muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células cancerígenas a través de la inhibición del canal TMEM16A (Liu et al., 2021). También se han descrito efectos inhibitorios para la cefarantina (fármaco antiinflamatorio) (Zhang et al., 2021) y zafirlukast (fármaco antiasmático) (Shi et al., 2022). Quizá estos fármacos podrían tener potencial terapéutico para enfermedades en las que existe una disfunción del canal TME-M16A tales como asma e hipertensión (Tabla 1)

FÁRMACOS CON ACTIVIDAD ACTIVADORA DEL CANAL TMEM16A

Se han descrito varios activadores de los canales TMEM16A, Fact (N-(4-bromofenil)-3-(1H-tetrazol-1-il) benzamida) y Eact (3,4,5-trimetoxi-N-(2-metoxietil)-N-(4-fenil-2-tiazolil) benzamida) que actúan por mecanismos distintos. El Eact es un activador que induce la corriente sobre el canal TMEM16A en ausencia de calcio intracelular, aunque varios estudios indican que podría activar el canal aumentando de forma indirecta el calcio intracelular. El Fact es un potenciador que aumenta la corriente de calcio en el canal TMEM16A (Liu et al., 2021).

Recientemente se ha identificado ETX001 como

Tabla 1. Farmacología del canal CaCC/TMEM16A: Inhibidores, activadores.

| INHIBIDORES | SELECTIVIDAD | EFECTO |
|---------------------------|--|--------------------------------------|
| Ácido NIFLÚMICO | Canal CaK (+) | ANTICÁNCER |
| | Canal 4Vk (-) | ANTIASMA |
| | VRAC (-) | |
| | ANO6/TMEM16F (-) | |
| Ácido FLUFENÁMICO | [Ca ²⁺] _i (+) | |
| | Canal CaK (+) | NO REPORTADO |
| DIDS | [Ca ²⁺] _i (+) | |
| | Canal 4Vk (-) | ANTICÁNCER |
| | VRAC (-) | ANTINOCICEPTIVO |
| | [Ca ²⁺] _i (+) | |
| MONNA | TRPV1 (+) | |
| | VRAC (-) | ANTICÁNCER |
| | ANO2/TMEM16B (-) | ANTIPIRURIGINOSO ANTIHIPERTENSIÓN |
| Ani9 | TMEM16A (-) | ANTICÁNCER |
| TM _{inh} -23 | TMEM16A(-) | |
| NICLOSAMIDA | ANO6(-) | ANTIASMA |
| | [Ca ²⁺] _i (-) | |
| BENZBROMARONA | ANO2/TMEM16B(-) | ANTIASMA |
| IDEBENONA | ANO2 TMEM16B/(-) | ANTICANCER |
| | | ANTIQUISTE RENAL |
| PLUMBAGINA | CFTR(-) | ANTICANCER |
| | | ANTIDIARREA |
| AVERMECTINAS | NO REPORTADO | ANTICANCER |
| ÁCIDO TÁNICO | HBest1(-. 15 micromol/L) | ANTINOCICEPTIVO |
| | ANO2/TMEM16B((-) | ANTICANCER |
| | | ANTIASMA |
| ACTIVADORES | SELECTIVIDAD | EFECTO |
| Eact | TRPV1 (+) | DOLOR |
| | TRPV4 (+) | CONTRACCIÓN DE MÚSCULO LISO |
| | [Ca ²⁺] _i (+) | |
| | ANO6/TMEM16F(+) | |
| Fact | NO REPORTADO | NO REPORTADO |
| RESVERATROL | NO REPORTADO | CONTRACCIÓN DE MÚSCULO LISO |
| CINAMALDEHIDO | NO REPORTADO | MÚSCULO LISO |
| OLIGOSACÁRIDOS DE CITOSAN | NO REPORTADO | CONTRACCIÓN DE MÚSCULO LISO |
| ETX001 | [Ca ²⁺] _i (I) (no efecto) | ANTIFIBROSIS QUÍSTICA |

potenciador del canal TMEM16A con una dosis eficaz 50% (DE_{50}) de 0.1 microM. La activación de la corriente del canal heterólogo TMEM16A parece ser lenta lo que podría indicar que ETX001 atravesaría la membrana plasmática para actuar sobre un sitio intracelular del canal o bien sobre otras dianas que lo modularían de forma indirecta (Rumaitha et al., 2022). ETX001 aumenta la fluidificación de la secreción en células epiteliales de bronquio humano procedente de pacientes con fibrosis quística e incrementa el aclaramiento del moco de las vías aéreas en modelos de ovejitas con fibrosis quística (Liu et al., 2021).

Existen compuestos naturales utilizados ampliamente como el resveratrol, el ginsenosido, el cinamaldehído y oligosacáridos de citosán que recientemente se han descrito como activadores de los canales TMEM16A, aunque su mecanismo de acción no está totalmente dilucidado, éstos pueden servir para validar este canal como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades en las cuales esta disminuida su función, como el Síndrome de Sjögren, fibrosis quística y el síndrome del ojo seco (Liu et al., 2021). (Tabla 1)

Dada la amplia distribución del canal TMEM16A hace difícil la terapia específica pero el desarrollo de nuevos sistemas de distribución con nanopartículas que tengan dianas o tejidos específicos o su liberación controlada, podrían disminuir las complicaciones derivadas de su administración (Li et al., 2019), además se pueden hacer nuevas formulaciones de los fármacos como preparaciones tópicas o administración vía sublingual, bucal y rectal.

Actualmente se realizan estudios de la estructura y función del canal TMEM16A y sus parálogos por medio de criomicroscopía electrónica/rayos X lo que facilitará diseñar fármacos que actúen sobre una estructura más específica del canal (Falzone et al., 2018).

CONTROL FARMACOLÓGICO DEL CANAL TMEM16A SOBRE LAS VÍAS AÉREAS Y LOS VASOS SANGUÍNEOS.

Ambos territorios tienen interés en la investigación académica e industrial como sitios de actuación para los moduladores del canal TMEM16A.

CÉLULAS EPITELIALES DE LAS VÍAS AÉREAS

En este territorio TMEM16A tiene un papel de mantenimiento del líquido superficial de la luz de las vías aéreas, los canales TMEM16A en las células epiteliales se abren en respuesta a un aumento del calcio intracelular producido por vías paracrinas y autocrinas, lo que da lugar a un flujo de Cl^- hacia la membrana apical, seguido de un flujo de sodio paracelular y transcelular. Esta secreción general de $ClNa$ conduce al transporte de agua transepitelial (Figura 2). La fibrosis quística (FQ) y EPOC se caracterizan porque existe una congestión mucosa de las vías aéreas, aumento de la secreción mucosa por las células caliciformes, inflamación duradera del tracto respiratorio y deterioro general de la función pulmonar. La secreción de fluido y electrolitos en las vías aéreas y glándulas submucosas promueve el aclaramiento de moco, por eso, agentes que favorezcan la secreción fluida podrían tener un efecto beneficioso en la fibrosis quística y en la EPOC. El canal TMEM16A se ha propuesto como posible diana que facilita este proceso (Liu et al., 2021; Ferrera et al., 2011).

Tanto en la FQ como en la EPOC parece que el moco tiene alteradas sus propiedades reológicas, es decir, sus características físicas, como viscosidad o adhesividad, lo que tendría importancia en la función ciliar y el aclaramiento del moco que estarían disminuidos y tendría como consecuencia un recambio gaseoso pobre, inflamación y aumento de las infecciones bacterianas (Ferrera et al., 2011). Por otro lado, la secreción de bicarbonato (CO_3H^-) en las células epiteliales promueve la fluidificación de fluidos (por un mecanismo de flujo de glicoproteínas mucosas) (Quinton et al., 2010) (Figura 2). La alta permeabilidad del canal TMEM16A al CO_3H^- sugiere que tiene un papel importante en el flujo de moco. Finalmente, el canal TMEM16A es muy permeable al tiocianato que en las vías aéreas reacciona con peróxido de hidrógeno dando lugar a hipotiocianito que es un compuesto con actividad antimicrobiana (Agostinelli et al., 2022).

El potenciador ETX001 promueve la secreción fluida en las células epiteliales de bronquiolito humano de pacientes con FQ y aumenta el aclaramiento del moco en las vías aéreas de

modelos de FQ en modelos de ovejas, la activación farmacológica de TMEM16A produce como consecuencia, potenciales de membrana (V_m) que despolarizan las células epiteliales hacia un potencial de equilibrio para Cl^- , lo que paradójicamente disminuye la secreción de Cl^- . La secreción endógena de agonistas abre los canales de cloro y potasio, la activación de los canales de potasio en la membrana basolateral hiperpolariza la célula y mantiene una apropiada fuerza de conducción hacia el eflujo de Cl^- . Por esta razón se podría esperar que la efectividad de ETX001 aumentaría si se acompañara de la activación de los canales de K^+ de la zona basolateral de la membrana (Danahay et al., 2020).

El ETX001 se ha diseñado como potenciador de TMEM16A inhalado, para garantizar una acción directa sobre el canal en el epitelio de las vías aéreas y así minimizar la exposición sistémica, también se conoce como ETD002 y ha entrado en un ensayo clínico en Fase 1 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04488705). Se han debatido los posibles efectos adversos de los activadores de los canales TMEM16A en su potencial uso clínico, el canal TMEM16A se expresa en roedores y humanos en arterias pulmonares y se regula al alza en arterias de pacientes con hipertensión pulmonar arterial idiopática (PAH) donde el aumento de la corriente del canal TMEM16A produce contracción de los vasos, la inhibición del canal TMEM16A aumenta la hipertensión pulmonar y disminuye el trabajo del ventrículo derecho en modelos animales de PAH. Un problema potencial es que el activador del canal TMEM16A inhalado podría afectar el tono de las arterias pulmonares y/o interferir en el control del balance ventilación/perfusión (V/Q) en los pulmones (Al-Hosni et al., 2022).

La evaluación clínica de la seguridad de los activadores del canal TMEM16A se debería realizar en situación de reposo y en condiciones donde la actividad del canal TMEM16A esté aumentada (el porcentaje de canales abiertos es mayor) como en el ejercicio, situaciones de aumento de catecolaminas, situaciones en que esté activado el sistema renina-angiotensina-aldosterona como en el síndrome metabólico o algunas formas de hipertensión.

MÚSCULO LISO VASCULAR

Existe un gran número de evidencias que demuestran que el canal TMEM16A es una forma funcional de canal de Cl^- activado por Ca^{2+} (CaCCs) en las células del músculo liso vascular de diferentes lechos vasculares como son grandes y pequeños vasos, y arterias coronarias, pulmonares y cerebrales (**Figura 2**). El silenciamiento del gen del *TMEM16A* en el músculo liso de ratón abole completamente la corriente en el canal CaCC en células musculares lisas vasculares y disminuye mucho la respuesta a los agonistas contráctiles de arterias aisladas sobre G_p PCR. A nivel sistémico en ratones con silenciamiento del gen, se manifiesta como una pérdida de la presión arterial media (MAP), dando luz al papel de los canales TMEM16A en el control de esta función fisiológica (Heinze et al., 2014).

El control sistémico de la presión arterial media durante un día muestra la capacidad del riñón para realizar la diuresis y natriuresis, así como el control del volumen efectivo circulante, el retorno venoso y el gasto cardiaco. El control de la presión arterial media durante un periodo de tiempo menor muestra cambios en las resistencias periféricas y se modula por la acción de la respuesta autonómica de los barorreceptores sobre el tono arteriolar, la contracción y la frecuencia cardiaca. El canal TMEM16A tendrá más capacidad para controlar el tono de las arterias a corto plazo, además la presencia de canales TMEM16A en arteriolas aferentes glomerulares de roedores indica que están implicados en el control de flujo de sangre y la tasa de filtración glomerular que a su vez puede influir en el control de la presión arterial media a largo plazo de acuerdo con el fenotipo hipotensivo del ratón con silenciamiento de los canales TMEM16A. También se han detectado canales TMEM16A en pericitos contráctiles (alrededor de los capilares) que probablemente participen en el control del flujo sanguíneo medular renal y estarán envueltos en la modulación del gradiente de Na^+ y reabsorción de agua. Los ratones con silenciamiento de los canales TMEM16A fueron menos susceptibles al desarrollo de hipertensión en respuesta a una prolongada administración de angiotensina II, pero permanecen sensibles a la hipertensión producida por sal, lo que sugiere que la contribución del canal

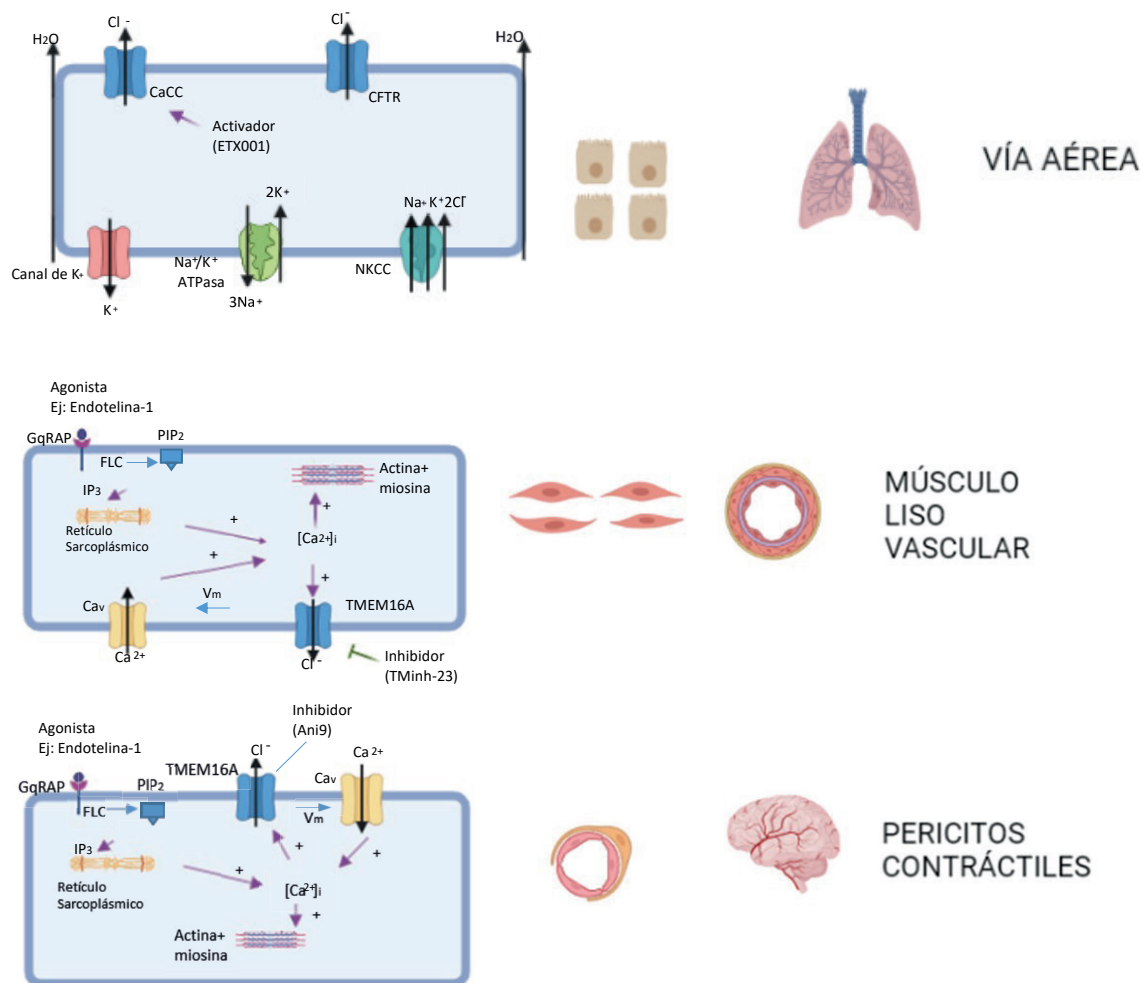


Figura 2. Representación del canal TMEM16A en varios órganos. PANEL SUPERIOR: los canales TMEM16A de las células epiteliales se abren en respuesta al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por vías paracrina y autocrina. La activación farmacológica del canal TMEM16A promueve la secreción de agua y el aclaramiento mucociliar. PANEL MEDIO: los agonistas vasoconstrictores (endotelina-1 o tromboxano) que activan los receptores acoplados a la proteína Gq (GqRAP) promueven la vía del trifosfato de inositol (IP3) y la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico que activa el canal TMEM16A causando eflujo de Cl^- y como consecuencia despolarización de la membrana y apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje operados. El resultado es la contracción de la célula, la inhibición del canal TMEM16A disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ y la contractibilidad del músculo liso vascular. PANEL INFERIOR: los agonistas vasoconstrictores inician la vía del trifosfato de inositol (IP3) y la liberación de Ca^{2+} en los pericitos de los capilares cerebrales, lo que activa el canal TMEM16A que abre los canales de Ca^{2+} voltaje operados con la consiguiente contracción de los pericitos y constricción capilar. La inhibición del canal TMEM16A puede ser un mecanismo de vasodilatación en los pericitos contráctiles. Se ha realizado con el programa BioRender.

TMEM16A a la modulación de la presión arterial media a largo plazo en estos ratones depende en mayor parte del control del canal sobre el tono vascular renal y la diuresis, que directamente sobre el Na^+ . Se podría especular que mutaciones del canal TMEM16A podrían producir hipertensión de tipo renovascular (Heinze et al., 2014). El inhibidor $TM_{inh}-23$ disminuye la presión arterial media espontáneamente en modelos de ratas hipertensas, sin embargo, la inhibición del canal TMEM16A no afecta a la presión sanguínea

en ratas o ratones normales, indicando que la inhibición es más efectiva para bajar la presión sanguínea en hipertensión que en normotensión seguramente porque el canal TMEM16A estará sobreexpresado o activado en modelos de roedores con hipertensión crónica. Una única inyección intraperitoneal a bajas dosis de $TM_{inh}-23$ causa una reducción marcada de la presión arterial media y no se observó exacerbación de la hipertensión una vez terminado el tratamiento. La vasodilatación desencadenada por el $TM_{inh}-23$

estimula los barorreceptores y produce taquicardia, aunque a los cinco días de administración estos efectos disminuyeron posiblemente por el reajuste de los barorreceptores. En experimentos *ex vivo* el TM_{inh} -23 previno firmemente la contracción de arterias mesentéricas aisladas de ratas en respuesta al potasio extracelular elevado o a la exposición de U46619 (un análogo del tromboxano). En contraste, el efecto del TM_{inh} -23 sobre la respuesta de aorta aislada al U46619 fue mucho menos pronunciada y no tuvo cambios significativos en respuesta al potasio alto lo que podría sugerir que la expresión del canal TMEM16A o el punto de activación varía entre células musculares lisas de diferentes lechos vasculares (Cil et al., 2021). La interpretación de los datos requiere un conocimiento más completo del modo de acción y del perfil de selectividad del TM_{inh} -23.

La instilación intratraqueal de ETX001 no afecta a la presión arterial media en ratas (Danahay et al., 2020) quizá debido a que la concentración sistémica no alcanza niveles suficientes para activar los canales TMEM16A vasculares, además, la presión arterial media solo se monitorizó durante 24 horas cuando ocurre la compensación de los barorreceptores por lo que se debería monitorizar durante un periodo de tiempo más largo además de determinar la función renal.

Existe una amplia lista de fármacos antihipertensivos, aun así, hay pacientes que no responden a los tratamientos accesibles o no toleran los efectos adversos que producen, la inhibición del canal TMEM16A y la vasodilatación que produce podría ser utilizada para obtener efectos antihipertensivos por un mecanismo de acción diferente al de los fármacos antihipertensivos ya existentes.

PERICITOS CONTRÁCTILES

Los pericitos cerebrales contráctiles ajustan el diámetro capilar y el flujo sanguíneo cerebral tanto fisiológicamente como en enfermedades (Figura 2). El canal TMEM16A se expresa en roedores y pericitos humanos y participa en el control del tono cerebral mediado por los pericitos (Al-Hosni et al., 2022).

El ictus isquémico puede ser el resultado de una trombosis arterial o un embolismo asociado a una disminución del flujo sanguíneo cerebral, tras el ictus la reperfusión de los capilares puede ser incompleta cuando el flujo anterior arterial se reinstaura (fenómeno de no restauración del flujo). La isquemia aumentaría la concentración de calcio intracelular en los pericitos ya que induce la disminución de ATP intracelular que reduce la extrusión de calcio (Hall et al., 2014) lo que finalmente activaría los canales TMEM16A y la constricción capilar. La elevación de sustancias constrictoras de pericitos (endotelina 1, tromboxanos) que suele ocurrir en el ictus isquémico fomentaría este proceso. La contracción de los pericitos durante largo tiempo junto con la elevación de la concentración de calcio intracelular desemboca en la muerte de los pericitos, como consecuencia los capilares se bloquean (provocando la no restauración de flujo) y disminuye el oxígeno local y el suministro de glucosa lo que impide la recuperación del daño isquémico. Adicionalmente, los pericitos pierden la función de barrera sanguínea cerebral así que la constricción y muerte de los pericitos conducen al daño cerebral tras el ictus. Los fármacos que produzcan la relajación de los pericitos inducirían una disminución del riesgo en la prevención y tratamiento del ictus isquémico en un modelo de ictus en roedores, la inhibición del canal TMEM16A con el Ani9 disminuye la concentración de calcio intracelular que sigue a la isquemia en los pericitos, la constricción capilar, la muerte de los pericitos y la paralización de los neutrófilos lo que *In vivo* se traduce en la reperfusión cerebrovascular. La delección genética de TMEM16A en los pericitos disminuye la respuesta contráctil de estas células a la endotelina 1 igual que ocurre con la administración del Ani9 lo que muestra que el canal TMEM16A es un regulador de la función capilar cerebral y del flujo local cerebral y por tanto una potencial diana terapéutica para enfermedades con alteración del flujo cerebral como ictus isquémico, enfermedad de Alzheimer y demencia vascular. La disminución concomitante de la presión sanguínea que producen los inhibidores del canal TMEM16A podría representar una ventaja terapéutica adicional en estas condiciones donde la presión arterial media elevada constituye un factor de riesgo establecido (Al-Hosni et al., 2022).

OTRAS INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Se ha visto que además de en los vasos sanguíneos, células epiteliales de las vías aéreas y células cancerígenas, los canales TMEM16A se encuentran en las neuronas de las raíces dorsales de los ganglios raquídeos, cuando se produce el silenciamiento del gen del *TMEM16A* en este territorio, se mitiga la respuesta nociceptiva al calor y a estímulos inflamatorios. Los bloqueadores de TMEM16A se han propuesto como un nuevo abordaje para el tratamiento del dolor neuropático (Lee et al., 2014).

Los canales TMEM16A se expresan en las células intersticiales de Cajal y podrían tener un papel en el vaciado y motilidad gástricos por lo que los moduladores del canal podrían modular potencialmente la contractilidad gástrica. También se han observado en el músculo liso de la vejiga, útero y esfínter interno uretral lo que podría hacer que los moduladores se pudieran usar en la vejiga hiperactiva e incontinencia urinaria y favorecer la relajación del miometrio (Cil et al., 2019; Fedigan et al., 2017).

Para finalizar, la futura utilización de los activadores del canal TMEM16A está sometida a mucha controversia ya que hay resultados contradictorios como hemos podido conocer, los canales TMEM16A están regulados al alza en enfermedades inflamatorias de las vías aéreas como asma, EPOC y Fibrosis quística, y su estímulo produce aumento de moco, fluídos y también constricción del músculo liso, algunos autores manifiestan que puede ser beneficioso su uso ya que aumenta la secreción electrolítica lo que reduce el taponamiento de moco y mejora el aclaramiento mucociliar, pero otros autores no están de acuerdo debido a la posible broncoconstricción y aumento de moco que pueden empeorar los síntomas de la enfermedad. Por otro lado, se ha observado que los inhibidores del canal bloquean la producción, secreción de moco y la broncoconstricción y la consecuente disminución de inflamación y metaplasia de células acinares, además como producen vasodilatación arterial pueden disminuir la hipertensión pulmonar que a veces se asocia al asma bronquial.

Se están desarrollando fármacos moduladores del canal TMEM16A específicos con potencia, selectividad, farmacocinética y perfil de seguridad adecuados para su uso futuro terapéutico.

Referencias

1. Ji Q, Guo S, Wang X, Pang C, Zhan Y, Chen Y, et al. Recent advances in TMEM16A: structure, function, and disease. *J Cell Physiol.* 2019; 234:7856e73.
2. Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322:590-4.
3. Agostinelli, E. and Tammaro, P. (2022) Polymodal control of TMEM16x channels and scramblases. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1580.
4. Pedemonte, N. and Galiotta, L.J. (2014) Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiol. Rev.* 94, 419–459.
5. Dang S, Feng S, Tien J, Peters CJ, Bulkley D, Lolicato M, et al. Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature.* 2017; 552:426–9.
6. Paulino C, Kalienkova V, Lam AKM, Neldner Y, Dutzler R. Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM. *Nature.* 2017; 552:421–5.
7. Rumaita Al-Hosni, Zeki Ilkan, Emilio Agostinelli, Tammaro P. The pharmacology of the TMEM16A channel: therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2022; 43: 9, 712-725.
8. Liu, Y., Wang K. (2021) The Ca²⁺-activated chloride channel ANO1/TMEM16A: an emerging therapeutic target for epithelium originated diseases? *Acta Pharm. Sin. B* 11, 1412–1433.
9. Zhang, X. Zhang G, Zhao Z, Xiu R, Jia J, Chen P, Liu Y, Wang Y, Yi J. (2021) Cepharanthine, a novel selective ANO1 inhibitor with potential for lung adenocarcinoma therapy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1868, 119132.
10. Shi, S. Biao M, Fude S, Chang Q, Gen L, Donghong S, Wenxin L, Hailin Z, Hailong A. (2022) Zafirlukast inhibits the growth of lung adenocarcinoma via inhibiting TMEM16A channel activity. *J. Biol. Chem.* 298, 101731.
11. Li C, Wang J, Wang Y, Gao H, Wei G, Huang Y, et al. Recent progress in drug delivery. *Acta Pharm Sin B* 2019; 9:1145-62.
12. Falzone, M.E. Malvezzi M, Lee B, Accardi A. (2018) Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *J. Gen. Physiol.* 150, 933–947.
13. Dinsdale, R.L., Pipatpolkai T, Agostinelli E, Russell A.J, Stansfeld P.J, Tammaro P. (2021) An outer-pore gate modulates the pharmacology of the TMEM16A channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, e2023572118.
14. Ferrera, L. Zegarra-Moran O, Galiotta L.J. (2011) Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Compr. Physiol.* 1, 2155–2174.
15. Quinton, P.M. (2010) Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *Am. J. Phys.* 299, C1222–C1233.
16. Danahay, H.L. Lilley S, Fox R, Charlton H, Sabater J, Button B, McCarthy C, Collingwood SP, Gosling M. (2020) TMEM16A potentiation: a novel therapeutic approach for the treatment of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201, 946–954.
17. Heinze, C. Seniuk A, Sokolov MV, Huebner AK, Klementowicz AE, Szijártó IA, Schleifenbaum J, Vitzthum H, Gollasch M, Ehmke H, Schroeder BC, Hübner CA. (2014) Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure. *J. Clin. Invest.* 124, 675–686.
18. Cil O, Chen X, Askew Page HR, Baldwin SN, Jordan MC, Myat Thwe P, Anderson MO, Haggie PM, Greenwood IA, Roos KP, Verkman AS. (2021) A small molecule inhibitor of the chloride channel TMEM16A blocks vascular smooth muscle contraction and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.* 100, 311–320.
19. Hall C.N, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60.
20. Cil O, Anderson MO, Yen R, Kelleher B, Huynh TL, Seo Y, Nilsen SP, Turner JR, Verkman AS. (2019) Slowed gastric emptying and improved oral glucose tolerance produced by a nanomolar-potency inhibitor of calcium-activated chloride channel TMEM16A. *FASEB J.* 33, 11247–11257.
21. Fedigan S, Bradley E, Webb T, Large RJ, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, Sergeant GP. (2017) Effects of new-generation TMEM16A inhibitors on calcium-activated chloride currents in rabbit urethral interstitial cells of Cajal. *Pflugers Arch.* 469, 1443–1455.