

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA

CURSO 2021-22

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MODULADORES DE TRPM8

Autor: Elena Ramírez Sánchez

Tutor académico: Dra. Asia Fernández Carvajal

Co-tutor: Alicia Medina Peris

Declaración de tutores

Dña. ASIA FERNÁNDEZ CARVAJAL, Doctora y Catedrática de Universidad del área de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Dña. ALICIA MEDINA PERIS, estudiante de doctorado cursando en tercer curso en el Programa de doctorado de Biología Molecular y celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN

que el presente trabajo titulado:

“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MODULADORES DE TRPM8”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. Elena Ramírez Sánchez

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 18 de julio de 2022.

Resumen

Los receptores de potencial transitorio (TRP) desempeñan una gran cantidad de funciones fisiológicas y patológicas en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares. Dentro de esta familia, hay un grupo que responde a cambios de temperatura, denominado termoTRP, donde se encuentra el canal TRPM8, el cual es el objeto de estudio de trabajo. El canal TRPM8, es un canal polimodal catiónico no selectivo permeable a calcio, propuesto como el principal receptor del frío inocuo, sensible a temperaturas suaves y a compuestos refrescantes naturales y sintéticos. Se expresa en varios tejidos del cuerpo humano y tiene implicación en gran variedad de procesos fisiológicos y, por tanto, una alteración de su expresión o disfunción provoca múltiples enfermedades. Los moduladores específicos de este canal, siguen siendo hoy en día una necesidad clínica, por ello, el objetivo general de este trabajo fue la caracterización de moduladores TRPM8 mediante ensayos de cribado, potencia, citotoxicidad y especificidad en modelos *in vitro*. Se parte de una familia de 8 compuestos, los cuales presentaron actividad antagonista frente a TRPM8, mostrando una potencia en el rango micromolar. El compuesto 1 el más potente de todos con una IC_{50} de $0,07 \pm 0,03 \mu\text{M}$ y el que menor toxicidad presentó, por tanto, es el compuesto con mejor perfil farmacológico. Además, estos compuestos también modulan a los canales TRPV1. Por último, la caracterización completa mediante electrofisiología de los antagonistas con mejores propiedades permitirá su posterior desarrollo mediante ensayos preclínicos y clínicos futuros.

Palabras claves

Canales iónicos, TermoTRP, TRPM8, TRPV1, modulador, antagonista

Abstract

The transient receptor potential (TRP) plays many physiological and pathological roles in response to extracellular and intracellular stimulation. In this family, there is a group that responds to temperature changes, the thermoTRP group, where the TRPM8 channel is located, which is the subject of this study. The TRPM8 channel is a non-selective cationic polymodal calcium-permeable channel, proposed as the main receptor of harmless cold, sensitive to soft temperatures and to natural and synthetic cooling compounds. It is expressed in several tissues of the human body and is involved in a wide variety of physiological processes and, therefore, an alteration of its expression or dysfunction causes multiple diseases. Specific modulators of this channel remain a clinical necessity today, therefore, the global aim of this work was to characterise TRPM8 modulators by screening, potency, cytotoxicity and specificity assays *in vitro* models. A family of 8 compounds was used, all of them showed antagonistic activity against TRPM8, with potency in the micromolar range. The compound 1 being the most potent of all with an IC_{50} of $0.07 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and the one with the lowest toxicity, thus being the compound with the best pharmacological profile. In addition, these compounds also modulate TRPV1 channels. Finally, full characterisation by electrophysiology of the antagonists with the best properties will allow further development in future preclinical and clinical trials.

Keywords

Ion Channels, ThermoTRP, TRPM8, TRPV1, modulator, antagonist

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SUPERFAMILIA DE CANALES TRP	1
1.1.1. Composición de la superfamilia de canales TRP.	1
1.2. CANALES TERMO TRP	2
1.2.1. Subfamilia TRPV	4
1.2.2. Subfamilia TRPA	5
1.2.3. Subfamilia TRPM	5
1.3. CANAL TRPM8	5
1.3.1. Estructura molecular y modulación.	6
1.3.2. Papel fisiológico y patológico.	8
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. CULTIVOS CELULARES	16
3.2. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS.	17
3.3. ENSAYOS FLUORIMÉTRICOS	18
3.3.1. Procedimiento experimental	19
3.3.2. Análisis de datos	20
3.4. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIA	21
3.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT	22
3.5.1. Procedimiento experimental	22
3.5.2. Análisis de datos	23
3.6. ENSAYOS ELECTROFISIOLÓGICOS MEDIANTE PATCH-CLAMP	23
3.6.1. Procedimiento experimental	23
3.6.2. Análisis de datos	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

4.1. CRIBADO DE COMPUESTOS MODULADORES DE TRPM8.....	25
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA POTENCIA DE LOS COMPUESTOS .	26
4.3. ESPECIFICIDAD DE LOS COMPUESTOS	31
4.4. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS COMPUESTOS	28
4.5. VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT	33
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	35
6. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Las siete subfamilias TRP.	2
Figura 2. Las neuronas sensoriales que inervan la piel contienen canales catiónicos no selectivos termosensibles en sus terminales que detectan una amplia gama de temperaturas.	3
Figura 3. Representación de la arquitectura tetramérica y subunidad individual de TRPM8.	7
Figura 4. Regulación del canal TRPM8 por PIP₂ y receptores acoplados a proteínas G.	8
Figura 5. Funciones fisiológicas de TRPM8.	9
Figura 6. Papel y mecanismo de ajuste de TRPM8 en la percepción anormal del frío/dolor	12
Figura 7. Agonistas de TRPM8 y derivados de mentol.	13
Figura 8. Antagonistas de TRPM8.	14
Figura 9. Esqueleto base de los compuestos utilizados.	18
Figura 10. Diagrama de flujo de calcio por activación de canales permeables a calcio en presencia de un agonista.	19
Figura 11. Diseño de un ensayo de fluorescencia para el cribado de moduladores de canales termoTRP.	19
Figura 12. Diagrama de los pasos básicos para obtener la configuración whole-cell en Patch-clamp.	24
Figura 13. Cribado de los compuestos moduladores de TRPM8	25
Figura 14. Curvas dosis-respuesta de los compuestos para determinar la potencia.	27
Figura 15. Confirmación de la actividad antagonista	28
Figura 16. Porcentaje de bloqueo del canal TRPM8.	29
Figura 17. Actividad del canal TRPM8 en presencia o ausencia del compuesto 1 a dos concentraciones.	30

Figura 18. Especificidad de los compuestos en TRPV1	31
Figura 19. Viabilidad en % de las células en presencia de los compuestos.....	33
Tabla 1. Medio de mantenimiento de las líneas celulares	16
Tabla 2. Determinación de la potencia de los compuestos.	26
Tabla 3. Determinación de la potencia de los compuestos en TRPV1.....	29

ABREVIATURAS

AMTB: N-(3-Aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil) benzamida

BCTC: 4-(3-cloro-2-piridinil)-N-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-1-piperazinocarboxamida

DAG: Diacilglicerol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfoxido

DO: Densidad óptica

EC50: Concentración efectiva media máxima

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero fetal bovino

IC50: Concentración media máxima inhibidora

IP3: Inositol trifosfato

MHR: Regiones de homología de melastatina

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NEM AA: Aminoácidos no esenciales

NOMPC: No mechanoreceptor potencial C channel

PBS: Tampón fosfato salino

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PLA₂: Fosfolipasa A₂

PLC: Fosfolipasa C

SDS: Dodecilsulfato sódico

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPA: Receptor de potencial transitorio anquirina

TRPC: Receptor de potencial transitorio canónicos

TRPM: Receptor de potencial transitorio melastatina

TRPML: Receptor de potencial transitorio mucopolipina

TRPN: Receptor de potencial transitorio NOMPC

TRPP: Receptor de potencial transitorio policistina

TRPV: Receptor de potencial transitorio vaniloide

TRPY: Receptor de potencial transitorio yeast

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SUPERFAMILIA DE CANALES TRP

La superfamilia de canales iónicos TRP (Transient Receptor Potential) destacan por su gran diversidad en cuanto a selectividad de iones, modos de activación y funciones fisiológicas, teniendo especial importancia en la fisiología sensorial, ya que desempeñan funciones en cada modalidad sensorial, como son la visión, el olfato, el oído, la mecanosensación y la termosensación. Además, actúan con sensores celulares ya que reaccionan a cambios en el entorno celular (Montell, 2005).

Se describieron por primera vez en *Drosophila melanogaster* a finales de 1960, cuando los fotorreceptores que poseían una mutación en el gen TRP daban lugar a una respuesta transitoria de voltaje a la luz continua (Clapham, 2003). Posteriormente, en 1995, se notificó el primer homólogo humano, que surgió de la caracterización de canales que explicasen la entrada de Ca^{2+} altamente selectiva en células no excitables (Li, 2017; Wes et al., 1995). Desde entonces han sido identificados 28 canales TRP (Montell, 2005).

1.1.1. Composición de la superfamilia de canales TRP.

La superfamilia de canales TRP se divide generalmente en los grupos 1 y 2, que a su vez se dividen en siete subfamilias (**Figura 1**). Existen una octava subfamilia, los TRPY, compuestos por los TRP de levaduras. La separación en los dos grupos se debe a las diferencias en secuencias de aminoácidos y estructuras topológicas. Los canales TRP constan de cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene seis segmentos transmembrana. Las regiones de secuencia más variables son los extremos carboxilo y amino terminal (González-Ramírez et al., 2019). El grupo 1 consta de 5 subfamilias: **TRPC** (canónicos, 7 miembros), **TRPV** (vaniloide, 6 miembros), **TRPM** (melastatina, 8 miembros), **TRPA** (anquirina, 1 miembro) y **TRPN** (NOMPC, ausente en mamíferos). Los TRP del grupo 1 presentan una mayor homología de secuencia con el miembro original, concretamente esta secuencia abarca los seis segmentos transmembrana, incluido el loop que forma el poro situado entre los segmentos quinto y sexto. Los canales TRPC, TRPM y TRPN contienen además un dominio TRP que incluye la región más conservada, TRP-box, formado por una secuencia de seis aminoácidos. Con la excepción de los canales TRPM, los TRP del grupo 1 tienen múltiples N-terminales, donde existe varias repeticiones de anquirina en los TRPC, TRPA y TRPV. Por otro lado, el grupo 2

consta de 2 subfamilias: **TRPP** (policistina, 3 miembros) y **TRPML** (mucopolipina, 3 miembros) que están lejanamente relacionados con el TRP del grupo 1 debido a la baja similitud de secuencia y a que poseen un loop extracelular entre el primer y segundo segmento transmembrana. (Li, 2017; Venkatachalam & Montell, 2007).

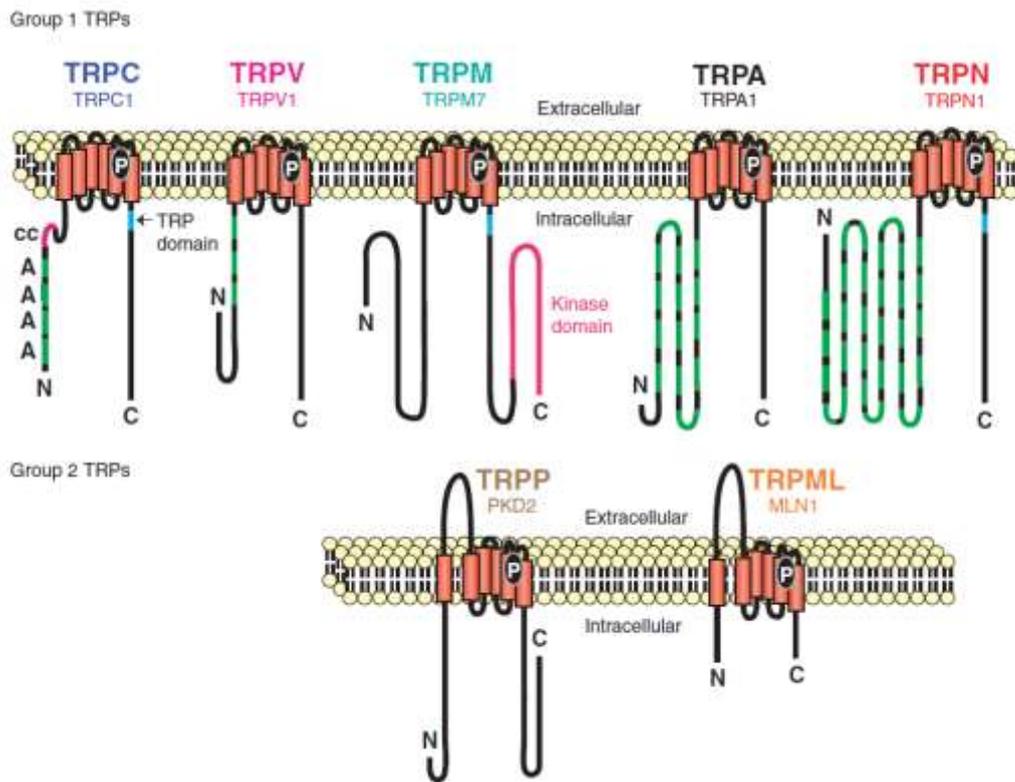


Figura 1. Las siete subfamilias TRP. Se observan los representantes de las cinco subfamilias del grupo 1 y de las dos del grupo 2. Se indican las repeticiones de anquirina (A), dominio TRP y dominio quinasa (solo en TRPM6 y 7) (Montell, 2005).

Los canales TRP desempeñan una gran cantidad de funciones fisiológicas y patológicas en respuesta a estímulos tanto extracelulares como intracelulares, como los cambios de temperatura, pH, disminución del calcio intracelular, lesiones, así como a sustancias químicas volátiles y citoquinas, ya que funcionan como integradores de varias vías de señalización (González-Ramírez et al., 2019).

1.2. CANALES TERMO TRP

Inicialmente identificados como receptores sensibles a temperatura, los termoTRPs, subfamilia de los canales TRP, son activados por cambios en la temperatura ambiental, desde el frío nocivo hasta el calor perjudicial (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Laing & Dhaka, 2016). Dentro de esta familia se incluyen cuatro canales activados por el calor

(TRPV1-4) y dos activados por el frío (TRPA1 y TRPM8)(Dhaka et al., 2006). Se localizan en una amplia gama de neuronas somatosensoriales primarias que inervan la piel que detectan y transducen específicamente los cambios térmicos. Además de la temperatura, los canales termoTRP son integradores polimodales de gran variedad de estímulos, siendo activados por una amplia gama de compuestos naturales presentes en los alimentos y en el medio ambiente (**Figura 2**)(Vay et al., 2012).

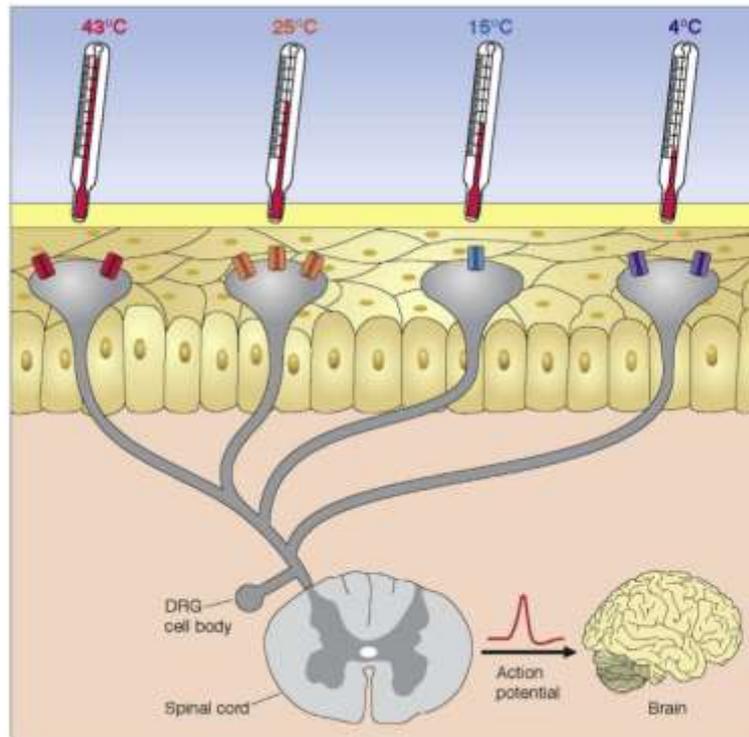


Figura 2. Las neuronas sensoriales que inervan la piel contienen canales catiónicos no selectivos termosensibles en sus terminales que detectan una amplia gama de temperaturas. La activación de estos canales despolariza la neurona sensorial, lo que lleva a la propagación de potenciales de acción que se transmiten a la médula espinal y finalmente llegan al cerebro (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014).

Estructuralmente son similares al resto de los canales TRP, forman tetrámeros funcionales y cada monómero consta de seis segmentos transmembrana y extremos N- y C- terminal citosólicos. Los segmentos 5 y 6 junto con el loop de conexión forman el poro, mientras que se cree que los segmentos de 1 al 4 y las terminaciones citosólicas contienen los dominios reguladores y de interacción proteica con características distintivas para cada subfamilia de canales TRP (Gaudet, 2009). A pesar de la diversidad estructural entre los canales termoTRP, comparten la característica común de la sensación de temperatura, sin embargo, es posible que no exista un detector dependiente de temperatura en un sitio

especifico. La información estructural nos facilita la comprensión de cómo funcionan estos canales como termosensores (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014).

1.2.1. Subfamilia TRPV

TRPV1 fue el primer canal termoTRP que se identificó y caracterizó, siendo el canal TRP más estudiado debido a su papel en la sensación de dolor y temperatura. Es activado por compuestos químicos como la capsaicina, el principio activo de los chiles, que provoca una sensación de dolor ardiente, así como por aumentos de temperatura en el rango nocivo, con un umbral de activación a 43°C (Caterina et al., 1997). Es un canal permeable a Ca^{2+} potenciado por el calor y la disminución de pH e inhibido por el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). Su sensibilidad térmica se ve potenciada por la bradiquinina y el factor de crecimiento neuronal, que actúan a través de la fosfolipasa C que hidroliza PIP_2 (Clapham, 2003). Se expresa aproximadamente en el 30-50% de todas las neuronas somatosensoriales y estudios de eliminación han confirmado el papel de TRPV1 en la nocicepción y detección de calor (Laing & Dhaka, 2016). También se expresa en otras células y tejidos, como la vejiga (Venkatachalam & Montell, 2007).

TRPV2 que posee un 50% de identidad a TRPV1, media la sensación de calor nocivo de alto umbral ($>52^\circ\text{C}$) (Ferrandiz-Huertas et al., 2014). Además, es activado por concentraciones altas de 2-aminoetoxifenilo borato (2-APB), derivados de Cannabis sativa, la inflamación y estímulos osmóticos, sin embargo, es insensible a la capsaicina. Su actividad se ve potenciada por las vías de señalización del factor de crecimiento y PI3-kinasa (Marwaha et al., 2016). Este canal se expresa en sistemas diferentes al sensorial, lo que sugiere funciones adicionales aun no identificadas (Vargas et al., 2008).

Por otro lado, el TRPV3 muestra un 43% de homología con la secuencia de TRPV1 y es activado por temperaturas no nocivas ($>34^\circ\text{C}$) (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014) y por un aumento de la corriente tras la estimulación repetitiva de calor. Se activan y sensibilizan con el clavo, alcanfor, orégano e irritantes extraídos del tomillo (Xu et al., 2006). Su expresión se ve restringida a las células epiteliales lo que sugiere que el papel que pueda tener en la sensación térmica o nocicepción sea indirecto (Laing & Dhaka, 2016).

Por último, TRPV4, con una homología de 40% con TRPV1, es un canal polimodal activado por gran variedad de estímulos tanto físicos como químicos, definido como un

mecano/osmosensible y sensor de calor moderado ($>25^{\circ}$) (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014; Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Marwaha et al., 2016). Al contrario que TRPV3, TRPV4 se desensibiliza con la estimulación repetitiva del calor. Sin embargo, la expresión generalizada en muchos tejidos provoca controversia respecto al papel de TRPV4 en la sensación de calor nocivo (Laing & Dhaka, 2016).

1.2.2. Subfamilia TRPA

El canal, TRPA1, es característico por ser el único miembro de esta subfamilia en mamíferos y por la presencia de un gran número de motivos de repetición de anquirina situados en la región amino terminal (Marwaha et al., 2016). Es activado por un enfriamiento de la temperatura hasta el rango de temperatura del frío nocivo ($<17^{\circ}\text{C}$) (Vay et al., 2012). Además, también es activado por componentes picantes o irritantes naturales, como el aceite de mostaza o canela, por bradiquinina y péptidos inflamatorios. Se expresa en el 30% de las neuronas que expresan TRPV1 lo que respalda el papel de TRPA1 en la nocicepción, aunque existe controversia sobre la implicación en la sensación de frío nocivo, existe un acuerdo sobre el papel de TRPA1 en la quimonocicepción al servir como detector de irritantes químicos que provocan dolor agudo e inflamatorio (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Laing & Dhaka, 2016; Vargas et al., 2008).

1.2.3. Subfamilia TRPM

La subfamilia de canales TRP de melastatina está compuesta por ocho miembros, que se subdividen por similitud estructural en cuatro grupos: TRPM1/3, TRPM6/7, TRPM4/5 y TRPM2/8. Sin embargo, el TRPM8 es el único miembro de esta subfamilia sensible a la temperatura, activado por un rango de temperaturas frías desde inocuas a nocivas ($10-28^{\circ}\text{C}$), así como por agentes refrescantes como mentol e icilina (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014). También es activado por cambios en la osmolaridad extracelular y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Además, se expresa en el 10-15% de todas las neuronas somatosensoriales (Bertamino et al., 2020; Laing & Dhaka, 2016).

1.3. CANAL TRPM8

El canal TRPM8 ha sido propuesto como el principal receptor del frío inocuo. Originalmente el gen TRPM8 se descubrió mediante el cribado de una biblioteca de cDNA extraído de células de cáncer de próstata, posteriormente se identificó en las

neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal y del ganglio trigémino, que inervan tejidos muy sensibles al frío, como la piel, el epitelio de la cavidad oral, la mucosa nasal, la lengua y la córnea y fue cuando se demostró que actúa como un sensor de frío. Todo esto condujo a considerar este canal como diana para la hipersensibilidad al frío asociada al dolor inflamatorio y neuropático (Izquierdo et al., 2021; Journigan et al., 2021).

1.3.1. Estructura molecular y modulación.

El canal TRPM8, es un canal catiónico no selectivo permeable a calcio de 1104 aminoácidos, que funciona como homotetrámero. La primera estructura de TRPM8 completa fue resuelta mediante criomicroscopía electrónica (cryo-EM), y provenía de la mosca *Ficedula albicollis* (faTRPM8), la cual posee una alta homología con la humana, con una identidad de secuencia del 83% (Izquierdo et al., 2021; Yin et al., 2018). Su masa molecular es aproximadamente 510 kDa y posee dominios citoplasmáticos N- y C-terminales importantes para la actividad del canal inducida por ligandos y frío. El extremo amino contiene las cuatro regiones de homología de melastatina (MHR 1-4), que se conservan en todos los miembros de esta subfamilia. La función de estas regiones no está clara, sin embargo, su eliminación interrumpe la actividad del canal. En el extremo carboxilo encontramos la secuencia TRP-box conservada, importante para la activación y el tráfico de TRPM8 a la membrana plasmática, un dominio de hélice enrollada (coiled-coil) conservado, necesario para la tetramerización del canal y para su activación por temperatura y ligandos. Por ello, se cree que el extremo C-terminal está involucrado directamente en la sensación de frío de TRPM8 (Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014).

Las estructuras disponibles de TRPM8 muestran una disposición en capas, concretamente en 3 capas: los dominios transmembrana, los dominios MHR3/4 y, por último, los dominios MHR1/2. La organización de los dominios transmembrana son comparables a los otros canales de esta subfamilia y de otras. Las hélices transmembrana 5 y 6 junto con el loop de conexión forman el poro conductor de iones, que está rodeado de los segmentos transmembrana 1-4, los cuales poseen los sitios de unión a Ca^{2+} y otros ligandos, como la icilina o PIP2 (**Figura 3**)(Huang et al., 2020).

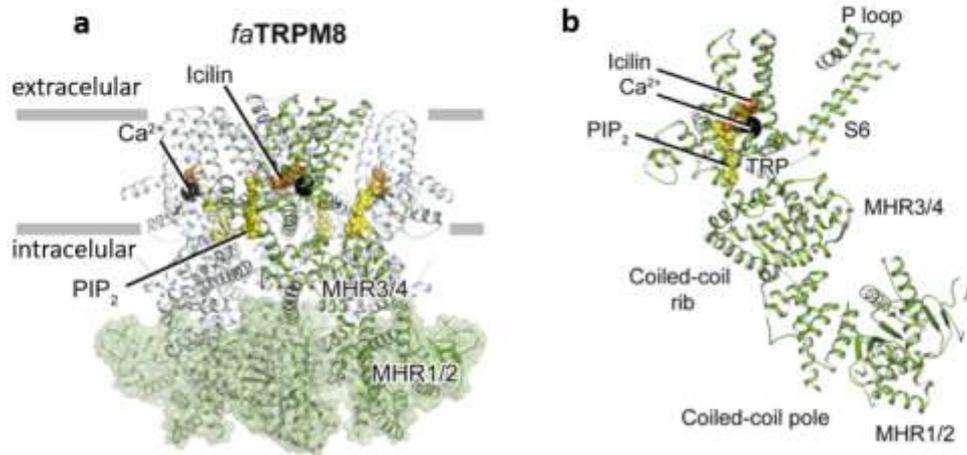


Figura 3. Representación de la arquitectura tetramérica y subunidad individual de TRPM8. a. estructura tetramérica general de faTRPM8, vista paralela a la membrana. b. Subunidades individuales vistas paralelas al plano de la membrana. Con elementos de estructura secundaria y sitios de unión etiquetados. Adaptado de (Huang et al., 2020).

Se han definido dos estados conformacionales de inactivación distintos de TRPM8: un estado cerrado o bloqueado por la presencia de un antagonista, y un estado desensibilizado por la presencia prolongada de un agonista y Ca^{2+} . En estos dos estados juega un papel importante el bolsillo de unión de ligandos, ya que en el estado cerrado se aprecia la ausencia del enlazador de los segmentos transmembrana 4-5 y la posición del dominio TRP, que permite al antagonista bloquear el canal, sin embargo, en el estado desensibilizado, el bolsillo definido por estas interacciones se deshace y no puede acomodar las moléculas antagonistas, pero puede ajustarse a los agonistas como la icilina (Diver et al., 2019).

La activación de TRPM8 va seguida de una desensibilización dependiente de Ca^{2+} extracelular, a través de la entrada de calcio dependiente de TRPM8, además este proceso depende de la activación de una isoforma de la fosfolipasa C (PLC) mediada por Ca^{2+} y el posterior agotamiento de PIP_2 . Por otro lado, un mecanismo de inhibición es la activación tanto por voltaje como químicamente de una de la fosfolipasa C sensible a Ca^{2+} y por consiguiente la disminución de los niveles de PIP_2 , ya que se requiere la presencia de PIP_2 para la actividad del canal. Otras vías de señalización además de PLC- PIP_2 modulan la actividad del canal, los lisofosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico formado tras la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), modulan TRPM8 positiva o negativamente, respectivamente. Además, existen una inhibición directa por la activación de los receptores acoplados a proteína G_q por mediadores

inflamatorios como bradiquinina e histamina (**Figura 4**) (Laing & Dhaka, 2016; L. Liu & Rohacs, 2020).

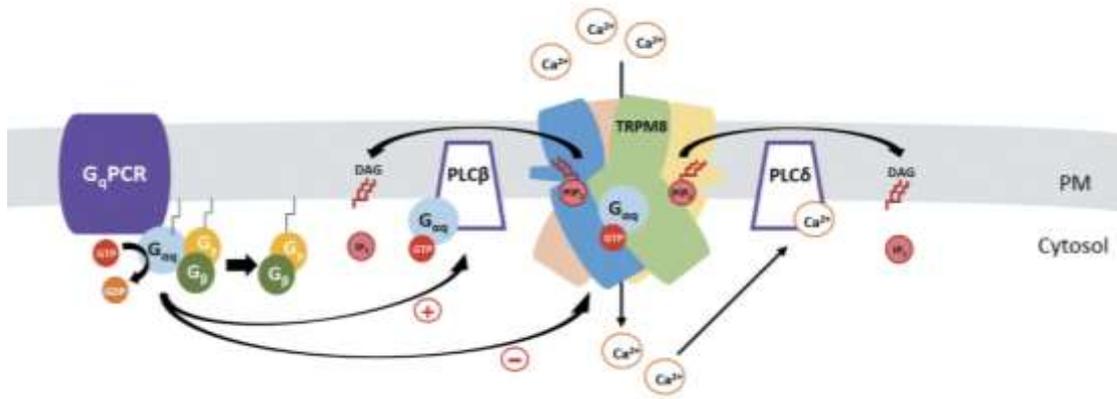


Figura 4. Regulación del canal TRPM8 por PIP_2 y receptores acoplados a proteínas G. La unión con un agonista produce la entrada de calcio a través del canal estimula la isoforma PLC, que conlleva la hidrólisis de PIP_2 a inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) comenzando la cascada de señalización intracelular. También intervienen otras moléculas como los receptores acoplados a proteína G, que estimulan las fosfolipasas C e induce la disminución de PIP_2 , inhibiendo la actividad del canal (L. Liu & Rohacs, 2020).

1.3.2. Papel fisiológico y patológico.

Inicialmente, el canal TRPM8, debido a su expresión preferente en la próstata y a un aumento de su expresión en el cáncer de próstata, se consideró un marcador bioquímico y una diana para el diagnóstico, progreso y tratamiento del cáncer de próstata. Desde la clonación de un nuevo gen *trp-p8* en 2001, se ha identificado la expresión de TRPM8 en gran variedad de órganos y tejidos como, páncreas, testículos, mama, timo, pulmones, túbulos seminíferos, piel, vejiga, hígado, colon, esperma, mucosa nasal y cilios. Debido a esta amplia expresión de TRPM8, desempeña una amplia gama de funciones fisiológicas y participa en una amplia gama de patologías, por ello el canal TRPM8 es definido como diana terapéutica (**Figura 5**) (Clare, 2010; Yuqian Liu et al., 2020).

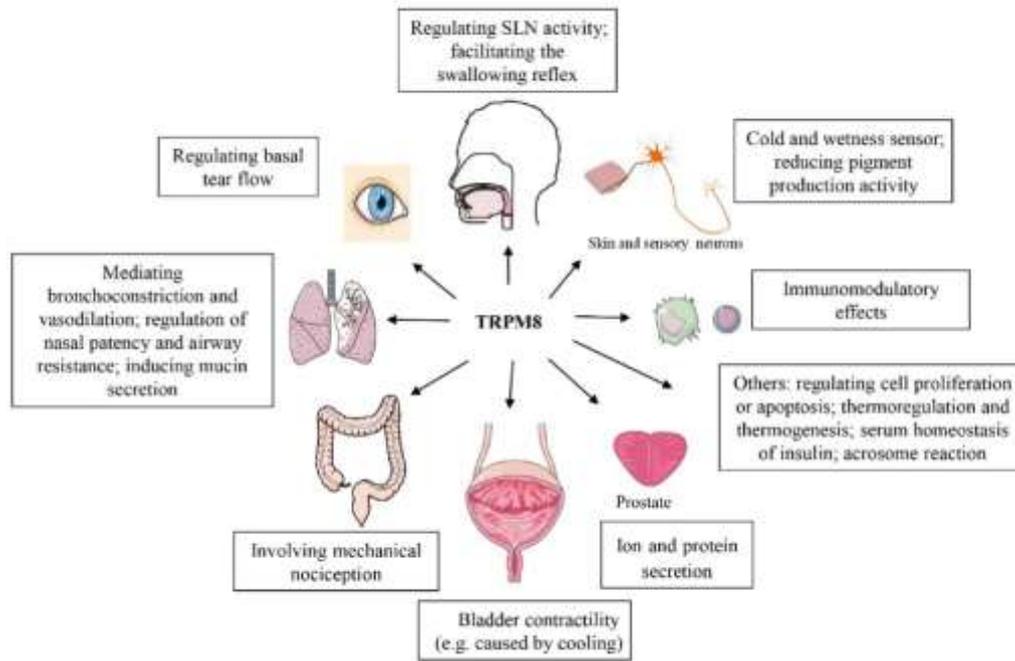


Figura 5. Funciones fisiológicas de TRPM8 (Yuqian Liu et al., 2020).

Los canales iónicos TRPM8 se expresa en un 5-20% de neuronas sensoriales y tiene un claro papel como sensor térmico, activándose con temperaturas ambientales frías, además de provocar termogénesis y estar implicado en la termorregulación (Yi Liu & Qin, 2011).

La activación de TRPM8 en la piel actúa como un termostato para evitar un enfriamiento mayor o doloroso. Existen evidencias que señalan que los antagonistas de TRPV1 producen hipertermia mientras que los agonistas producen una disminución de la temperatura corporal o hipotermia. Esta hipertermia también se produce de forma similar con la administración de agonistas de TRPM8, por tanto una inhibición de TRPM8 producirá hipotermia (Almaraz et al., 2014; DeFalco et al., 2011).

Por otro lado, la activación de los canales TRPM8 por el frío, provoca respuestas autonómicas respiratorias, como la tos, la constricción de las vías respiratorias y secreción de la mucosa (Yuqian Liu et al., 2020). En el sistema genitourinario, los canales TRPM8 participan en la contractilidad de la vejiga y la función mecanosensorial de la misma (Vahabi et al., 2013). Además, TRPM8 juega un papel esencial en las funciones de la próstata, como la regulación de la proliferación celular y la secreción de iones y proteínas (Zhang & Barritt, 2004).

Por último, en el sistema inmunológico, TRPM8 modula la respuesta inmune, ya que la activación o eliminación genética de TRPM8 en macrófagos determinó acciones antiinflamatorias o proinflamatorias mediante la regulación de la producción de IL-10 y TNF- α (Khalil et al., 2016). Además la inhibición del canal TRPM8 con AMTB, suprime la actividad de células T y suprime la producción de IL-2 e IL-6 (Kume & Tsukimoto, 2019).

1.3.2.1. TRPM8 en el cáncer de próstata

En la glándula prostática sana, los canales TRPM8 se expresan a niveles moderados en las células epiteliales secretoras apicales, sin embargo, estos niveles aumentan considerablemente en la hiperplasia benigna y en estadios tempranos y sensibles a andrógenos del cáncer de próstata. Existe una correlación positiva entre la sensibilidad a los andrógenos y la expresión de TRPM8, ya que en el tejido metastásico se pierde la sensibilidad a estos. Esta correlación ha despertado interés en el uso de TRPM8 como marcador de diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (DeFalco et al., 2011).

La expresión de TRPM8 está regulada por el receptor de andrógenos, la proteína supresora de tumores p53 y la testosterona. El promotor de TRPM8 posee sitios de unión putativos para p53, y la sobreexpresión de p53 aumenta los niveles de ARNm de TRPM8 de manera significativa, sugiriendo TRPM8 como diana posterior para los genes supresores de tumores (Yuqian Liu et al., 2020). Sin embargo, existe controversia sobre la función de TRPM8 en condiciones normales, es posible que tenga un papel en la regulación de la proliferación celular/apoptosis, ya que el uso de antagonistas y la eliminación de TRPM8 mediante siRNA en líneas celulares de cáncer de próstata dio lugar a una pérdida de viabilidad y a la inducción de apoptosis, por otro lado, la activación con mentol o icilina, no provocó un aumento en la proliferación de las células cancerosas. Otra posibilidad es que tenga un papel en la secreción de iones y proteínas, función importante de la próstata. Otras funciones estarían relacionadas con la expresión de TRPM8 en el retículo endoplasmático como regulador de los depósitos de calcio intracelular (DeFalco et al., 2011; Yuqian Liu et al., 2020).

En cualquier caso, los patrones de expresión y los experimentos de inhibición apoyan el papel de TRPM8 en la supervivencia y proliferación del cáncer de próstata en fases iniciales, por tanto, no es sorprendente el interés de industrias farmacológicas por

desarrollar antagonistas de TRPM8 para el tratamiento del cáncer de próstata (DeFalco et al., 2011).

1.3.2.2. TRPM8 en desordenes urinarios

Las patologías asociadas a TRPM8 del sistema urinario incluyen trastornos de vejiga hipersensible, reflejo de enfriamiento de la vejiga, hiperactividad y carcinoma urotelial de vejiga. En la vejiga se ha observado expresión de TRPM8 en el urotelio, así como en las fibras nerviosas suburoteliales A y C (Yuqian Liu et al., 2020).

La termosensibilidad de la vejiga fue observada por primera vez por Bors y Blinn, quienes describieron un reflejo de enfriamiento de la vejiga, que implica contracciones involuntarias sostenidas del detrusor como respuesta a la administración intravesical de agua fría o solución salina (Bors & Blinn, 1957). Este efecto se ha visto potenciado por el mentol, lo que indica un papel de TRPM8 en la mediación de este efecto.

La expresión de TRPM8 está aumentada significativamente en pacientes con vejiga hiperactiva o con síndrome de vejiga dolorosa, en ambas, se correlacionó directamente la gravedad de los síntomas con las sobreexpresión del canal (DeFalco et al., 2011).

1.3.2.3. TRPM8 en el dolor

La modulación de la función del canal TRPM8 en el sistema nervioso es beneficiosa para el manejo del dolor neuropático, especialmente las migrañas, ya que se expresan en un subconjunto de neuronas sensoriales de pequeño diámetro de los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino (Moore et al., 2018), incluidos en los circuitos neuronales relacionados con la patogénesis de las migrañas. Por un lado, la activación por frío de TRPM8 puede causar cefalea, como la causada por el helado y la migraña iniciada por las temperaturas frías. Pero si es activado simultáneamente con una inflamación en curso puede actuar como analgésico, como es el caso de la aplicación tópica de mentol para aliviar la migraña (Yuqian Liu et al., 2020).

En otros dolores neuropáticos como el inducido por quimioterapia o una lesión por del nervio ciático, la inhibición de la actividad de TRPM8 puede exacerbar el dolor y por el contrario, la activación de TRPM8, en sí misma, es analgésica (DeFalco et al., 2011).

En la hipersensibilidad al frío asociada al dolor neuropático mediada por TRPM8 la expresión de este canal se ve aumentada, aumentando así la sensibilidad al frío. Este efecto sensibilizador de TRPM8 sobre el dolor por frío pueden ser modulados por lípidos endógenos, por ejemplo, la activación del canal por frío y mentol requiere la presencia de PIP₂, además de que por sí mismo puede activar al canal. Por tanto, la alodinia y la hiperalgesia mediadas por TRPM8 podrían atenuarse regulando los niveles de lípidos endógenos (**Figura 6**) (Journigan & Zaveri, 2013; Moore et al., 2018).

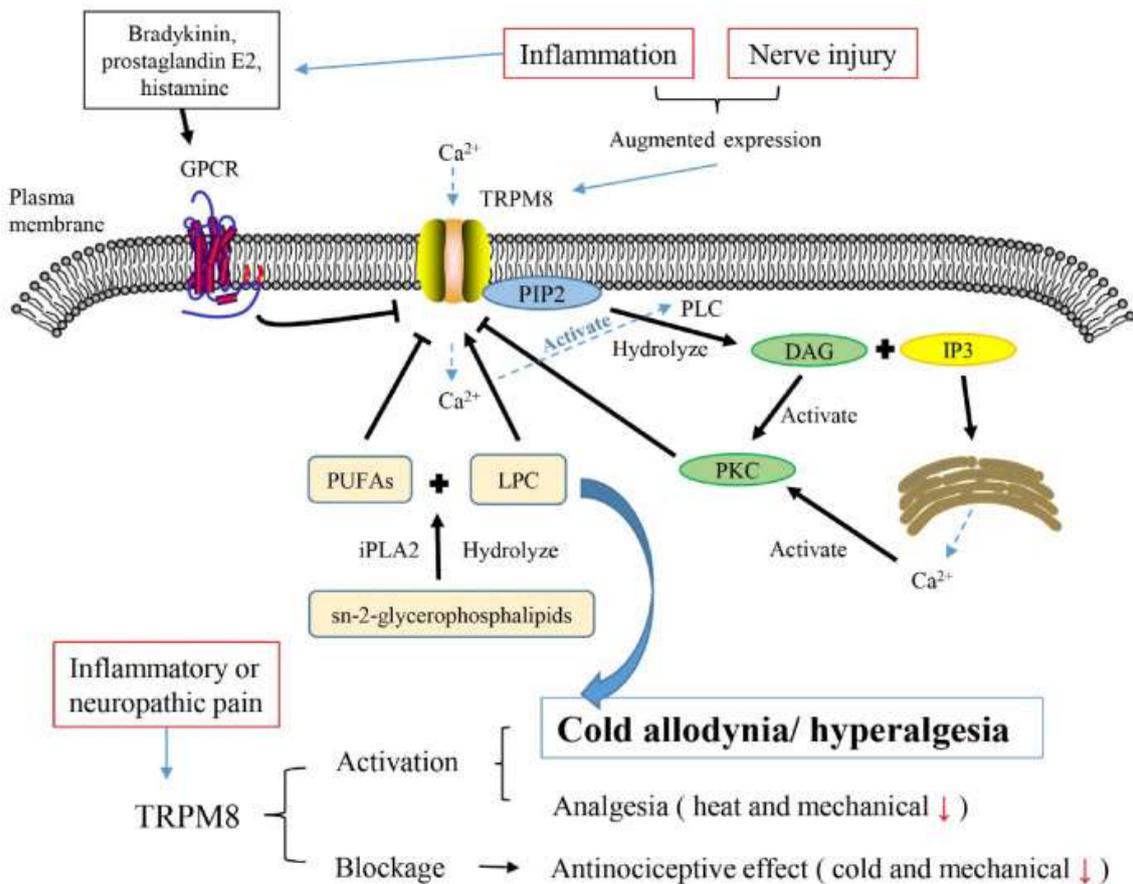


Figura 6. Papel y mecanismo de ajuste de TRPM8 en la percepción anormal del frío/dolor (Yuqian Liu et al., 2020).

Por último, también se ha demostrado el papel de TRPM8 para el control del picor, ya que el mentol funciona como antipruriginoso, aunque la aplicación de mentol tópico puede llegar a ser irritante (Yuqian Liu et al., 2020).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Debido a la importancia fisiológica y terapéutica de los canales TRPM8, se han dedicado muchos esfuerzos a la búsqueda de moduladores selectivos, tanto agonistas como antagonistas de TRPM8 (Bonache et al., 2020). Ya que la regulación de la expresión y/o los cambios morfológicos implicados en procesos patológicos, representa una nueva oportunidad para la intervención terapéutica en el dolor, cáncer y la inflamación, entre otras patologías (Bertamino et al., 2020).

Entre los agonistas a destacar, encontramos el mentol, derivados de mentol, la icilina, las amidas terciarias y diferentes productos naturales y sintéticos (**Figura 7**), sin embargo, estos muestran una afinidad relativamente baja o activan de forma cruzada otros canales TRP. Por tanto, su aplicación terapéutica es limitada, de ahí la necesidad de nuevos y mejores agonistas de TRPM8 (Sherkheli et al., 2008).

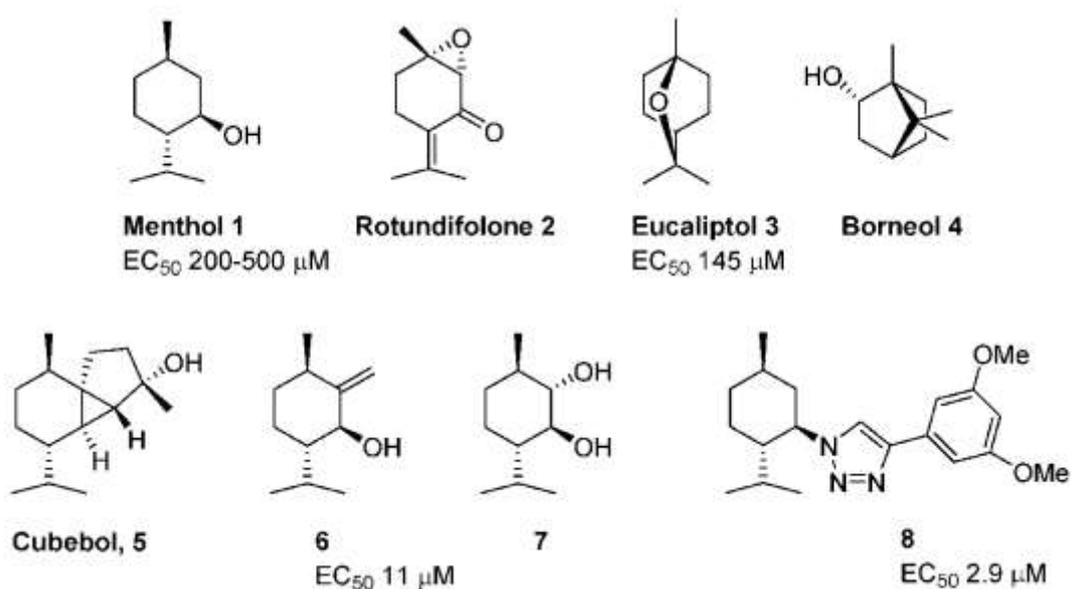


Figura 7. Agonistas de TRPM8 y derivados de mentol. Adaptado de (González-Muñiz et al., 2019)

Por ejemplo, la rotundifolona (**2, Figura 7**), monoterpeneo natural presente en especies del género *Mentha*, que posee una interesante actividad antinociceptiva, con una actividad demostrada más selectiva que el mentol. El eucaliptol (**3, Figura 7**), otro agonista interesante, posee efectos antiinflamatorios y analgésicos. Otro derivado de terpeno, Borneol (**4, Figura 7**), activa los canales TRPM8 independientemente de la temperatura.

Se han desarrollado derivados mentol, con el objetivo de mejorar o encontrar nuevos agonistas de TRPM8, por ejemplo, el grupo de González-Muñiz y colaboradores han diseñado derivados mentolados a base de tiazol como potentes agonistas, concretamente el compuesto 4-(3,5-dimetoxifenil)-1-((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexil)-1H-1,2,3-triazol (**8, Figura 7**) mostró una alta especificidad en la activación de estos canales (González-Muñiz et al., 2019).

En cuanto a los antagonistas, en la última década se han informado de numerosos antagonistas como posibles fármacos para el dolor neuropático, la inflamación, la migraña y el cáncer. Sin embargo, la mayoría carecen de selectividad por TRPM8 (González-Muñiz et al., 2019). Los quimiotipos más importantes abarcan diferentes sistemas heterocíclicos, como el tiazol y la β -lactama, y estructuras bicíclicas, como el benzotiofeno, el bencimidazol y la isoquinolina, entre otros. También se han descritos sistemas acíclicos (amida, sulfonamida, urea, glicina, triptófano) junto a anillos aromáticos y heterociclos. Existen antagonistas, como el AMG-333 y el PF-05105679 (**Figura 8**) que llegaron a ensayos clínicos de fase I para el tratamiento del dolor inducido por el frío y la migraña, pero ambos provocaban efectos secundarios. Por tanto, aun se necesitan antagonistas con propiedades mejoradas (Bonache et al., 2020).

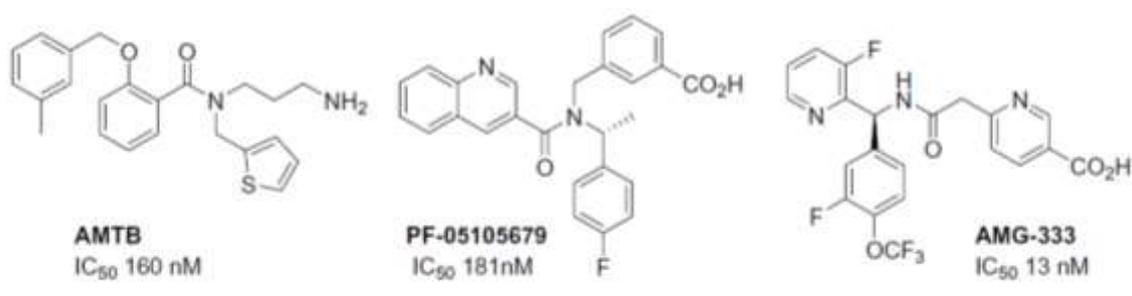


Figura 8. Antagonistas de TRPM8. Adaptado de (Bonache et al., 2020)

Caben destacar, el BCTC, un derivado de la carboxamida de la piperazina, demostró inhibir el crecimiento de las células tumorales de próstata, mientras que el AMTB, bloqueador basado en la benzamida, demostró eficacia terapéutica en modelos animales de síndrome de vejiga hiperactiva y dolorosa. El grupo de Bertamino y colaboradores ha sintetizado derivados de L-triptófano-OMe que producían una inhibición potente, selectiva y completa de TRPM8 (Bertamino et al., 2018). Cabe destacar el compuesto (5R,11aS)-5-(4-clorofenil)-2-(4-fluorobenzil)-5,6,11,11a-tetrahidro-1H-imidazo[1',5':1,6]pirido[3,4-b]indol-1,3(2H)-diona que demostró que suprime la

hipersensibilidad al frío mediada por TRPM8 y además muestra una respuesta antinociceptiva aguda 15 minutos después de su aplicación en un modelo de alodinia al frío (Bertamino et al., 2020).

Debido a la gran implicación de este canal en la fisiología humana, cualquier fallo deriva en diferentes patologías, por tanto, hoy en día la búsqueda de moduladores selectivos de estos canales está en auge, con el objetivo de reducir los efectos secundarios de los fármacos actuales y/o mejora de los mismo. Por tanto, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster es la caracterización de moduladores TRPM8 que puedan tener futuras aplicaciones en el tratamiento de enfermedades. Y como objetivos específicos:

- Realizar un cribado de los compuestos mediante técnicas fluorescentes.
- Determinar propiedades farmacológicas mediante la caracterización de potencia y citotoxicidad de los compuestos.
- Establecer la especificidad en modelos celulares de TRPV1.
- Comprobar la actividad de los compuestos seleccionados mediante técnicas de electrofisiología.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar el potencial terapéutico de los diferentes compuestos, se realizaron ensayos fluorimétricos en la línea celular HEK-CR1 y HEK-VR1, para determinar así la potencia (IC50), eficacia y selectividad de estos. Además, con el fin de evaluar su citotoxicidad se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular.

3.1. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos líneas celulares: HEK-CR1 y HEK-VR1. Ambas células embrionarias de riñón humano que expresan de forma estable los canales iónicos TRPM8 de rata y TRPV1 de ratón respectivamente.

Para el mantenimiento de cada línea se requiere un medio específico con diferentes enriquecimientos, como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Medio celular de mantenimiento de las líneas celulares.

LÍNEA CELULAR	MEDIO BASE	ENRIQUECIMIENTO (%)			
		Penicilina-streptomocina	Geneticina	FBS (Fetal Bovine Serum)	NEM AA (No essentials Amino Acids)
HEK-CR1	DMEM Glutamax	1	0,9	10	-
HEK-VR1	DMEM Glutamax F12	1	0,9	10	1

Ambas líneas celulares requieren un cambio de medio cada 48-72 horas y se mantienen en el incubador a 37 °C, 5% CO₂ y 95% aire humidificado. Una vez alcanzada una confluencia en el flask entre 80-90%, se procede a trispsinizar para continuar su cultivo, todo realizado en campana bajo condiciones de esterilidad:

1. Se retira el medio del flask con una pipeta.
2. Añadir 1 ml de Trisptina-EDTA 0,25% y dejar actuar unos minutos, aplicando pequeños golpes en los laterales del flask para que se vayan despegando las células.

3. Una vez las células estén despegadas, se inactiva la tripsina, añadiendo 5 ml del medio de mantenimiento y se disgregan resuspendiendo varias veces, intentado arrastrar las posibles células que queden pegadas en las paredes.
4. Trasvasar el volumen deseado a otro flask, añadir medio de mantenimiento hasta 6 mL y llevar a incubar. Tras 48-72 horas renovar el medio de mantenimiento, hasta llegar a una confluencia del 80-90%.

En caso de sembrar una placa, se trasvasa el volumen restante de células a un falcon de 15 ml y se siembran en placas de 96 pocillos de fondo oscuro o transparente para realizar los diferentes experimentos, para ello se debe tratar previamente la placa con Poly-L-Lysine:

1. Prepara una dilución 100 μ L Poly-L-Lysine en 10 ml de PBS 1X, se añaden 100 μ L a cada pocillo y se deja actuar en el incubador durante 30 minutos.
2. Se retira la dilución y se lava cada pocillo dos veces con PBS 1X.
3. Dejar la placa abierta en la cabina con el ultravioleta durante 20 minutos aproximadamente o hasta que seque completamente.
4. Se resuspenden las células del falcon y enseguida se ponen 10 μ L en la cámara de Neubauer y se cuentan el número de células contenidas en cuatro cuadrantes de 0.1 mm³. El promedio se multiplica por 10⁴ para obtener la concentración de células/ml.
5. Calcular el volumen de mezcla de células resuspendidas y medio celular que se requiere para obtener la concentración de células por pocillo (30.000 células/ml para HEK-CR1 y 35.000 células/ml para HEK-VR1). Se mezcla la dilución con ayuda de una pipeta para asegurar la disgregación.
6. Añaden 100 μ L de mezcla en cada pocillo.
7. Incubar la placa bajo las mismas condiciones durante 3-4 días.

3.2. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS.

En este trabajo se han utilizado un total de 8 compuestos procedentes del laboratorio del Dr. Santi Vázquez que trabaja en el Laboratorio de Química Farmacéutica e Instituto de Biomedicina (IBUB). Estos compuestos han sido seleccionados tras realizar un análisis *in silico* para comprobar que se unen al TRPM8, bloqueando al canal. Se tratan de amidas

de tipo biarilo, que mantienen la estructura del mentol, y se les ha añadido distintas combinaciones de fenilo sustituido(R)-fenilo sin sustituir (**Figura 9**).

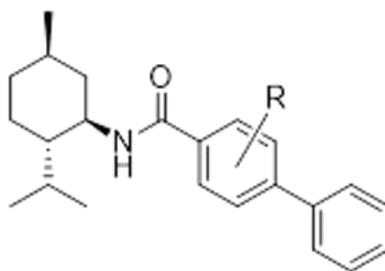


Figura 9. Esqueleto base de los compuestos utilizados.

Cada compuesto se encuentra suspendido en dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración de 50 mM, a partir de la cual, se prepararon las diferentes concentraciones de forma seriada de cada compuesto, utilizando como diluyente DMSO. Teniendo en cuenta que el volumen final en pocillo ha de ser 1 μL , lo que sería equivalente a una concentración del 1% de DMSO, que es la máxima concentración permitida en los cultivos celulares sin resultar tóxico.

Para cada compuesto se utilizaron 3 concentraciones iniciales (50-5-0,5 μM para HEK-CR1 y HEK-VR1) y dependiendo de los resultados, se escogieron otras concentraciones con el objetivo de obtener la curva dosis-respuesta de cada compuesto.

3.3. ENSAYOS FLUORIMÉTRICOS

El calcio intracelular es considerado el segundo mensajero universal, controlando tanto los procesos fisiológicos como patológicos. Se han desarrollado diferentes sondas fluorescentes específicas de Ca^{2+} para monitorizar la actividad de los canales TRP, ya que la unión de la sonda al calcio intracelular altera su emisión de fluorescencia. Para ello, primeramente, la sonda debe acceder al interior de la célula y posteriormente ante la presencia de un agonista, el canal es activado y el calcio extracelular pasa al interior de la célula, interaccionando con la sonda y produciendo un aumento de la intensidad de fluorescencia. Si, por el contrario, se añade un antagonista, el canal se mantiene cerrado, por tanto, no se produce la entrada de calcio a la células y no existe un cambio en la intensidad de fluorescencia (**Figura 10**) (Cordero-Sánchez et al., 2019). En este trabajo la sonda utilizada fue la Fluo4-NW.

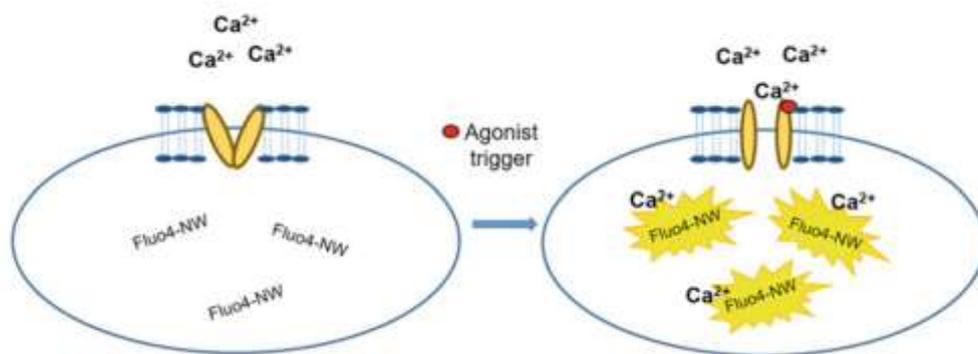


Figura 10. Diagrama de flujo de calcio por activación de canales permeables a calcio en presencia de un agonista. La sonda Fluo4-NW es la más utilizada para monitorizar el aumento de calcio intracelular (Cordero-Sánchez et al., 2019).

Conociendo los patrones típicos de agonistas (mentol para TRPM8 y capsaicina para TRPV1) y antagonistas (AMTB para TRPM8 y rojo de rutenio para TRPV1), registrando la intensidad de fluorescencia en un lector de placas, se puede deducir la naturaleza activadora o inhibidora de ciertos compuestos (**Figura 11**). Así mismo, en cada experimento se llevó a cabo un control positivo y uno negativo, además de un control del vehículo en el que se diluirán los compuestos, para descartar un posible efecto sobre las células.

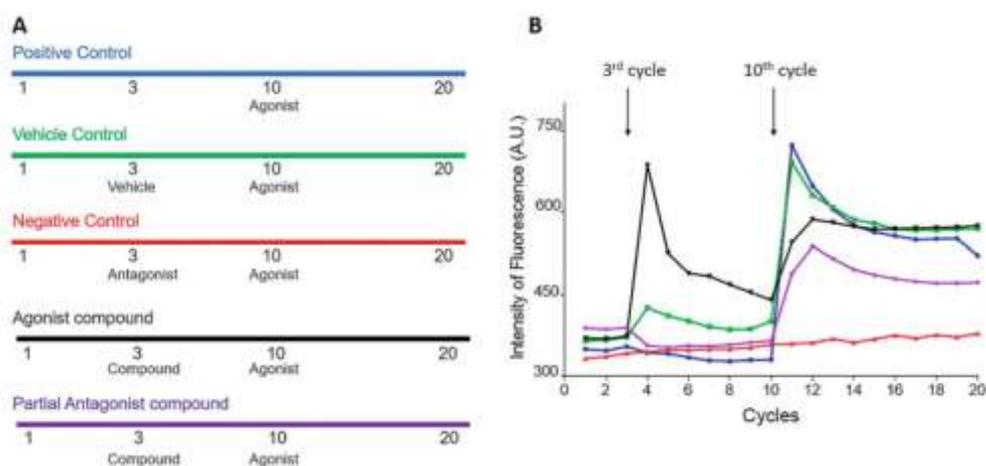


Figura 11. Diseño de un ensayo de fluorescencia para el cribado de moduladores de canales termoTRP. A. Diferentes tipos de compuestos a añadir en los ciclos 3 y 10 de la lectura. B. Ejemplo de patrones de intensidad de fluorescencia para los diferentes compuestos, dependiendo de su naturaleza agonista o antagonista (Cordero-Sánchez et al., 2019).

3.3.1. Procedimiento experimental

Una vez sembrada una placa, en este caso de 96 pocillos de fondo oscuro, tal y como se ha explicado en el apartado anterior, el día del experimento, se comprueba el crecimiento

celular en los pocillos, de tal manera que sea homogéneo y se haya alcanzado un 100% de confluencia. Seguidamente se prepara la sonda Fluo 4-NW del kit correspondiente, para ello se atemperan los todos componentes del kit y se procede a reconstruir la sonda liofilizada, añadiendo 10 mL del buffer y 100 µL de probenecid, un detergente de baja toxicidad utilizado para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares y así facilitar la entrada de la sonda en las células, en el recipiente opaco donde se encuentra el liofilizado, todo en campana y en oscuridad.

Se procede a realizar el ensayo:

1. Se elimina el medio celular de cada pocillo y se añaden 100 µL/pocillo de la sonda reconstruida previamente.
2. Se incuba durante 30 minutos bajo condiciones de mantenimiento y otros 30 minutos dentro del lector de placas a 30°C, para que las células se atemperen.
3. Iniciar la lectura utilizando el protocolo programado, que consta de 20 ciclos de lectura a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 520 nm de emisión.
4. Los tres primeros ciclos se realiza una lectura de fluorescencia basal, al tercer ciclo se para y se extrae la placa del lector.
5. Se añaden de forma manual las diferentes concentraciones de cada compuesto a probar, el vehículo (1% DMSO) y los controles negativos (AMTB 10 µM en pocillo para TRPM8 y Rojo de rutenio 1 µM para TRPV1)
6. Introducir la placa de nuevo en el lector, para continuar con la lectura. Si se están probando antagonistas, esperar 5 minutos antes de retomar la lectura. Si por el contrario son agonistas, retomar la lectura inmediatamente.

De forma automática en el ciclo 10 se inyecta el agonista (mentol 100 µM en pocillo para TRPM8 y capsaicina 10 µM en pocillo para TRPV1) en toda la placa.

3.3.2. Análisis de datos

Para el análisis inicial de los datos se utiliza una plantilla en Excel. La fiabilidad y reproducibilidad del ensayo se evalúa midiendo el factor Z estadístico, que viene definido por la ecuación [1] (Cordero-Sánchez et al., 2019):

$$Z = 1 - \frac{3 \times (SD_{\max} + SD_{\min})}{M_{\max} - M_{\min}} \quad [1]$$

Donde $Mean_{max}$ representa los valores medios de la intensidad de fluorescencia de los controles positivos y $Mean_{min}$ de los negativos. SD es la desviación estándar de los controles positivos (max) y negativos (min). El valor máximo de Z es 1 y se considera un ensayo válido cuando $Z \geq 0,5$.

Si los compuestos a estudiar son agonistas el grado de activación es calculado mediante la ecuación [2] (Cordero-Sánchez et al., 2019):

$$Activación (\%) = \left(\frac{F_{compuesto}}{F_{control}} \right) \times 100 \quad [2]$$

Donde $F_{compuesto}$ es la diferencia de intensidad de fluorescencia antes y después de añadir el compuesto y $F_{control}$ es la diferencia de intensidad de fluorescencia antes y después de la estimulación con el agonista, es decir, antes y después del ciclo 10.

Por el contrario, si los compuestos a estudiar se comportan como antagonistas, el grado de inhibición se calcula mediante la siguiente ecuación [3] (Cordero-Sánchez et al., 2019):

$$Inhibición (\%) = 1 - \left(\frac{F_{compuesto}}{F_{control}} \right) \times 100 \quad [3]$$

Donde en este caso, $F_{compuesto}$ es la diferencia de intensidad de fluorescencia antes y después de añadir el agonista en presencia del compuesto antagonista a probar.

Todos los valores, tanto de actividad como de inhibición de los compuestos probados se normalizaron respecto a los valores del agonista o antagonista conocido, tratándolo como 100% activador o 100% bloqueador.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIA

Con los resultados obtenidos mediante los ensayos fluorimétricos se generaron curvas dosis-respuesta de cada compuesto con Graphpad Prism 7.04, representando el logaritmo de las concentraciones frente el porcentaje de respuesta. Además, mediante estas representaciones, se determina la concentración inhibidora media máxima de cada compuesto (IC_{50}) utilizando un ajuste de la ecuación de Hill [4] (Di Sarno et al., 2022):

$$Y = Botton + \frac{(Top-Botton)}{(1+10^{(X-Log IC_{50})})} \quad [4]$$

3.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a un compuesto de color violeta (formazán), permitiendo medir la supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán (Mosmann, 1983). Por tanto, se utiliza para caracterizar la citotoxicidad de los compuestos a estudiar.

3.5.1. Procedimiento experimental

1. Sembrar una placa transparente de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo, de la línea celular HEK-CR1.
2. Se incuban en condiciones de mantenimiento durante 24h para permitir su adherencia
3. Se preparan los compuestos a ensayar en DMSO y se añaden 1 μL a cada pocillo de las concentraciones preparadas. Para control de crecimiento celular: se toman pocillos sin ningún tipo de tratamiento y pocillos con el vehículo (DMSO 1%). Para el control de mortalidad: se elimina el medio y se añaden 100 μL de tampón de ensayo enriquecido con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% y TRITON al 1%.
4. Se vuelven a incubar durante 24h para permitir que la sustancias actúen en todas las células.
5. Se añaden 5 μL de MTT en solución a cada pocillo en oscuridad.
6. Se incuba durante 4 horas en condiciones de mantenimiento para permitir la formación de los cristales de formazán.
7. Sin condiciones de esterilidad ni oscuridad, se elimina el sobrenadante con cuidado de no llevarse los cristales y se añade 150 μL de DMSO a cada pocillo.
8. Se deposita la placa en un orbital a 200 rpm durante 10 minutos para que se disuelvan los cristales a temperatura ambiente.
9. Se lleva a un lector de placas y se mide la densidad óptica (DO), mediante un protocolo diseñado, a cada pocillo a una longitud de onda de 570 nm con el filtro de referencia a 620 nm

3.5.2. Análisis de datos

El tratamiento de los datos obtenidos de la lectura se realiza en Excel y se calcula el porcentaje de viabilidad celular mediante la ecuación [5]:

$$\% Viabilidad celular = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control positivo}} \times 100 \quad [5]$$

Para determinar si existen diferencias significativas de viabilidad entre el control 100% crecimiento y los pocillos con los compuestos, se realiza un ANOVA, empleando el análisis de comparación múltiple de Dunnett.

3.6. ENSAYOS ELECTROFISIOLÓGICOS MEDIANTE PATCH-CLAMP

Para confirmar la actividad antagonista de los compuestos se llevan a cabo experimentos patch-clamp empleando la configuración *whole-cell voltage-clamp*, en la línea celular HEK-CR1, tras 24-48 horas de la siembra en placas de 24 pocillos con cristales de 12 mm a una concentración de 20.000 células/pocillo. En esta configuración se registra las corrientes de todos los canales de la célula, a un voltaje constante de -60 mV, de tal manera que tras la aplicación de diferentes estímulos se observa cambios en la corriente total.

La solución intracelular de la pipeta empleada contenía (mM) 150 NaCl, 5 EGTA, 3 MgCl₂ y 10 HEPES, ajustada a pH 7,2 con NaOH. Por otro lado, la solución extracelular contenía (mM) 150 NaCl, 6 CsCl, 1 MgCl₂, 10 D-glucosa y 10 HEPES, ajustada a pH 7,4 con NaOH. La actividad del TRPM8 se midió mediante la aplicación de dos pulsos de 100 uM de mentol en un intervalo de tiempo de 90 segundos. El compuesto a estudiar se aplicó a diferentes concentraciones durante 30 segundos antes del segundo pulso (Di Sarno et al., 2022).

3.6.1. Procedimiento experimental

El primer paso consiste en formar un sello de alta resistencia entre la membrana celular y la micropipeta de vidrio con un electrodo, la cual está llena de la solución intracelular. Esta se acerca a la superficie celular y se aplica una presión negativa mediante una ligera succión, provocando así que se invagine la membrana formando un sello de alta resistencia. Nuevamente se aplica una pequeña succión para romper la porción de membrana invaginada con el objetivo de que entre en contacto la solución intracelular

con el citoplasma (**Figura 12**). Por último, se fija el potencial de membrana a -60 mV y se registra la corriente de todos los canales activables. Para las curvas J/V, se aplicó un protocolo de rampa de -120 mV a 120 mV en 300 milisegundos. Se midió la capacitancia de las células para obtener la densidad de corriente (J, pA/pF).

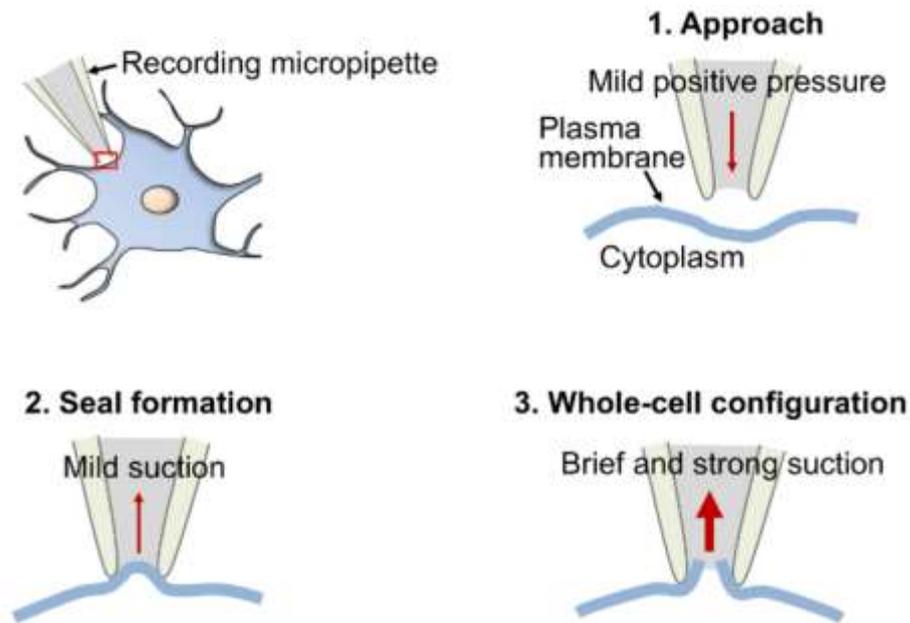


Figura 12. Diagrama de los pasos básicos para obtener la configuración whole-cell en Patch-clamp (Segev et al., 2016).

3.6.2. Análisis de datos

Todos los datos obtenidos se observaron en el software PatchMaster 2.53. La respuesta de TRPM8 se cuantificó como la relación $p2/p1$ ($p2$: segundo pulso de mentol en presencia del compuesto a probar, $p1$: primer pulso de mentol solo), permitiendo así cuantificar la desensibilización del canal y mediante el programa GraphPad 7.04 se analizaron los datos obtenidos con el fin de obtener el porcentaje de inhibición de los compuestos seleccionados. Por otro lado, mediante una plantilla de Excel se analizaron los datos de densidad de corriente a diferentes voltajes para obtener las curvas J/V.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CRIBADO DE COMPUESTOS MODULADORES DE TRPM8

Se probó una colección de 8 compuestos a tres concentraciones iniciales 50, 5 y 0,5 Mm para evaluar su efecto sobre el canal TRPM8 como se indica en el apartado 3.3. de Materiales y Métodos. Todos los compuestos presentaron un comportamiento antagonista sobre TRPM8 en presencia de mentol, comparando este comportamiento antagonista con la acción del antagonista conocido AMTB (**Figura 13**).

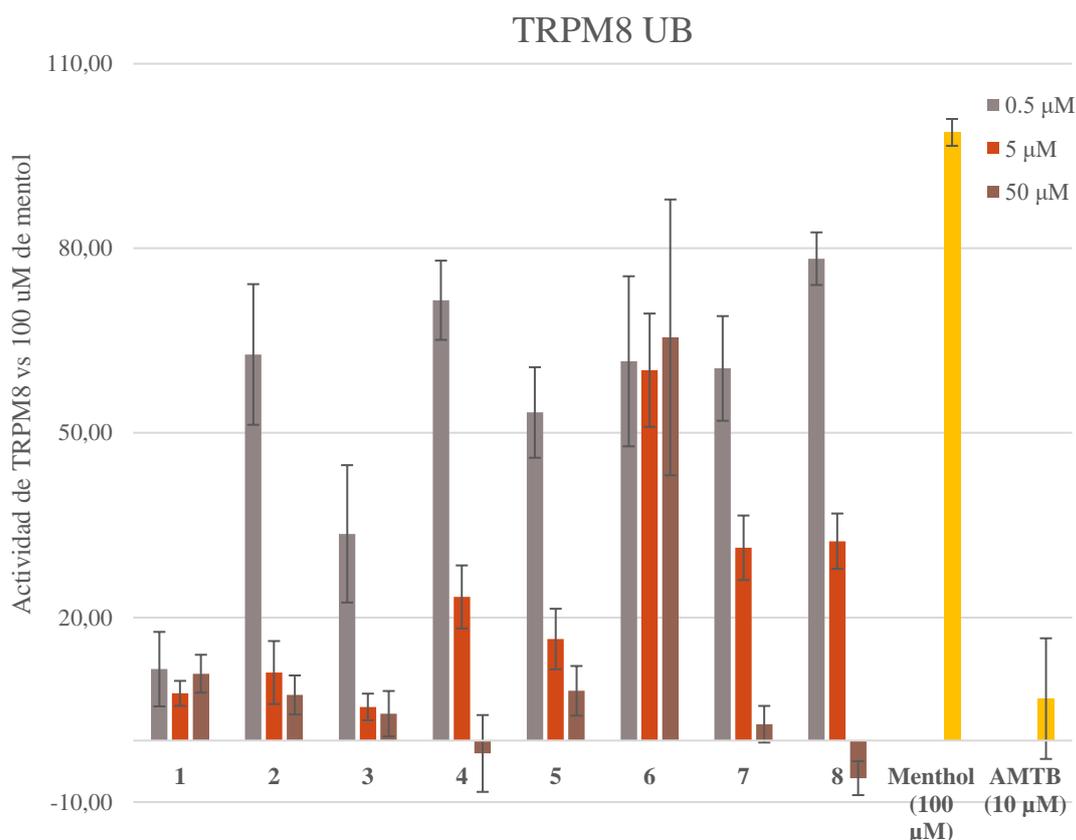


Figura 13. Cribado de los compuestos moduladores de TRPM8. Representación de los resultados obtenidos para los 8 compuestos a tres concentraciones: 50, 5 y 0,5 μM . En amarillo se representan tanto el control positivo (mentol 100 μM) como negativo (AMTB 10 μM). $n=3$, $N=2-4$, $Z > 0,5$.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de cribado permitieron la caracterización y determinación del potencial farmacológico de los compuestos estudiados, mostrando una actividad significativa como bloqueadores del canal TRPM8 con las concentraciones testadas frente a 100 μM de mentol (**Figura 13**). Estos ensayos mostraron unas desviaciones aceptables, con un valor de Z superiores a 0,5. El compuesto que mayor % de bloqueo en las tres concentraciones testadas presentó, es el compuesto 1, por el contrario, el que menos % de bloqueo presentó en las tres concentraciones, es el

compuesto 6. Se aprecia una modulación del canal inversamente proporcional a la concentración del compuesto utilizada, es decir, que a mayor concentración menor actividad del canal, y, por tanto, mayor bloqueo, salvo en el compuesto 6 donde esta correlación no se puede aplicar. Cabe destacar que el compuesto que más bloqueo presenta a la mayor concentración (50 μM) es el compuesto 8.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA POTENCIA DE LOS COMPUESTOS

Junto con los resultados del cribado a tres concentraciones, se midieron concentraciones desde 0,0005 μM hasta 50 μM , para poder llevar a cabo el estudio de la potencia de cada compuesto. Dado que presentan una actividad antagonista se determinó la concentración inhibidora media máxima (IC_{50}) (**Tabla 2**) mediante las curvas dosis-respuesta realizadas en el programa GraphPad 7.04 con los resultados de los ensayos fluorimétricos en células HEK-CR1 como se indica en el apartado 3.4 de Materiales y métodos. (**Figura 14**).

Tabla 2. Determinación de la potencia de los compuestos. Valores IC_{50} de los compuestos \pm SD. Aquellos compuestos con un asterisco () son los compuestos con mayor potencia.*

Compuestos	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD } \mu\text{M}$	Compuestos	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD } \mu\text{M}$
1*	0,07 \pm 0,03	5*	1,98 \pm 0,39
2*	1,09 \pm 0,33	6	-
3*	0,19 \pm 0,23	7	4,60 \pm 0,39
4	3,01 \pm 0,44	8	2,23 \pm 0,22

A continuación, se representan las curvas dosis-respuestas generadas junto a su correspondiente IC_{50} de aquellos compuestos con mayor potencia

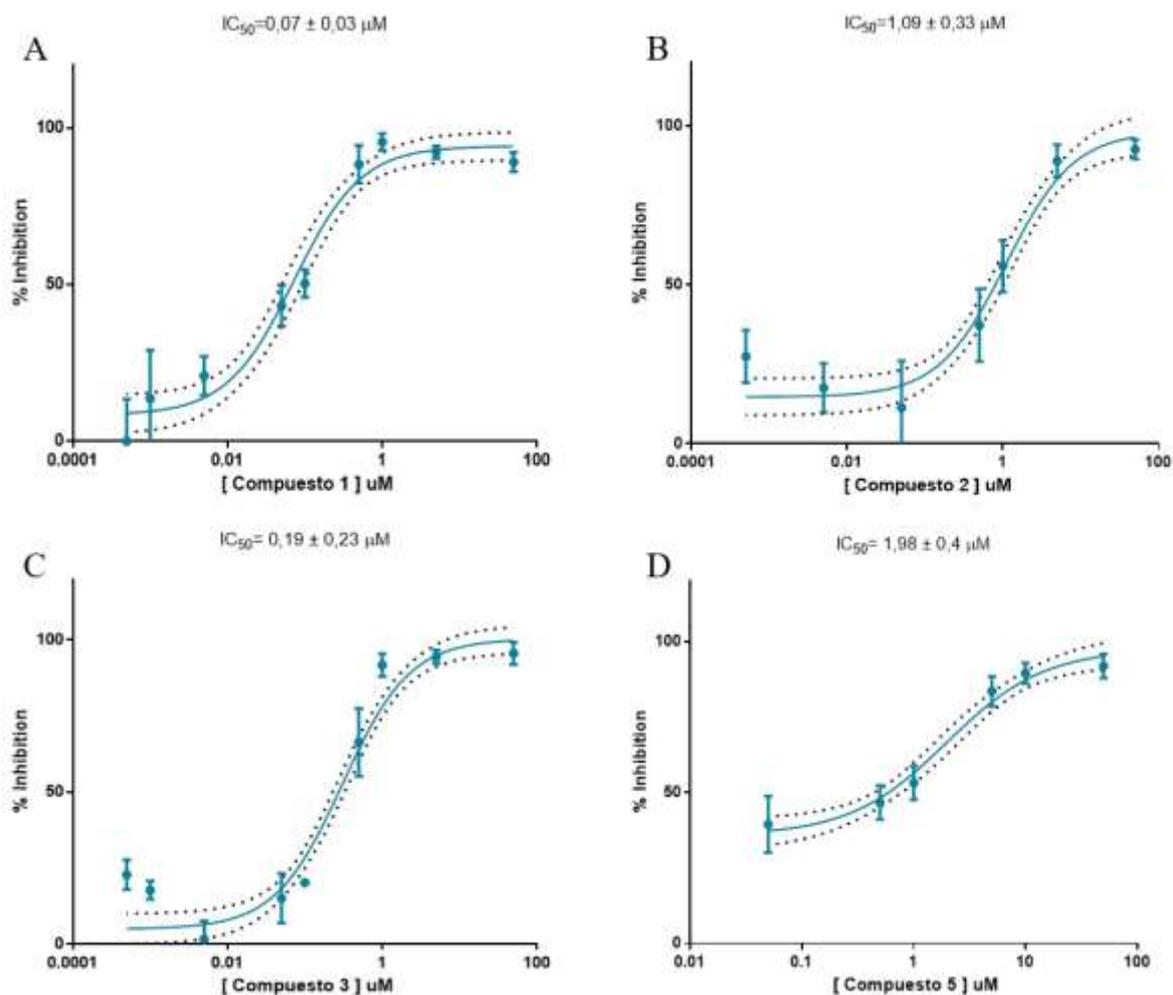


Figura 14. Curvas dosis-respuesta de los compuestos para determinar la potencia. Se muestran las curvas dosis-respuesta de los compuestos con mayor potencia, 1(A), 2(B), 3(C) y 5(D). se representan el porcentaje de inhibición del canal TRPM8 frente al logaritmo de la concentración del compuesto. Cada punto esta normalizado con respecto al control positivo (Mentol 100 μ M) en % de actividad media \pm SD; $n = 3$; $N \geq 2$, $Z > 0,5$. La línea continua representa la sigmoide ajustada por la ecuación de Hill, y la línea discontinua representa su intervalo de confianza al 95%.

Los valores de las IC_{50} (**Tabla 2**) muestran la potencia en el rango micromolar de todos los compuestos, siendo los más potentes los que menor IC_{50} presenten, es decir, los que generan la respuesta deseada a bajas concentraciones. El compuesto que menor IC_{50} presento fue el 1 (IC_{50} de $0,07 \pm 0,03$) mientras que el mayor fue el compuesto 7 (IC_{50} de $4,60 \pm 0,39$). Todos los compuestos muestran mayor potencia como inhibidores que el inhibidor conocido como AMTB que posee una IC_{50} de $6,5 \pm 1,4 \mu$ M (Bertamino et al., 2018).

4.3. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS COMPUESTOS

Al observarse un pequeño aumento de la fluorescencia en el ciclo 3, cuando se añadían los compuestos, la actividad antagonista se confirmó mediante ensayos fluorimétricos en presencia y ausencia del antagonista conocido AMTB en células HEK-CR1, para así comprobar que el aumento de la fluorescencia en los ensayos anteriores no se debía a una activación del canal. Se probaron todos los compuestos (1-8) a 5 μM y del 5-8 también a 10 μM (**Figura 15**).

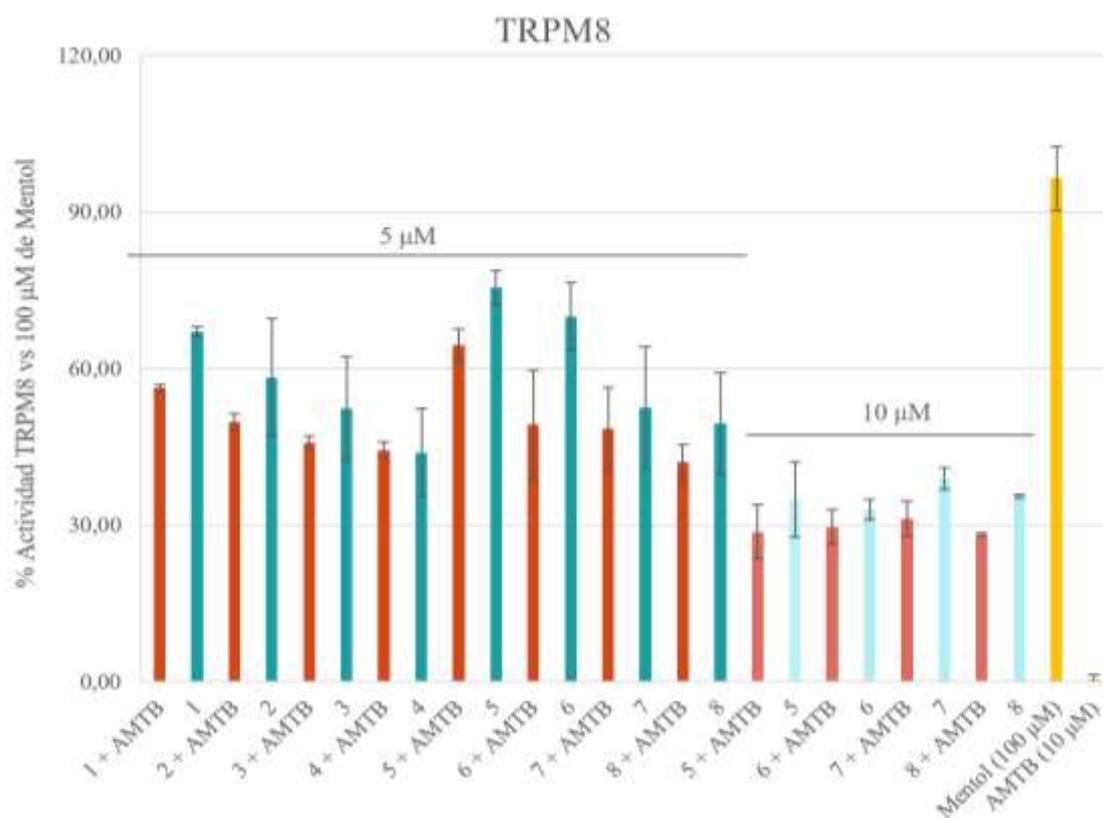


Figura 15. Confirmación de la actividad antagonista. Representación de los resultados de los ensayos fluorimétricos en presencia y no de AMTB para confirmar el comportamiento antagonista de los compuestos. En amarillo se representan tanto el control positivo (mentol 100 μM) como negativo (AMTB 10 μM). $n=3$, $N=1$.

Se puede observar que en presencia de AMTB existe mayor bloqueo del canal para todos los compuestos, aun así, no es mucha la diferencia entre la presencia y ausencia del antagonista. Por tanto, se podría confirmar su actividad como antagonistas, sin embargo, este ensayo no es lo suficientemente preciso para corroborar la actividad de estos compuestos como antagonistas y su potencia, ya que estos métodos presentan una frecuencia de falsos positivos alta.

Por tanto, es necesario utilizar métodos más precisos para poder confirmar con seguridad la actividad de estos compuestos. Se escogió el compuesto con mayor potencia, el compuesto 1, para llevar a cabo ensayos funcionales mediante electrofisiología basados en la técnica de patch-clamp en configuración *whole-cell voltage-clamp* como se indica en el apartado 3.6 de Materiales y métodos y así poder confirmar su actividad y potencia como antagonista de TRPM8.

Se probaron dos concentraciones elegidas a partir de la IC_{50} calculada anteriormente y el porcentaje de bloqueo del canal TRPM8 se calculó a partir de la relación $p2/p1$ (**Figura 16**).

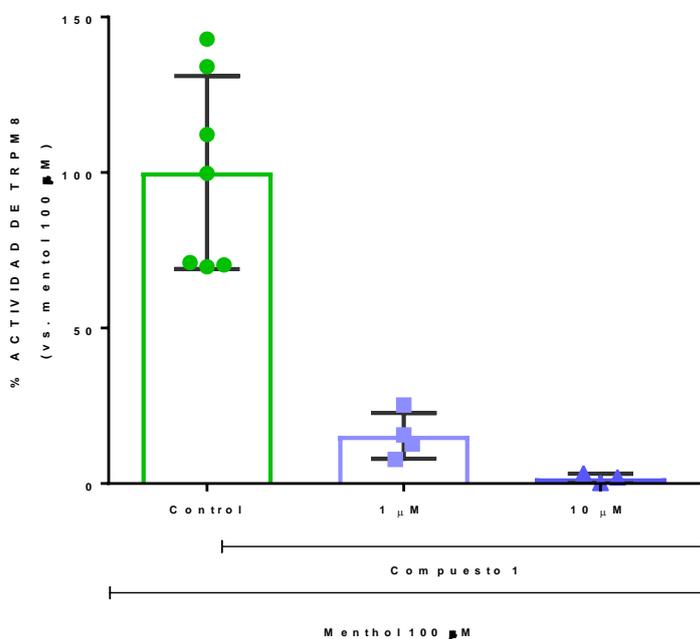


Figura 16. Porcentaje de actividad del canal TRPM8. Representación de los resultados obtenidos en patch-clamp tras la aplicación de dos concentraciones diferentes del compuesto 1 en presencia de mentol.

En la **Figura 17**, se observan las curvas J/V del TRPM8 en presencia y ausencia del compuesto 1 a dos concentraciones.

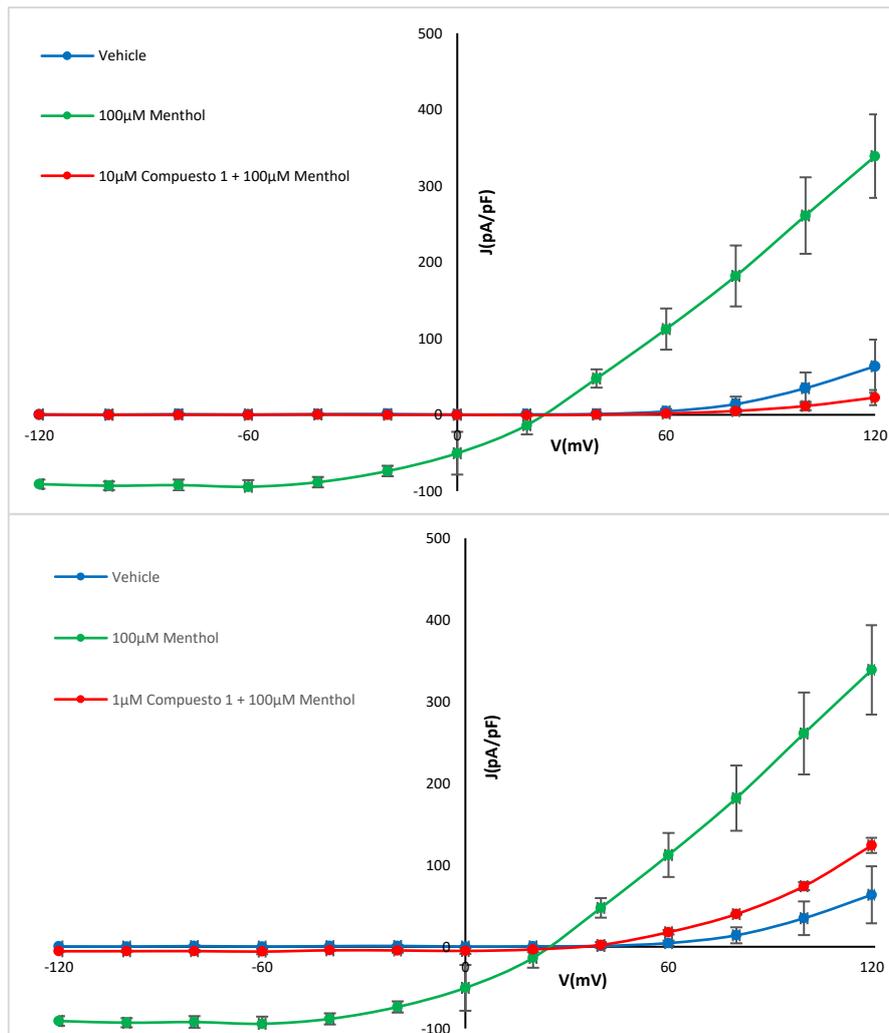


Figura 157. Actividad del canal TRPM8 en presencia o ausencia del compuesto 1 a dos concentraciones. Las células HEK-CR1 se exponen a una solución con mentol a 100 μM (verde), al compuesto tanto a 1 como a 10 μM + mentol (rojo) y al vehículo (azul).

Tras observar los resultados, se confirma que el compuesto 1 es un potente bloqueador del canal TRPM8 ya que como se aprecia en la **Figura 16**, a 1 μM del compuesto 1 el canal es bloqueado aproximadamente un 84% y a 10 μM aproximadamente un 98%, es decir, que es capaz de reducir la actividad del canal hasta un 1,67%, prácticamente un bloqueo total. Esta disminución de la actividad del canal también se observa en las curvas J/V (**Figura 17**), donde se aprecia la curva típica de activación del canal por mentol en verde y como esta disminuye notablemente al añadir las diferentes concentraciones del compuesto junto al mentol, por tanto, hay claramente una acción inhibitoria del compuesto 1 sobre los canales TRPM8 confirmándose su actividad y potencia como antagonista.

4.4. ESPECIFICIDAD DE LOS COMPUESTOS

Para la determinación de la actividad de los compuestos en el canal TRPV1, se llevaron a cabo ensayos fluorimétricos en modelos celulares HEK-VR1 de la librería de los 8 compuestos a tres concentraciones 50, 5 y 0,5 μM , presentando comportamientos tanto agonistas como antagonistas del canal TRPV1. Se representa el porcentaje de modulación del canal en presencia de capsaicina (Cap), comparándose con el antagonista conocido de los canales TRPV1, rojo de rutenio (RR) (**Figura 18**).

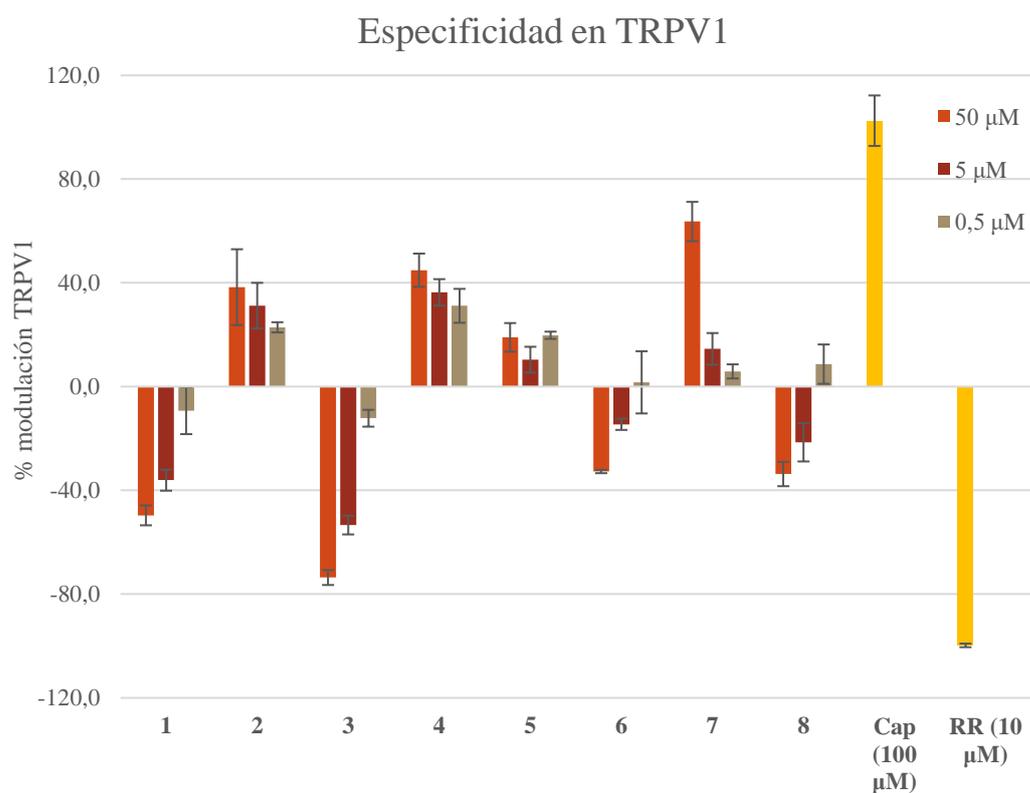


Figura 168. Especificidad de los compuestos en TRPV1. Representación de los resultados de los ensayos fluorimétricos en células HEK-VR1 de los 8 compuestos a tres concentraciones: 50, 5 y 0,5 μM . En amarillo se representa el % de activación del agonista (Capsaicina 100 μM) y el % de bloqueo del antagonista (rojo de rutenio 10 μM). $n=3$, $N=1$, $Z > 0,5$.

La especificidad de los compuestos a una diana concreta, en este caso TRPV1, es importante para la actividad farmacológica de estos. Para ello se comprobó la acción de estos compuestos sobre los canales TRPV1, según los resultados obtenidos, con una $Z > 0,5$ y una desviación estándar aceptable (**Figura 18**), los compuestos modulan al canal TRPV1 tanto de forma agonista como antagonistas. Concretamente los compuestos 1, 3, 6 y 8 presentan una actividad antagonista, siendo el compuesto 3 el que mayor porcentaje de bloqueo presenta. Por otro lado, los compuestos 2, 4 y 7, muestran una actividad

agonista sobre los canales TRPV1, provocando mayor porcentaje de activación el compuesto 7 en su mayor concentración. Por tanto, no se puede decir que estos compuestos sean específicos para TRPM8, sin embargo, esto también puede tener interés farmacológico, ya que, por ejemplo, existen antagonistas duales contra TRPM8 y TRPV1, para contrarrestar los efectos adversos de la activación de uno de los canales, es decir, que puedan producir hipotermia impulsada por TRPM8, contrarrestando potencialmente la hipertemia mediada por TRPV1 y viceversa (DeFalco et al., 2011).

Mediante las curvas dosis-respuestas generadas en GraphPad 7.04, se calcularon tanto la IC₅₀ para los antagonistas como la EC₅₀ para los agonistas, con el objetivo de poder estudiar la potencia de los compuestos sobre el canal TRPV1 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Determinación de la potencia de los compuestos en TRPV1. Valores IC₅₀ y EC₅₀ de los compuestos ±SD.

Compuestos	IC₅₀ ± SD μM	Compuestos	EC₅₀ ± SD μM
1	2,14 ± 1,34	2	4,12 ± 1,23
3	2,05 ± 0,17	4	9,28 ± 3,58
6	7,63 ± 1,74	7	63,09 ± 1,34
8	4,74 ± 1,95		

Todos los compuestos moduladores de TRPV1 muestran una potencia en el rango micromolar. En cuanto a los antagonistas, los compuestos más potentes son el 3 seguido del compuesto 1, siendo estos mismos compuestos además los bloqueadores más potentes para TRPM8. Por otro lado, el compuesto agonista con mayor potencia es el compuesto 2 ya que es el que menor EC₅₀ posee de todos, aunque es poco potente comparado con el agonista conocido Capsaicina que posee una EC₅₀ = 0,1 μM (Abbas, 2020). Para realmente confirmar el tipo de modulación que están ejerciendo estos compuestos sobre TRPV1, sería interesante realizar ensayos en presencia y ausencia de rojo de rutenio tanto de los antagonistas como de los agonistas.

4.5. VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

Por último, en los ensayos de viabilidad, se evaluó la posible acción tóxica de todos los compuestos 1- 8 en la línea celular HEK-CR1, mediante el ensayo del MTT, como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y métodos, a tres concentraciones 100, 10 y 1 μM , seleccionadas a partir de las IC_{50} calculadas (**Figura 19**).

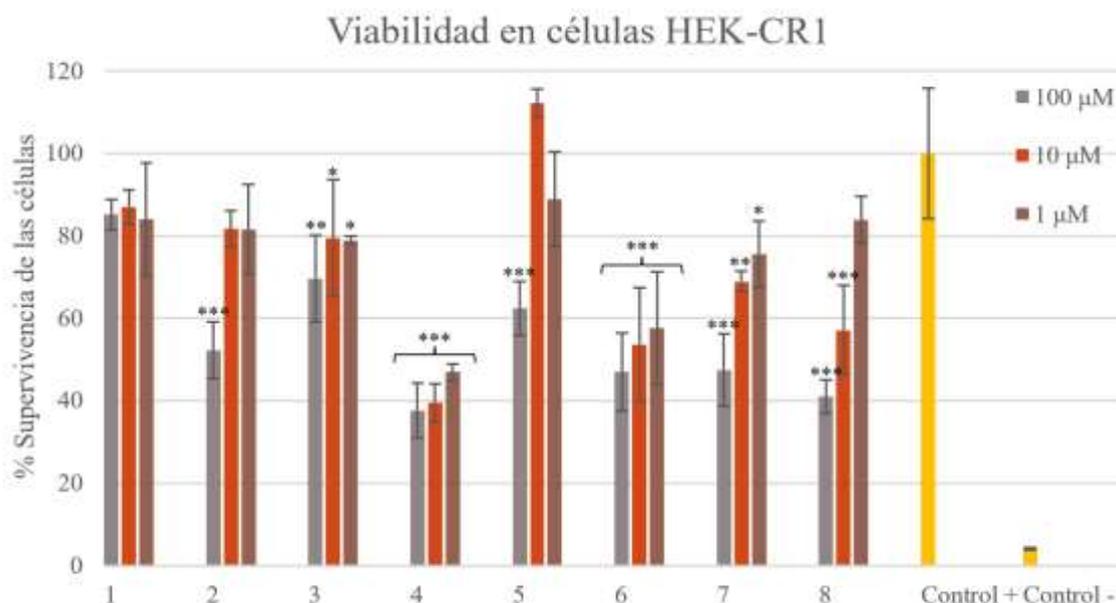


Figura 17. Viabilidad en % de las células en presencia de los compuestos. Se probaron 3 concentraciones 100, 10 y 1 μM de cada compuesto. En amarillo se representan el control + (DMSO) y el control - (TRITON+ SDS). Se muestra una media de los valores obtenidos para cada concentración \pm SD. Los datos significativamente estadísticos están marcados con *** si p-value es $< 0,0001$, con ** si p-value es $< 0,01$ y con * si p-value es $< 0,1$. $n=3$, $N=1-3$.

El análisis estadístico realizado permitió determinar las diferencias significativas de la toxicidad de cada compuesto en función de la acción generada por el vehículo utilizado, el DMSO.

Los resultados muestran que el compuesto 1 es el único no tóxico, ya que no presenta diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el control positivo en todas las concentraciones testadas, por tanto, sería el compuesto más indicado para seguir posibles ensayos futuros. Los compuestos 2 y 5 solo muestran mortalidad en la mayor concentración (100 μM). El resto de los compuestos presentan diferencias significativas en la viabilidad celular en dos o las tres concentraciones probadas. Concretamente, el

compuesto que menor supervivencia genera y por tanto, el más tóxico, es el 4, ya que no supera el 50% de supervivencia en ninguna de las tres concentraciones testadas.

El compuesto más potente según las curvas dosis-respuesta, resulta ser el menos tóxico de todos para las células, aspecto de gran relevancia para la elección del compuesto con mejor perfil farmacológico, ya que para determinar el potencial terapéutico se tiene en cuenta su potencia, selectividad y citotoxicidad. Por tanto, contrastando los valores de IC50, su actividad respecto al canal TRPV1 y los resultados del ensayo de viabilidad, sugieren que ningún compuesto podría considerarse como un potencial agente terapéutico. El compuesto 1, que es el compuesto con la IC50 más baja, es el único que no presenta toxicidad, pero también es el segundo compuesto más potente en bloquear la actividad del canal TRPV1, lo que demuestra su falta de especificidad. Por otro lado, los compuestos 2 y 5 los siguientes compuestos menos tóxicos, además en las concentraciones más cercanas a sus IC50, resultan activadores del canal TRPV1. Sin embargo, la modulación de los diferentes compuestos sobre los canales TRPV1 no está confirmada, por tanto, aún no se pueden descartar o elegir ningún compuesto como buenos candidatos para agentes terapéuticos.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En base a todo lo mencionado anteriormente se concluye que la implicación del canal TRPM8 en procesos fisiológicos y patológicos es un tema de estudio creciente, concretamente la búsqueda de moduladores del canal. Por tanto, de los resultados obtenidos en la búsqueda de nuevos moduladores del canal TRPM8 se sacan las siguientes conclusiones:

- Se identificaron 8 compuestos, amidas de tipo biarilo, como antagonistas del canal TRPM8, siendo el más potente el compuesto 1 con una IC_{50} de 7 ± 3 nM.
- Los 8 compuestos antagonistas para TRPM8 también son moduladores del canal TRPV1 tanto de forma agonista como antagonista, por tanto, no son específicos para el canal TRPM8.
- El compuesto con mejores propiedades farmacológicas es el 1 siendo el único que no presenta toxicidad.
- Los ensayos de patch-clamp confirman que el compuesto 1 es el más eficaz bloqueando el canal TRPM8.

Como continuación a los ensayos realizados, se debería confirmar la actividad antagonista o agonista de los compuestos sobre TRPV1, con ensayos fluorimétricos en presencia y no del antagonista conocido rojo de rutenio, además de analizar la especificidad y selectividad en modelos celulares que expresen otros canales termoTRP, como el TRPA1, que también es activado por temperaturas frías.

Adicionalmente, sería necesario medir en *patch-clamp* otra concentración adicional del compuesto 1 (0,1 μ M), para poder realizar una curva dosis-respuesta y así obtener un cálculo más sensible de la IC_{50} de este compuesto. Además, sería recomendable realizar este tipo de ensayos de los compuestos con mejores propiedades farmacológicas después del compuesto 1, como son los compuestos 2, 3 y 5 que son los siguientes más potentes y los que menor toxicidad presentan, con la finalidad de confirmar el antagonismo generado en TRPM8 con mayor sensibilidad.

Por último, una vez caracterizados los compuestos con mejores propiedades farmacológicas *in vitro*, sería conveniente realizar ensayos *in vivo*, concretamente en modelos animales donde la expresión de TRPM8 este alterada o exista una disfunción de estos canales. Por ejemplo, se podría probar en modelos animales con hiperalgesia o alodinia al frio inducida por oxaliplatino, así como modelos animales de cáncer de próstata, mama, colon o piel para comprobar el posible efecto quimioterapéutico de los compuestos.

1. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, M. A. (2020). Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 330, p. 109178). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>
- Almaraz, L., Manenschijn, J. A., de la Peña, E., & Viana, F. (2014). TRPM8. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 222, 547–579. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_22
- Bertamino, A., Iraci, N., Ostacolo, C., Ambrosino, P., Musella, S., Di Sarno, V., Ciaglia, T., Pepe, G., Sala, M., Soldovieri, M. V., Mosca, I., Gonzalez-Rodriguez, S., Fernandez-Carvajal, A., Ferrer-Montiel, A., Novellino, E., Taglialatela, M., Campiglia, P., & Gomez-Monterrey, I. (2018). Identification of a Potent Tryptophan-Based TRPM8 Antagonist with in Vivo Analgesic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(14), 6140–6152. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00545>
- Bertamino, A., Ostacolo, C., Medina, A., Di Sarno, V., Lauro, G., Ciaglia, T., Vestuto, V., Pepe, G., Basilicata, M. G., Musella, S., Smaldone, G., Cristiano, C., Gonzalez-Rodriguez, S., Fernandez-Carvajal, A., Bifulco, G., Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., & Russo, R. (2020). Exploration of TRPM8 Binding Sites by β -Carboline-Based Antagonists and Their in Vitro Characterization and in Vivo Analgesic Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(17), 9672–9694. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00816>
- Bonache, M. Á., Martín-Escura, C., de la Torre Martínez, R., Medina, A., González-Rodríguez, S., Francesch, A., Cuevas, C., Roa, A. M., Fernández-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A., Fernández-Carvajal, A., & González-Muñiz, R. (2020). Highly functionalized β -lactams and 2-ketopiperazines as TRPM8 antagonists with antiallodynic activity. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70691-x>
- Bors, E. H., & Blinn, K. A. (1957). Spinal Reflex Activity from the Vesical Mucosa in Paraplegic Patients. *Archives of Neurology And Psychiatry*, 78(4), 339–354. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1957.02330400013002>

- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997 389:6653, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. In *Nature* (Vol. 426, Issue 6966, pp. 517–524). <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Clare, J. J. (2010). Targeting ion channels for drug discovery. In *Discovery medicine* (Vol. 9, Issue 46, pp. 253–260). <https://www.discoverymedicine.com/Jeffrey-J-Clare/2010/03/24/targeting-ion-channels-for-drug-discovery/>
- Cohen, M. R., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2014). Structure of Thermally Activated TRP Channels. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 74, Issue 1, pp. 181–211). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00007-5>
- Cordero-Sánchez, C., Mudarra-Fraguas, I., & Fernández-Carvajal, A. (2019). Fluorescence-based functional assays for Ca²⁺-Permeable ThermoTRP channels. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1987, pp. 99–110). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9446-5_7
- DeFalco, J., A.J. Duncton, M., & Emerling, D. (2011). TRPM8 Biology and Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(17), 2237–2252. <https://doi.org/10.2174/156802611796904933>
- Dhaka, A., Viswanath, V., & Patapoutian, A. (2006). TRP ion channels and temperature sensation. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 135–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958>
- Di Sarno, V., Giovannelli, P., Medina-Peris, A., Ciaglia, T., Di Donato, M., Musella, S., Lauro, G., Vestuto, V., Smaldone, G., Di Matteo, F., Bifulco, G., Castoria, G., Migliaccio, A., Fernandez-Carvajal, A., Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., Ostacolo, C., & Bertamino, A. (2022). New TRPM8 Blockers Exert Anticancer Activity Over Castration-Resistant Prostate Cancer Models. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.4053283>
- Diver, M. M., Cheng, Y., & Julius, D. (2019). Structural insights into TRPM8 inhibition

- and desensitization. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6460), 1434.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAX6672>
- Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of Thermo TRP channels. In *Membranes* (Vol. 4, Issue 3, pp. 525–564). <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>
- Gaudet, R. (2009). Divide and conquer: High resolution structural information on TRP channel fragments. In *Journal of General Physiology* (Vol. 133, Issue 3, pp. 231–237). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810137>
- González-Muñiz, R., Bonache, M. A., Martín-Escura, C., & Gómez-Monterrey, I. (2019). Recent progress in TRPM8 modulation: an update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112618>
- González-Ramírez, R., Chen, Y., Liedtke, W. B., & Morales-Lázaro, S. L. (2019). TRP Channels and Pain. In *Neurobiology of TRP Channels* (pp. 125–148). CRC Press/Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9781315152837-8>
- Huang, Y., Fliegert, R., Guse, A. H., Lü, W., & Du, J. (2020). A structural overview of the ion channels of the TRPM family. In *Cell Calcium* (Vol. 85). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102111>
- Izquierdo, C., Martín-Martínez, M., Gómez-Monterrey, I., & González-Muñiz, R. (2021). Molecular Sciences TRPM8 Channels: Advances in Structural Studies and Pharmacological Modulation. *J. Mol. Sci*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22168502>
- Journigan, V. B., Alarcón-Alarcón, D., Feng, Z., Wang, Y., Liang, T., Dawley, D. C., Amin, A. R. M. R., Montano, C., Van Horn, W. D., Xie, X. Q., Ferrer-Montiel, A., & Fernández-Carvajal, A. (2021). Structural and in Vitro Functional Characterization of a Menthyl TRPM8 Antagonist Indicates Species-Dependent Regulation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(5), 758–767. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00001>
- Journigan, V. B., & Zaveri, N. T. (2013). TRPM8 ion channel ligands for new therapeutic applications and as probes to study menthol pharmacology. *Life Sciences*, 92(8–9),

425–437. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.10.032>

Khalil, M., Babes, A., Lakra, R., Försch, S., Reeh, P. W., Wirtz, S., Becker, C., Neurath, M. F., & Engel, M. A. (2016). Transient receptor potential melastatin 8 ion channel in macrophages modulates colitis through a balance-shift in TNF-alpha and interleukin-10 production. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1500–1513. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.16>

Kume, H., & Tsukimoto, M. (2019). TRPM8 channel inhibitor AMTB suppresses murine T-cell activation induced by T-cell receptor stimulation, concanavalin A, or external antigen re-stimulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 509(4), 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.004>

Laing, R. J., & Dhaka, A. (2016). ThermoTRPs and Pain. In *Neuroscientist* (Vol. 22, Issue 2, pp. 171–187). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1177/1073858414567884>

Li, H. (2017). TRP channel classification. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 976, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1088-4_1

Liu, L., & Rohacs, T. (2020). Regulation of the cold-sensing TRPM8 channels by phosphoinositides and G q-coupled receptors. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1734266>

Liu, Yi, & Qin, N. (2011). TRPM8 in health and disease: Cold sensing and beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 704, 185–208. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_10/TABLES/3

Liu, Yuqian, Mikrani, R., He, Y., Faran Ashraf Baig, M. M., Abbas, M., Naveed, M., Tang, M., Zhang, Q., Li, C., & Zhou, X. (2020). TRPM8 channels: A review of distribution and clinical role. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 882, p. 173312). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173312>

Marwaha, L., Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Bhandari, R., & Kuhad, A. (2016). TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. In *Inflammopharmacology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 305–317). <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0288-x>

- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. In *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (Vol. 2005, Issue 272). Sci STKE. <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>
- Moore, C., Gupta, R., Jordt, S. E., Chen, Y., & Liedtke, W. B. (2018). Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 120. <https://doi.org/10.1007/S12264-017-0200-8>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Segev, A., Garcia-Oscos, F., & Kourrich, S. (2016). Whole-cell patch-clamp recordings in brain slices. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(112), e54024. <https://doi.org/10.3791/54024>
- Sherkheli, M. A., Gisselmann, G., Vogt-Eisele, A. K., Doerner, J. F., & Hatt, H. (2008). Menthol derivative WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 370–378.
- Vahabi, B., Parsons, B. A., Doran, O., Rhodes, A., Dean, S., & Drake, M. J. (2013). Trpm8 agonists modulate contraction of the pig urinary bladder. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(7), 503–509. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0406>
- Vargas, L., Díaz, J., Herrera, E., & Galindo, R. (2008). Los canales TRP y su participación en la termotransducción. *Revista de La Univesidad Industrial de Santander. Salud*, 40(2), 110–119. redalyc.org/pdf/3438/343835680006.pdf
- Vay, L., Gu, C., & McNaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 165, Issue 4, pp. 787–801). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. In *Annual Review of*

Biochemistry (Vol. 76, pp. 387–417). Annual Reviews.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>

- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., & Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9652–9656. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9652>
- Xu, H., Delling, M., Jun, J. C., & Clapham, D. E. (2006). Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*, 9(5), 628–635. <https://doi.org/10.1038/nn1692>
- Yin, Y., Wu, M., Zubcevic, L., Borschel, W. F., Lander, G. C., & Lee, S. Y. (2018). Structure of the cold- And menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science*, 359(6372), 237–241. <https://doi.org/10.1126/science.aan4325>
- Zhang, L., & Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 64(22), 8365–8373. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2146>