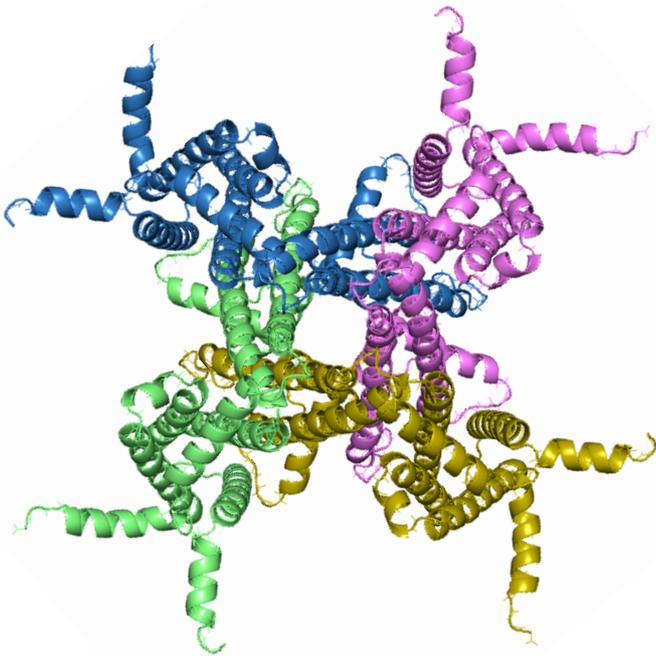


Caracterización de nuevos compuestos inhibidores de termorreceptores

TRPM8



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Céline Decouty Pérez

Directoras – **Asia Fernández Carvajal**

Sara González Rodríguez

Curso académico 2017-2018

Resumen

El termorreceptor de potencial transitorio subfamilia melastatina número 8 (TRPM8) es un canal catiónico, permeable a calcio y activado por disminuciones de la temperatura y algunos compuestos naturales y sintéticos. TRPM8 tiene papel importante en la transducción del frío en las neuronas sensoriales primarias del sistema somatosensorial. La expresión de este canal se ha visto incrementada en diversos tipos de cáncer entre los que destaca el cáncer de próstata, y su actividad se ve aumentada en determinadas patologías como la alodinia y la hiperalgesia al frío. Por ello, es necesario descubrir nuevos compuestos capaces de bloquear su actividad y así poder obtener una terapia efectiva para estas patologías. El objetivo de este trabajo es caracterizar la actividad de dos compuestos antagonistas que han sido elegidos de una quimioteca a través de técnicas de cribado. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos seleccionados, RGM8-18 y RGM8-51 tienen una potencia de 6,37 μM y 2,78 μM , respectivamente, no son tóxicos a concentraciones de hasta 100 μM , y son capaces de disminuir eficazmente la alodinia al frío en modelos animales, siendo más eficaz *in vivo* el compuesto RGM8-51.

Abstract

The transient receptor potential melastatin member 8 (TRPM8) is a cationic channel, permeable to calcium and activated by cold temperatures and some natural and synthetic compounds. TRPM8 plays an important role in the transduction of cold in the primary sensory neurons of the somatosensory system. The expression of this channel is increased in different types of cancer, specially in prostate cancer and its activity is increased in certain pathologies such as cold allodynia and hyperalgesia. Therefore, it is necessary to discover new compounds capable of blocking their activity in order to obtain an effective therapy for these pathologies. The objective of this work is to characterize two antagonist compounds that have been selected from a library through screening techniques. The results obtained show that the selected compounds, RGM8-18 and RGM8-51 have a potency of 6,37 μM and 2,78 μM , respectively, they are not toxic at concentrations up to 100 μM , and both are able to effectively reduce cold allodynia in animal models, being more effective RGM8-51.

Palabras clave: TRPM8, fluorimetría, canal iónico, alodinia al frío, antagonismo.

Tabla de contenido

1. Introducción	4
1.1 Superfamilia TRP	4
1.2 Familia termo-TRP y termotransducción	6
1.3 TRPM8	7
2. Antecedentes	12
3. Objetivos	13
4. Materiales y métodos	14
4.1 Sistemas celulares	14
4.2 Agonistas, antagonistas de TRPM8 y compuestos	14
4.3 Técnicas fluorimétricas basadas en sondas sensibles al calcio	15
4.4 Imagen de Calcio	17
4.5 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT	19
4.6 Experimentos <i>in vivo</i>	20
4.7 Docking	21
5. Resultados	22
5.1 Compuestos químicos	22
5.2 Estudio de la actividad de los compuestos por fluorimetría de calcio	23
5.3 Resultados obtenidos en Imagen de Calcio	24
5.4 Caracterización de la citotoxicidad mediante MTT	27
5.5 Experimentos <i>in vivo</i>	29
5.6 Acoplamiento virtual (“Docking”)	31
6. Discusión	34
7. Conclusiones y proyección futura	36
Bibliografía	37

1. Introducción

1.1 Superfamilia TRP

Los receptores de potencial transitorio (TRP) son una superfamilia multigénica que codifica proteínas integrales de membrana y que funcionan como canales. Los 28 miembros de esta familia se conservan en levaduras, invertebrados y vertebrados. Esta superfamilia está subdividida en 7 diferentes familias: TRPC (canónicos), TRPV (vanilloides), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (ankyrina) y TRPN (NOMPC-like); esta última familia está únicamente presente en invertebrados y peces¹. Los canales iónicos TRP están ampliamente expresados en diferentes tejidos y tipos celulares, donde están implicados en diversos procesos fisiológicos, como la sensación de diferentes estímulos o la homeostasis iónica. La mayoría de los TRPs son canales catiónicos no selectivos, solo unos pocos subtipos son altamente selectivos al catión Ca^{+2} y algunos son permeables a cationes Mg^{+2} hidratados².

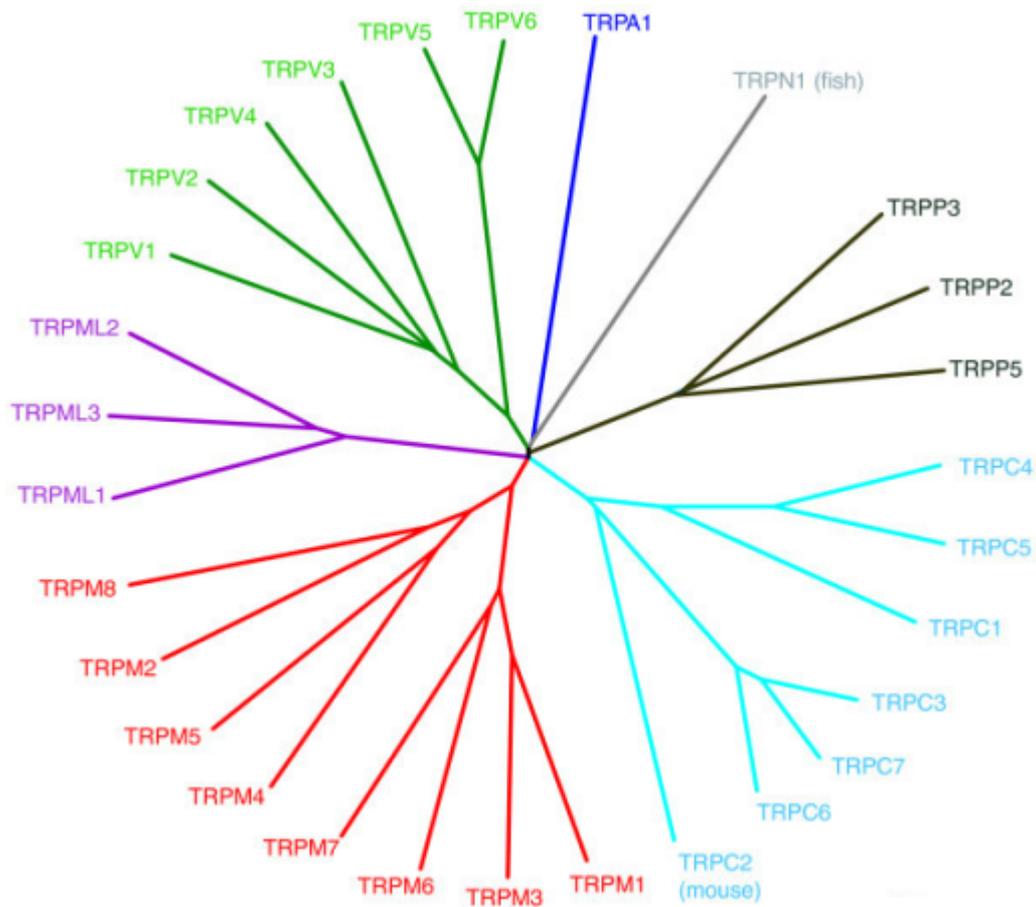


Figura 1. Superfamilia TRP. Cada subfamilia está representada con un color. TRPN1 está presente únicamente en peces y TRPC2 en ratón².

La activación de los canales TRP produce la despolarización de la membrana celular debido a la entrada de iones Ca^{2+} , activando a su vez canales iónicos dependientes de voltaje. Son considerados los “guardianes” del transporte intra y extracelular de diversos iones; y son requeridos para la función de orgánulos intracelulares (como los endosomas y lisosomas). Se consideran canales polimodales ya que responden a diversos estímulos tanto químicos como físicos³. La activación a través de ligando es muy amplia y cada uno de estos canales posee ligandos específicos. Ejemplos de activación directa incluirían cambios de temperatura, estimulación mecánica, y acoplamiento conformacional con otras proteínas tales como IP3R (receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato). La activación indirecta se refiere al control transcripcional o la inserción de vesículas que contienen proteínas TRP en la membrana plasmática².

Alteraciones funcionales en estos canales se ha visto que están implicadas en diversas patologías, incluyendo desórdenes neurodegenerativos, enfermedades renales, dolor crónico e inflamación, y en algunos tipos de cáncer⁴.

Estructuralmente son bastante parecidos, aunque difieren en sus extremos N y C terminal, todos ellos contienen cuatro subunidades con seis dominios transmembrana las cuales pueden ensamblarse como homo o heterotetrámeros. Este tetrámero dará lugar al poro permeable a cationes, constituido por una corta región hidrofílica situada entre los dominios transmembrana 5 y 6. Los aminoácidos localizados antes del poro confieren la selectividad al canal. Los extremos N y C terminal están implicados en la regulación del ensamblaje del canal y de su funcionalidad⁵.

Patologías asociadas a canales TRP

Las canalopatías se definen como un grupo heterogéneo de trastornos que resultan de la disfunción de los canales iónicos localizados en las membranas de todas las células y muchos orgánulos celulares⁴. Sin embargo, de los aproximadamente 300 canales iónicos que codifica el genoma humano, relativamente pocos se han relacionado directamente a enfermedades en humanos. Se han identificado seis canales TRP relacionados con canalopatías causadas por mutaciones en el gen que codifica el canal con pérdida de función o ganancia de función. Entre ellas podemos destacar, la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, asociada a un defecto genético en TRPC6⁶, la dermatitis atópica asociada a TRPC4, la distrofia muscular en la que se ve implicado TRPV2 y la paraplejia espástica con el canal TRPM6. Otras enfermedades pueden ser causadas debido a cambios de expresión del canal, su sensibilización o por el contrario su desensibilización, dando como resultado respuestas potenciadas o abolidas en diferentes patologías.

En general, la desregulación de la función de los canales TRP puede conducir a enfermedades por uno o más de los siguientes mecanismos⁷:

- La mayor parte de los TRP están implicados en la señalización del Ca^{+2} . Por lo tanto, la alteración de la funcionalidad de los TRP puede tener grandes efectos en la concentración intracelular de esta molécula de señalización.
- Los TRP pueden actuar como receptores para diferentes estímulos físicos y químicos en la célula. Esto permite a las células y organismos percibir y dar respuestas a cambios en el medio, por lo que defectos de la actividad de estos canales pueden provocar múltiples desregulaciones somatosensoriales.
- También podemos encontrar canales TRP en las membranas de orgánulos intracelulares cuyas alteraciones funcionales dan lugar a disfunciones por ejemplo de los lisosomas, como es el caso de mutaciones en el TRPML1.
- Muchos canales TRP están implicados en el control de los procesos de proliferación y crecimiento celular. Disfunciones de estos canales puede conllevar a una desregulación del crecimiento, organogénesis alterada o incluso cáncer (TRPM8)⁸.
- Los canales TRP tienen la capacidad de modular la actividad de células excitables, en cerebro y corazón, por lo tanto, cualquier problema en estos canales puede dar lugar a disfunciones importantes.

1.2 Familia termo-TRP y termotransducción

Dentro de los canales TRP, la familia termo-TRP, en la cual se incluyen aquellos sensibles a cambios en temperatura, han sido los más estudiados. Se expresan preferentemente en las terminaciones nerviosas sensoriales periféricas que inervan la piel y las mucosas, donde proporcionan información sobre los cambios térmicos en el medio ambiente.

Los canales de esta subfamilia se expresan como homotetrámeros, aunque también se han propuesto heterotetrámeros para algunos de ellos. Todos ellos presentan seis dominios transmembrana (S1-S6), con una región de poro entre S5 y S6, y con dominio citosólico N y C-terminal. El extremo N tiene varias repeticiones de anquirina o regiones de homología de TRPM, mientras que el término C contiene motivos para la multimerización⁹. Hasta la fecha, se han caracterizado seis termoTRP: TRPV1 y TRPV2, se activan a niveles dolorosos de calor ($\geq 42^\circ\text{C}$ y $\geq 52^\circ\text{C}$, respectivamente), TRPV3 y TRPV4 responden a calor no doloroso (32°C y 35°C ,

respectivamente), TRPM8 se activa con temperaturas frías no dolorosas (20-25°C), mientras que TRPA1 se activa por frío doloroso ($\leq 17^\circ\text{C}$)¹⁰.

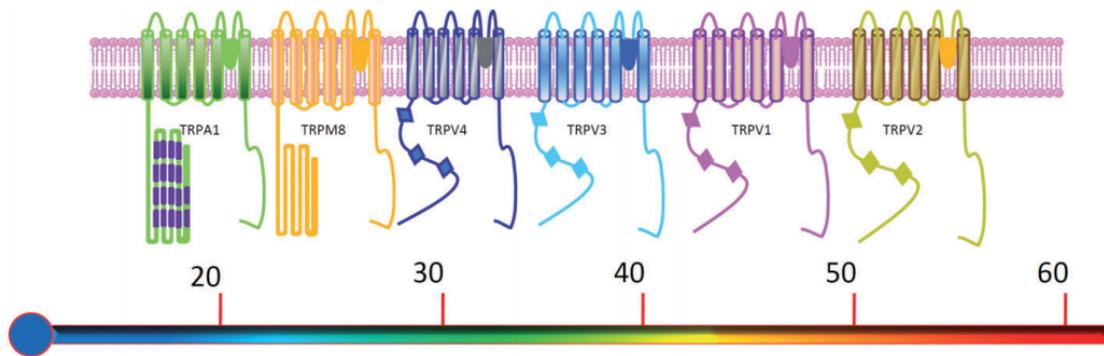


Figura 2. **Subfamilia Termo-TRP.** Los 6 canales incluidos en esta subfamilia y abajo la temperatura a la cual se activan¹⁰.

Cada termo-TRP también se activa por compuestos naturales específicos y por sustancias sintéticas, que también son conocidas por inducir las sensaciones térmicas y de dolor relevantes en los seres humanos¹⁰.

1.3 TRPM8

En el año 2001, se identificó y secuenció un gen desconocido hasta entonces a partir de una genoteca de ADN de próstata humana. Este gen codificaba una proteína de 130 kDa¹¹ con una gran homología de secuencia con los canales iónicos TRP y se denominó en un principio como TRP-p8. La localización cromosómica de este gen es 2q37.1 y está codificado por un cDNA con un marco de lectura de 3312 nucleótidos que da lugar a una proteína de 1104 aminoácidos⁸.

En consonancia con otros receptores de esta familia, la estructura funcional de TRPM8 es la de un tetrámero en el que cada subunidad consta de seis dominios α hélice transmembrana junto con los dos dominios N y C-terminal. Además, un pequeño lazo de 22 residuos hidrofóbicos entre los dominios transmembrana S5 y S6 forma el filtro de selectividad iónica en la región extracelular del poro¹². Se han identificado los residuos Asn799, Asp802 y Gly805 localizados en la región S2-S3, como sitios de unión de la icilina, un conocido agonista del canal. Son también importantes aquellos residuos implicados en la unión del mentol, Tyr745, Arg841 y Tyr1004¹³.

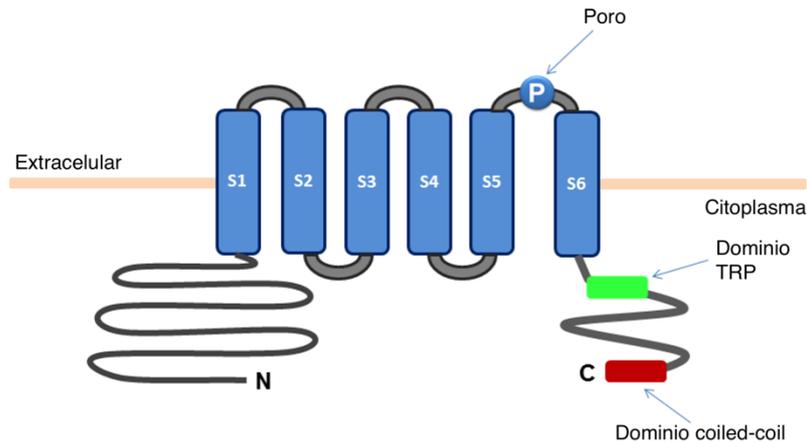


Figura 3. Estructura TRPM8. Estructura simplificada del canal donde vemos el poro, el dominio TRP, los seis dominios transmembrana y los extremos N y C terminal¹⁵.

El canal TRPM8 está distribuido en una gran diversidad de tejidos. Los niveles más altos de expresión se encuentran en las neuronas somatosensoriales primarias cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) principalmente en las fibras C y A δ , ganglios del trigémino (TG), próstata e hígado¹⁴. Además de las neuronas sensoriales y el tejido de la próstata, TRPM8 se expresa en testículos, tracto urogenital, pulmones, la capa muscular vascular, espermatozoides y adipocitos blancos. Finalmente, fue encontrado en células tumorales neuroendocrinas y del melanoma¹⁵.

In vivo, los ratones knockout de TRPM8 presentan un fenotipo incapaz de detectar bajas temperaturas inocuas, así como la capacidad de responder ante una hipersensibilidad al frío inducida por lesiones por frío. Sin embargo, estos animales sí que son capaces de detectar el frío doloroso (5-20°C)².

Agonistas

Además de las bajas temperaturas, este canal es activado por diversos compuestos como el mentol¹⁶ (alcohol terpénico secundario que está presente en el aceite de la menta), el eucalipto (aceite del eucalipto), y la icilina, que es el agonista sintético más potente de TRPM8. La activación de este canal por frío, mentol e icilina, principalmente, se acompaña de la desensibilización de la actividad de este canal iónico de manera dependiente del calcio intracelular¹⁷.

En cuanto a los sitios de unión de los ligandos mencionados anteriormente cabe destacar que el residuo Tyr745 (S2) tiene un papel crucial para la unión del mentol.

Antagonistas

El AMTB (N-(3-Aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)benzamida hidrocloreto) ha sido ampliamente utilizado como bloqueador del canal TRPM8 en numerosos estudios¹⁸. Este compuesto inhibe la activación inducida por icilina o mentol.

El BCTC, un derivado de la urea ha sido uno de los primeros antagonistas de TRPM8 utilizado para estudios farmacológicos del canal. Este compuesto fue inicialmente propuesto como un modulador de TRPV1, pero finalmente se vio que actuaba como un bloqueador no selectivo de TRPM8¹⁴.

Además de estos, existe una gran variedad de agentes químicos con capacidad de bloquear este canal. Entre estos podemos destacar la librería de compuestos publicada por Janssen a principios de 2012 basada en derivados del benzotiofeno. En esta biblioteca de compuestos encontramos el 3-bromotiofeno, el cual mostró ser un buen antagonista en los ensayos in vivo siendo uno de los compuestos más activos de esta serie¹⁴.

Regulación endógena de TRPM8

La regulación endógena del canal TRPM8 se basa en una desensibilización de la actividad de este canal iónico de manera dependiente del calcio intracelular¹⁷. Por un lado, se ha demostrado que un incremento en la concentración de Ca^{+2} regula la actividad de TRPM8 a través de la vía de activación de la fosfolipasa C (PLC) dependiente de Ca^{+2} . En esta vía de regulación se ven implicadas diferentes proteínas-quinasa. Entre ellas destaca la proteína-quinasa C dependiente de Ca^{+2} (PKC) activada por la vía de la PLC y dando lugar a cambios en el estado de fosforilación del canal. Por lo tanto, los activadores de PKC producen una disminución en los niveles de fosforilación y de la actividad del canal, mientras que los inhibidores de la fosfatasa y los inhibidores de la PKC revierten estos efectos¹⁹.

En segundo lugar, numerosos trabajos demuestran la implicación del lípido de membrana inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) en este proceso. PIP_2 interacciona con el dominio TRP de este canal y las bajas temperaturas, así como el mentol aumentan la afinidad de TRPM8 por este ligando endógeno. La desensibilización se debe a la hidrólisis del PIP_2 a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3) provocada por el flujo de Ca^{+2} al espacio intracelular¹⁴.

in

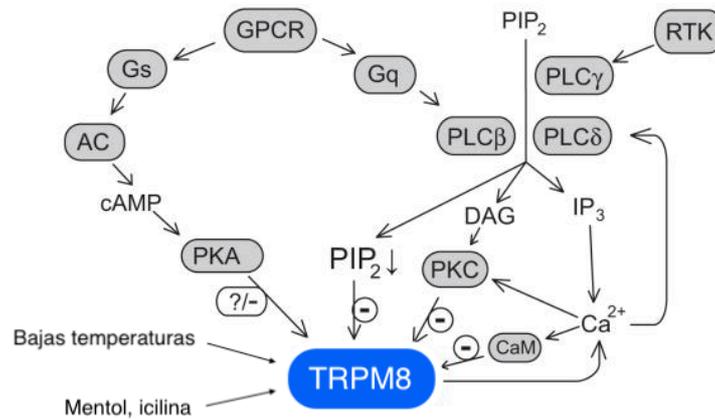


Figura 4. Ruta de regulación TRPM8. Se muestra el canal en el centro y todas las vías a través de las cuales puede estar regulado en las neuronas sensoriales¹⁹.

Además, los canales TRPM8 se expresan en neuronas sensoriales, en las cuales se encuentran un gran número de receptores de superficie celular que regulan la actividad de estas células. Algunos de estos receptores son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que se acoplan a la PLC, o a la adenilato ciclasa (AC). Los GPCR que actúan a través de la proteína Gs activan las enzimas AC, lo que conduce a la producción de AMP cíclico (cAMP) y a la activación de la proteína quinasa A (PKA). La activación de esta ruta ha sido estudiada y podría producir la inhibición de los canales TRPM8¹⁹.

Patologías asociadas a TRPM8

El TRPM8 tiene como función la percepción de la sensación de frío no nocivo, también se ha estudiado su implicación en algunos procesos biológicos como la termorregulación y el funcionamiento de la vejiga; y por otro lado, procesos patológicos como cáncer, asma y en dolor e inflamación⁸. Por otro lado, el enfriamiento moderado que provoca el estímulo fisiológico de los termorreceptores periféricos que expresan TRPM8, tiene claras propiedades analgésicas en algunas afecciones dolorosas (por ejemplo, osteoartritis)²⁰.

En primer lugar, se ha establecido el vínculo entre TRPM8 y el dolor e inflamación, lo que implica la presencia del canal en neuronas pertenecientes a la ruta nociceptiva²¹. La definición ampliamente aceptada de dolor fue desarrollada por un grupo de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP): "El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable que se asocia con daño tisular real o potencial o se describe en tales términos".

El dolor que surge tras una lesión o enfermedad del sistema nervioso a menudo se convierte en un estado crónico, y esto es lo que se denomina dolor inflamatorio y neuropático. Una de las principales manifestaciones de este tipo de dolor es la hipersensibilidad a la estimulación mecánica, térmica y/o química que puede manifestarse en forma de alodinia y/o hiperalgesia²².

La alodinia se define como dolor provocado por un estímulo que normalmente no causa dolor; y la hiperalgesia se basa en una respuesta de mayor intensidad a un estímulo que causa dolor²². Las neuropatías inducidas por oxaliplatino en ratones causan hipersensibilidad al frío y también resultan en un mayor porcentaje de neuronas sensoriales que responden a temperaturas frías. Cuando se utilizan ratones knockout para el gen de TRPM8 para estos mismos experimentos, esta hiperalgesia al frío está ausente, lo que implica TRPM8 como un componente crítico en este fenómeno²¹.

Una patología también asociada a este canal iónico es la cistitis intersticial, afección caracterizada por dolor en la región de la vejiga, por urgencia urinaria y aumento de la frecuencia de micción. La relación de la cistitis intersticial y TRPM8 ha sido estudiada en experimentos con modelos animales de dolor de vejiga, en los cuales el uso de bloqueadores de TRPM8, como el AMTB, demostró una disminución en los síntomas de esta enfermedad²¹.

Numerosos artículos denominan al canal iónico TRPM8 como una potencial diana para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. En los últimos años, un número cada vez mayor de estudios ha demostrado que los canales TRPM8 están sobreexpresados en varios tumores malignos, especialmente tumores sólidos, jugando un papel fundamental en diferentes etapas de desarrollo, proliferación, migración e invasión del cáncer¹⁴. Entre los tipos de cáncer más frecuentes encontramos el cáncer de próstata, melanoma, cáncer de mama, de vejiga, osteosarcoma, adenocarcinoma pancreático y finalmente, cáncer de células escamosas en las regiones oral y maxilofacial⁸. Por ello podemos denominar a TRPM8 como un potente biomarcador y como diana para un futuro tratamiento²³.

Agentes terapéuticos como los taxanos (paclitaxel, docetaxel) o los análogos de platino (carboplatino, oxaliplatino) son utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Los quimioterapéuticos derivados del platino inhiben la síntesis y reparación de las hebras de ADN con el fin de tratar cánceres como el carcinoma de hígado, cáncer testicular o cáncer ovárico entre otros. El oxaliplatino es el fármaco más comúnmente utilizado como agente antitumoral. Sin embargo, produce neurotoxicidad como uno de sus efectos secundarios principales, dando

lugar a dolor agudo e incluso crónico. El metabolismo del oxaliplatino en el organismo da lugar a oxalato y dicloro(1,2-diaminociclohexano)platino, y la hiperalgesia y la alodinia al frío que aparecen en los paciente que reciben este tratamiento se le atribuye a estos dos metabolitos²⁴. Ya se han realizado estudios que relacionan la aparición de estas patologías a una mayor expresión de TRPM8, y por ello es necesario encontrar bloqueadores de este canal y así poder aliviar estos efectos secundarios²⁵.

1. Antecedentes

La búsqueda de compuesto con actividad antagonista de TRPM8 proporciona un enfoque muy atractivo para el tratamiento de afecciones dolorosas relacionadas con el frío, como la alodinia e hiperalgesia, conocidos efectos secundarios de determinados agentes terapéuticos.

El tratamiento farmacológico actual de este tipo de patologías se basa en compuestos que actúan sobre canales iónicos regulados por voltaje o por ligando y sobre el receptor metabotrópico del glutamato. También encontramos opioides, moduladores del receptor cannabinoide e inhibidores del transportador de glicina²². Los efectos secundarios que pueden ocasionar estos fármacos son muy diversos, la sedación y la amnesia se correlacionan con moduladores del receptor metabotrópico del glutamato²⁶. Por otro lado, se han relacionado fármacos moduladores del receptor cannabinoide con trastornos respiratorios, gastrointestinales y del sistema nervioso²⁷.

Entre los antagonistas de TRPM8, se han descrito varias familias, que incluyen diferentes quimiotipos como benzotiofeno, bencimidazol y arilglicina como scaffolds centrales. Algunos de estos compuestos han demostrado actividad in vitro e in vivo en modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático^{12,28}.

Por otro lado, la implicación de TRPM8 en procesos tumorales lo convierte en una potencial diana terapéutica para tratar esta enfermedad, en concreto en el cáncer de próstata²⁹. Los quimioterapéuticos poseen graves efectos secundarios todos ellos derivados del daño ocasionado a tejidos sanos. Es por ello, que hoy en día una de las grandes metas consiste en la búsqueda de compuestos que impidan la proliferación de células tumorales pero que a su vez no afecten al desarrollo normal de aquellas no tumorales. Es por esto, que se propone como solución el desarrollo de un antagonista reversible específico de TRPM8. Además, ya han sido estudiados numerosos bloqueadores de este canal como podemos ver en la *Tabla 1*⁸.

Tabla 1. Tabla inhibidores TRPM8 descritos en la bibliografía⁸.

Antagonista	IC₅₀
PF-05105679	103 nM
AMG2850	41 nM
PBMC	15,6 nM

Algunos estos compuesto han demostrado ser efectivos en un rango de concentraciones nanomolar, consiguiendo reducir la hipersensibilidad al frío y la proliferación celular en el melanoma⁸.

Es por todo esto por lo que en los últimos años numerosos estudios se han centrado en tratar de descubrir moduladores para TRPM8, aunque también para otros canales de la misma familia como TRPV1, siendo este uno de los canales más caracterizados actualmente, e implicado en numerosas patologías como la migraña. Tanto los agonistas como los antagonistas de los canales TRP están actualmente en desarrollo como posibles agentes terapéutico.

2. Objetivos

- Aplicar los conocimientos teóricos aprendidos a lo largo del grado a nivel práctico en un laboratorio de investigación científica.
- Estudiar la actividad y citotoxicidad de dos compuestos, RGM8-18 y RGM8-51 previamente seleccionados de una quimioteca, mediante técnicas fluorimétricas y colorimétricas, respectivamente.
- Análisis in silico del sitio de unión de TRPM8 y predicción de la unión de los ligandos al receptor.
- Determinar mediante ensayos in vivo el posible efecto analgésico producido por los agentes químicos seleccionados a través de su efecto sobre TRPM8 en ratones adultos con alodinia al frío.

3. Materiales y métodos

4.1 Sistemas celulares

La línea celular utilizada, HEK-CR1, expresa de manera estable una secuencia de ADN de TRPM8 de rata. Las células se cultivaron en monocapa utilizando como medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), con penicilina al 1%, FBS (Suero fetal bovino) al 10% y 0,45 mg/mL de geneticina G418 e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Este sistema celular fue utilizado hasta un máximo de 45-50 pases. Las células son tratadas con un 0,25% de tripsina una vez alcanzaban una confluencia del 70-80% con el fin de darles un nuevo pase o bien preparar las placas con diferente número de pocillos y a distintas densidades para cada tipo de ensayo.

4.2 Agonistas, antagonistas de TRPM8 y compuestos

El agonista utilizado en los ensayos de actividad de TRPM8 fue el mentol. La preparación de la disolución de agonista se realizó a partir de una disolución stock de mentol a 500 mM preparada en etanol y que fue diluida en HBSS (Hanks Balanced Salts Solution), obteniendo así mentol con una concentración de 1 mM. Este fue utilizado como control positivo en los ensayos fluorimétricos con una concentración final de 100 µM en los diferentes ensayos.

Por otro lado, el antagonista utilizado como control negativo fue el AMTB. La preparación del antagonista se realizó a partir de una disolución stock de AMTB a 100 mM, resuspendida en HBBS y obteniendo una concentración final de 1 mM. Finalmente, la concentración utilizada en los diferentes ensayos fue de 10 µM.

Los compuestos RGM8-18 y RGM8-51 se resuspendieron en DMSO (Dimetil sulfóxido) hasta alcanzar la concentración deseada, y las posteriores disoluciones también se realizaron en DMSO.

4.3 Técnicas fluorimétricas basadas en sondas sensibles al calcio

Explicación de la técnica

Este ensayo se basa en la utilización de la sonda denominada Fluo-4NW (sin lavado), que es una sonda fluorescente de Ca^{+2} utilizado ampliamente para medir las concentraciones intracelulares de dicho ion.

La sonda se encuentra en su forma esterificada no fluorescente de acetoximetil éster junto a un detergente de baja toxicidad, Probenecid, el cual se utiliza para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares y así facilitar la introducción del Fluo-4NW en las células. Existe la posibilidad de que este indicador sea expulsado de la célula mediante transportadores de aniones orgánicos, es por ello por lo que el Probenecid también se utiliza comúnmente para inhibir este transporte y así evitamos que pueda haber otra fuente de fluorescencia procedente del exterior celular.

Las esterases se encargan de activar la sonda una vez esta se encuentra en el espacio intracelular y su unión a cationes de calcio provoca un aumento de la fluorescencia. La longitud de onda de excitación es de 488 nm y la longitud de onda de emisión es del 520 nm.

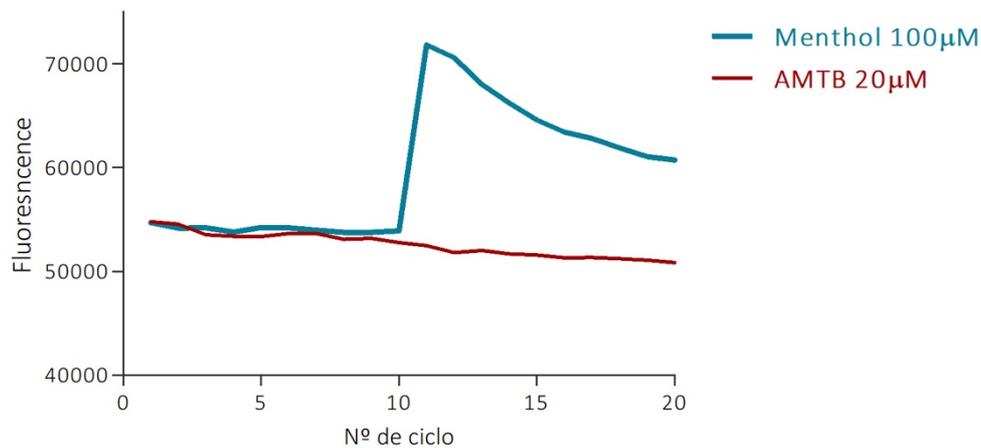


Figura 5. Medida de la actividad del canal TRPM8 mediante técnicas fluorescentes. La línea azul muestra la curva de fluorescencia debida a la activación de TRPM8 por el mentol y la consecuente entrada de calcio a las células, dando como resultado un aumento en la fluorescencia. En rojo se muestra la respuesta al AMTB, que, al estar bloqueando al canal, no se produce la entrada de calcio, y por lo tanto no aparece el pico de fluorescencia.

Al añadir un compuesto a las células, si este es agonista de TRPM8 se producirá la apertura del canal, lo cual se traducirá en un aumento del calcio citosólico, dando lugar a un incremento de la fluorescencia emitida por la sonda Fluo-4NW. En caso contrario, si el compuesto es un antagonista de TRPM8, se producirá el cierre del canal y, por lo tanto, se inhibirá el canal y no se observará un incremento en la señal de fluorescencia cuando se añada el agonista control, mentol 100 μ M.

Metodología

Las células HEK-CR1 fueron sembradas en placas de 96 pocillos, las cuales se habían tratado previamente con L-polilisina. Estas placas con las células se incubaron con medio de cultivo durante 48 horas con una densidad celular de 30.000 células/pocillo y así obtener una confluencia del 80-90% el día del experimento. Tras este periodo se procede a llevar a cabo el ensayo, la preparación de la sonda se realiza en base a un protocolo (se añade 1 mL de buffer a la sonda en polvo junto con 100 μ L de detergente), se añaden 100 μ L de Fluo-4NW a las células tras retirar el medio de cultivo y se deja incubar durante 1 hora a 37°C.

A continuación, se realizan las medidas de fluorescencia mediante el lector de placas POLARstar Omega, el cual se encuentra a una temperatura de 30°C en su interior y realiza un total de 20 ciclos de lectura. Estas lecturas se realizan a un radio de 3 mm del centro del pocillo, evitando así el centro y las paredes de los pocillos que suelen ser zonas más heterogéneas.

En los tres primeros ciclos se realiza la lectura de fluorescencia basal. El AMTB se añade manualmente en el ciclo 3, inyectándose 1 μ L de la disolución a 1 mM y obteniéndose una concentración final en el pocillo de 10 μ M. Los compuestos también se añaden en el ciclo 3, un volumen de 1 μ L por pocillo. El mentol se añade automáticamente por el dispositivo en el ciclo 10 en toda la placa, inyectándose 10 μ L de la disolución de 1 mM de mentol, dando lugar a concentración final de 100 μ M en el pocillo. Los controles positivos serán aquellos pocillos en los que únicamente se inyecta el mentol. Aquellos compuestos que actúen como bloqueadores del canal no mostrarán el aumento de fluorescencia propio del mentol que hemos visto en la *Figura 5* a partir del ciclo 11.

Análisis de datos

El análisis de estos resultados se realiza con la ayuda de una plantilla de Excel diseñada previamente. Antes de analizar la actividad de los compuestos es importante determinar la

fiabilidad y la validez de los resultados, para ello se utiliza el parámetro estadístico Z. El factor Z se calcula con los datos de la intensidad de fluorescencia debida a la inyección del agonista y antagonistas. La fórmula mediante la cual se calcula el factor Z es:

$$\mathbf{Factor\ Z} = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_P + \sigma_N)}{|\mu_P - \mu_N|}$$

Fórmula 1. Fórmula Factor Z. σ_P es la desviación estándar del control positivo, σ_N es la desviación estándar del control negativo, μ_P es la media del control positivo y finalmente, μ_N es la media del control negativo.

Los compuestos serán agonistas cuando activen al canal, es decir, si se produce un aumento de la fluorescencia tras la adicción del compuesto en el ciclo 3. Sin embargo, serán antagonistas aquellos compuestos que provoquen una disminución de la fluorescencia entre los ciclos 10 y 11 como consecuencia del bloqueo del canal. Debido a que ambos compuestos son bloqueadores del canal, será necesario únicamente calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de ellos.

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

Fórmula 2. Cálculo porcentaje de inhibición. Donde el Δ de la intensidad de fluorescencia control se calcula restando el ciclo 10 al ciclo 11 del control positivo (mentol).

El porcentaje de bloqueo de los compuestos se obtiene mediante la *Fórmula 2*. En esta fórmula la diferencia de la intensidad de fluorescencia entre el ciclo 10 y 11 se compara con el control positivo del mentol.

4.4 Imagen de Calcio

Explicación de la técnica

Esta técnica se basa en la utilización de la sonda Fluo-4AM con el fin de medir la entrada de calcio al interior celular. Mediante la tecnología de imagen de Calcio, observamos la entrada de ca al interior de las células empleando un microscopio invertido ZEISS AXIOVERT 200 el cual lleva acoplado una cámara ORCA-ER CCD. La sonda Fluo-4AM es degradada por las esterasas intracelulares impidiendo así su salida y activándola. Esto nos va a permitir visualizar la fluorescencia en las células HEK-CR1 como consecuencia de la apertura de los canales TRPM8

seguido la entrada de Ca^{+2} al espacio intracelular. La longitud de onda de excitación es de 500 nm, mientras que la fluorescencia emitida se filtró a 535 nm. Mediante esta técnica somos capaces de estudiar cómo los compuestos RGM8-18 y RGM8-51 modulan la actividad de TRPM8 de una manera más precisa.

Metodología

La preparación de la sonda se realiza a partir de la dilución de esta en 25 μL de DMSO 100%, y separamos esta disolución en alícuotas de 3 μL , las cuales contendrán un total de 6 μg de sonda por cada 3 μL . Para la disolución de carga se añaden 1 mL de HBSS obteniendo una concentración final de sonda de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ácido plurónico a 0,05% en la disolución final. El ácido plurónico es un detergente de baja toxicidad que permite la entrada de la sonda al espacio intracelular. Para este ensayo se utilizan placas de 24 pocillos en las que se colocan cristales de 12 mm de diámetro previamente tratados con L-polilisina. Las células HEK-CR1 fueron sembradas a 20.000 células/pocillo y se dejaron incubar a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 horas. Pasado este periodo, se incuban con 500 μL de sonda durante una hora y media tras un pequeño lavado con HBSS, transcurrido este tiempo, se realiza un segundo lavado en HBSS durante 20 minutos.

Se realizaron tres tipos de protocolo, dos para los controles y otro para los compuestos. Como agonista se utilizó el mentol en todos los protocolos, a partir de un stock a 500 mM en etanol, se prepararon 25 mL de mentol a 100 μM en tampón HBSS. El AMTB fue utilizado como control de bloqueo, a partir de una disolución stock a 100 mM en etanol se prepararon muestras a 10 y 20 μM con el fin de encontrar la concentración que produjese un 100% de bloqueo.

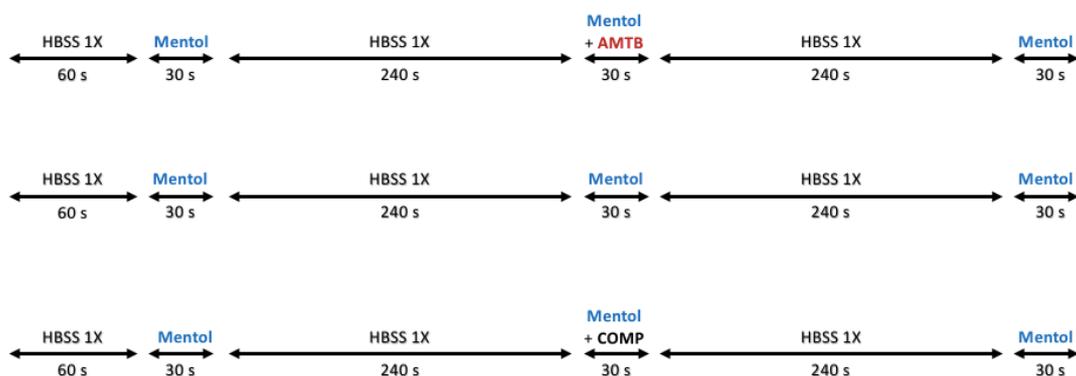


Figura 6. **Protocolos Imagen de Calcio.** En todos los casos la concentración de mentol es de 100 μM . En primer lugar, el control negativo, con AMTB a una concentración de 20 μM . En segundo lugar, el control positivo con únicamente tres pulsos de mentol. En tercer lugar, el protocolo para ambos compuestos cuyas concentraciones van variando.

Análisis de datos

En primer lugar, restamos la línea basal y seleccionamos aquellas células cuya línea basal no posea una desviación mayor al 10%. Una vez hemos realizado esta preselección, calculamos las relaciones entre el pulso 2 y el pulso 3 con respecto al pulso 1. La relación P_2/P_1 nos indica el porcentaje de inhibición de los compuestos que lo comparamos con el control negativo, que será el AMTB.

4.5 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

Explicación de la técnica

Una vez determinada la actividad y la potencia de cada uno de los compuestos, se procede a caracterizar la citotoxicidad de cada uno de ellos. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang³⁰. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Metodología

Las células HEK-CR1 fueron sembradas a una densidad de 30000 células/pocillo utilizando una placa multipocillo de fondo transparente de 96 pocillos. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Los compuestos a ensayar se prepararon en DMSO, de tal manera que al añadir 1 µL al pocillo tenga la concentración deseada (1% concentración no tóxica). Las células se incubaron de nuevo en las mismas condiciones durante 24 horas, para así poder medir supervivencia y proliferación celular en presencia de los compuestos.

Tras este periodo, se añaden 5 µL de MTT a partir de un stock a 5 mg/mL en PBS. Se incuba durante 4 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán, finalmente se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µL de DMSO y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esta última adición de DMSO permite que los cristales de formazán se disuelvan. La lectura de la densidad óptica (DO) se realiza con el POLARstar utilizando un protocolo de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

Análisis de datos

Las absorbancias obtenidas se analizan utilizando el programa Excel. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular utilizamos la siguiente fórmula.

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{DO\ células\ tratadas}{DO\ células\ control} * 100$$

Fórmula 3. Fórmula viabilidad celular. Las células tratadas serán aquellas que han sido incubados con alguno de los compuestos. Las células control habrán sido tratada con el vehículo, es decir, DMSO al 1%.

4.6 Experimentos *in vivo*

Metodología

La alodinia al frío fue inducida mediante la administración del Oxaliplatino, un fármaco empleado para el tratamiento de diversos cánceres. Para evaluar la alodinia al frío se realizó el test de la acetona que consiste en la aplicación de una gota de acetona en la superficie plantar de una de las patas traseras de los animales. Previamente, los ratones fueron colocados en cajas de plástico sobre una malla metálica donde se les deja un periodo de adaptación a dicho espacio de aproximadamente 30 minutos. A continuación, se aplica una gota de acetona (10 µL) suavemente sobre la superficie plantar de la pata derecha trasera. Una respuesta positiva en este test implica el lamido de dicha pata por el ratón debido a la reacción química sensible al frío (respuesta al dolor nociceptivo). Estas respuestas se midieron durante 20 segundos con ayuda de un cronómetro manual. Cada medida se realiza dos veces en la pata y se representa la media de las dos medidas.

Los ratones fueron tratados previamente con el agente antitumoral Oxaliplatino (Tocris) para inducirles la alodinia al frío. El oxaliplatino fue disuelto en agua y mediante un ligero calentamiento se asegura la homogeneidad de la disolución, se administra a los animales a una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en el primer, tercer y quinto día. Los experimentos se realizaron el séptimo día tras la administración del fármaco. Además, junto con el oxaliplatino se inyecta una solución salina al 5% de manitol por vía intraperitoneal para prevenir posibles daños renales y deshidratación.

Los compuestos RGM8-18 y RGM8-51 fueron preparados en DMSO (100%) y posteriormente disueltos en suero salino para su administración. Las dosis de RGM8-18 (1 µg) y RGM8-51 (0.1 y

1 µg) fueron inyectadas por vía intraplantar en la pata derecha trasera del animal 30 minutos antes de la aplicación de acetona. Las medidas se realizaron a distintos tiempos (15, 30 60 y 120 minutos tras la administración del compuesto). Previamente se realizó una medida basal.

Análisis de resultados

Se analizó el análisis de los resultados utilizando el programa GraphPad, empleando el test ANOVA. Los p-valores de los gráficos obtenidos se representan siguiendo la siguiente leyenda (*, p-valor < 0.05, **, p-valor < 0,01, ***, p-valor < 0.001, ****, p-valor < 0.0001).

4.7 Docking

El acoplamiento virtual (docking) es un método computacional cuyo objetivo es predecir las estructuras 3D entre dos moléculas que interactúan. En nuestro caso, cada uno de los ligandos estudiados se acopla (“docks”) a la proteína TRPM8 y, por lo tanto, mediante este método somos capaces de predecir cuál será el sitio de unión más favorable para los compuestos RGM8-18 y RGM8-51.

Metodología

Para realizar el acoplamiento se parte de una estructura de TRPM8 recientemente determinada por microscopía electrónica 6BPQ¹³ con una resolución de 4.1 Å¹², disponible en la página Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Esta estructura ha sido caracterizada del organismo *Ficedula albicollis* (ave) y está compuesta por 4 cadenas (A, B, C y D). Además, este modelo presenta una elevada homología con respecto al TRPM8 de humano y pollo, 83% y 94% de identidad de secuencia, respectivamente.

El modelo de TRPM8 de rata se prepara en dos etapas a partir de la estructura de TRPM8 de *Ficedulla* (6BPQ). En una primera etapa se completan los bucles y fragmentos faltantes en la estructura original utilizando la secuencia de TRPM8 de *Ficedulla*. El modelo resultante contiene todos los bucles, incluyendo las cadenas laterales de aquellos fragmentos que solo tenían información del esqueleto peptídico. En una segunda etapa, el modelo de TRPM8 de *Ficedulla* se utiliza como molde para modelar el TRPM8 de rata mediante modelado por homología. Se utiliza para ello el alineamiento de secuencia entre TRPM8 de *Ficedulla* y de rata obtenido con ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), y se utiliza el programa de diseño y modelado Yasara (<http://www.yasara.org/>), obteniendo un modelo de subunidad al que solo le

faltan los 54 primeros aminoácidos del extremo N-terminal. Finalmente, cuatro repeticiones de esta subunidad se tetramerizan utilizando el programa VMD (v1.9.2; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

La estructura química de los compuestos se obtiene mediante el programa ChemDraw y posteriormente, se transforma en estructuras 3D mediante MarvinSketch.

Para la realización del docking global entre los ligandos y TRPM8 se utilizó el programa AutoDock implementado en Yasara (<http://www.yasara.org/>), mediante el uso del script “dock_run .mcr” incluido en el paquete comercial. Los archivos utilizados para el acoplamiento global de cada uno de los compuestos fueron idénticos, con las mismas condiciones y con la única diferencia del archivo PDB del ligando. El docking global se realizó con el ligando flexible y el receptor rígido. Una vez obtenidos los resultados del docking global es importante tener en cuenta que el programa Yasara, en contraposición a muchos otros programas de modelado molecular, nos proporciona las energías de unión en positivo, es decir, cuanto mayor valor, mejor será la interacción. Este script da como resultado un conjunto de clusters, es decir, agrupamientos de las posiciones más favorables del ligando en el receptor que se diferencian en menos de 5 Å RMSD. El siguiente paso consistió en realizar un filtrado y elegir aquellos clusters cuya posición se repitiera y además tuvieran buenas energías de unión.

4. Resultados

5.1 Compuestos químicos

El grupo de la Dra. Rosario González Muñiz, investigadora del Instituto de Química Médica del CSIC de Madrid llevo a cabo la síntesis de una quimioteca compuesta por 72 compuestos derivados de la familia de β -lactamas (*Figura 7*).

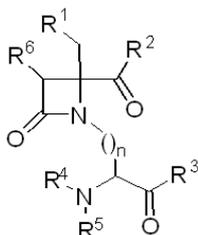


Figura 7. Anillo β -lactámico como scaffold central para antagonistas de TRPM8. R^n representa cada sustituyente usado en el diseño de compuestos. $(\text{O})_n$ representa la longitud de la cadena de alquilo.

Estudios previos en el laboratorio demostraron que los compuestos más eficaces fueron RGM8-18 y RGM8-51, por lo que se llevo a cabo la caracterización de los mismos. RGM8-18 se caracteriza por tener tanto en R¹ como en R³ un grupo funcional fenilo, en R² un radical bencilo, en R⁴ un átomo de hidrógeno, en R⁵ poseen un benceno y en R⁶ un radical metilo. RGM8-51 posee en R¹ un fenilo, en R² un terbutil éter, R³, R⁴ y R⁵ poseen como sustituyente un grupo fenilo.

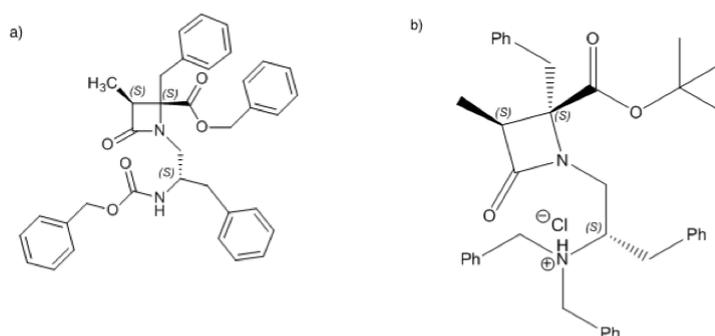


Figura 8. Estructura química de los compuestos. a) Compuesto RGM8-18 y b) Compuesto RGM8-51.

5.2 Estudio de la actividad de los compuestos por fluorimetría de calcio

Estos compuestos fueron ensayados para medir el efecto que producían sobre la actividad del canal TRPM8 expresado en el sistema celular HEK-CR1, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 4.3 de Materiales y métodos. Todos los ensayos de actividad fueron realizados por triplicado. Se realizó una curva dosis-respuesta con el fin de caracterizar la potencia de ambos agentes químicos.

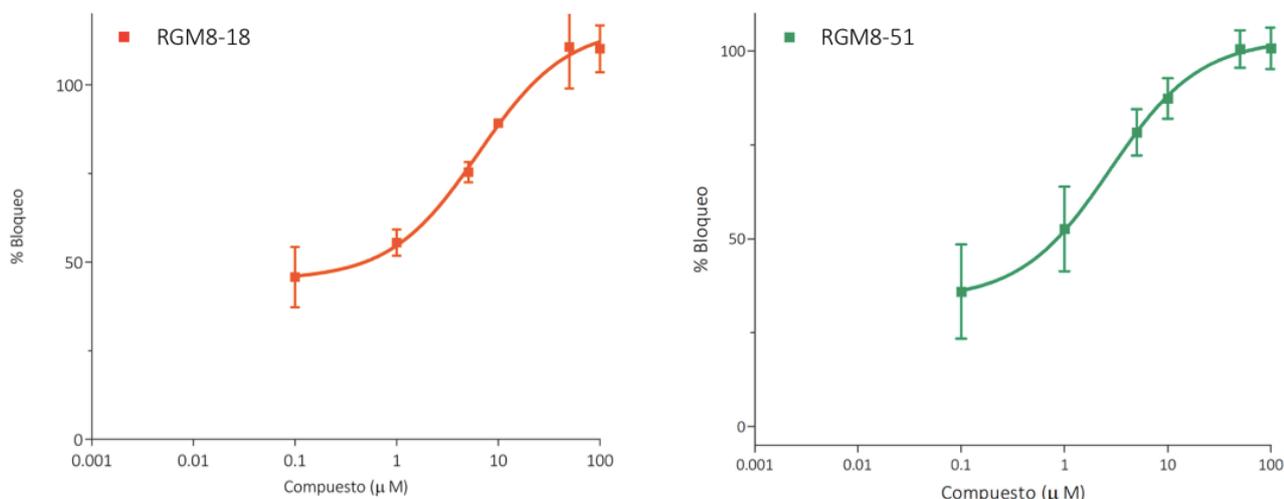


Figura 9. Curva dosis-respuesta de los compuestos RGM8-18 y RGM8-51.

La IC_{50} de los antagonistas fue calculada a partir de la curva dosis respuesta utilizando el programa GraphPad. Se puede observar en la *Tabla 2* que ambos compuestos presentan una elevada potencia para bloquear el canal TRPM8 con IC_{50} en el rango micromolar.

Tabla 2. IC_{50} de ambos compuestos.

	IC_{50} (μM) \pm Error estándar
RGM8-18	$6,37 \pm 1,15$
RGM8-51	$2,78 \pm 1,06$

5.3 Resultados obtenidos en Imagen de Calcio

Las técnicas fluorimétricas basadas en Imagen de calcio nos permiten estudiar la desensibilización y bloqueo del canal TRPM8 de manera muy precisa. En primer lugar, se realizó un protocolo para así caracterizar la respuesta al mentol en las células HEK-CR1 y analizar la posible reducción de respuesta en los tres pulsos consecutivos debido a la desensibilización del canal. El mentol se utilizó a una concentración de $100 \mu M$. Cada uno de estos pulsos tuvo una duración de 30 segundos con un periodo de 4 minutos de lavado con el tampón HBSS entre cada uno de los pulsos. Los resultados demostraron que los tres picos de fluorescencia debido a los tres pulsos de mentol se iban reduciendo en intensidad de fluorescencia conforme se aplicaban.

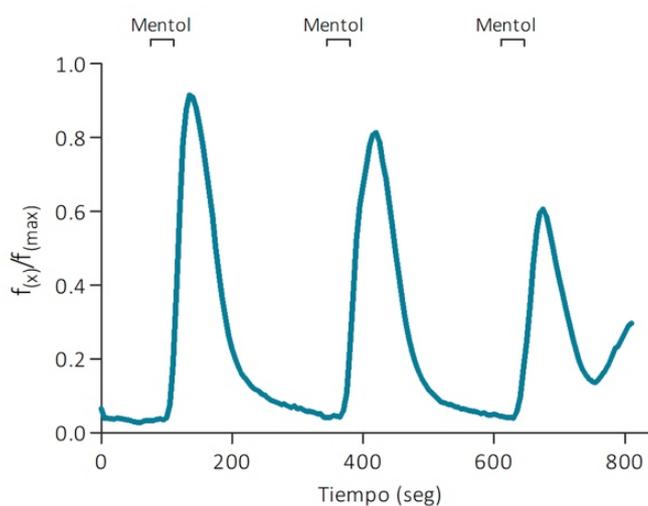


Figura 10. Medida de la desensibilización del TRPM8. El mentol se aplicó los tres pulsos a una concentración de $100 \mu M$.

Una vez caracterizada la capacidad del TRPM8 para desensibilizarse, se procedió a ensayar tanto los compuestos como el AMTB (control negativo). El AMTB se utilizó en primer lugar a $10 \mu M$,

pero como no producía un bloqueo del 100% se decidió duplicar la concentración a 20 μM y así conseguir un buen control para comparar la efectividad de los compuestos.

Las células se sometieron a un protocolo en el que se aplicó un pulso de 30 segundos de mentol a 100 μM , un periodo de lavado de 4 minutos con HBSS y un segundo pulso del AMTB a 20 μM y mentol a 100 μM , con el fin de observar el cierre del canal debido a la presencia del bloqueador.

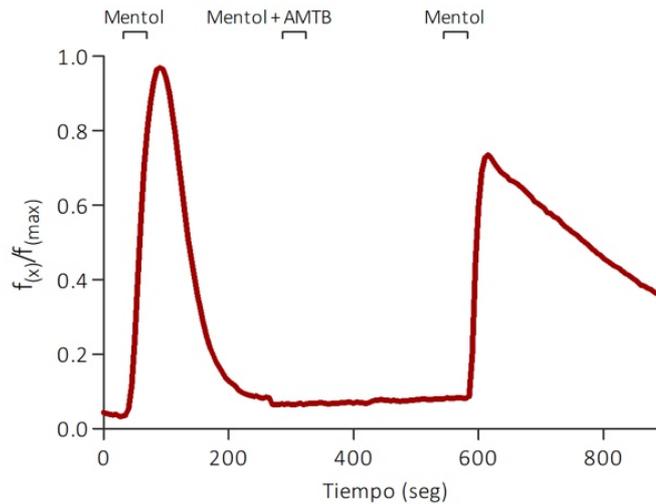


Figura 11. Medida del bloqueo de TRPM8 por AMTB. Tras un primer pulso de mentol y posterior lavado, se aplica un segundo pulso con mentol y AMTB a 20 μM observándose el bloqueo del canal.

El compuesto RGM8-18 se ensayó en primer lugar a 10 μM , como podemos ver en la Figura 12, provocó el cierre de TRPM8. Mostrando un efecto similar al AMTB a 20 μM . Por esta razón, se ensayaron dos concentraciones menores, 1 y 0,1 μM (Figura 13).

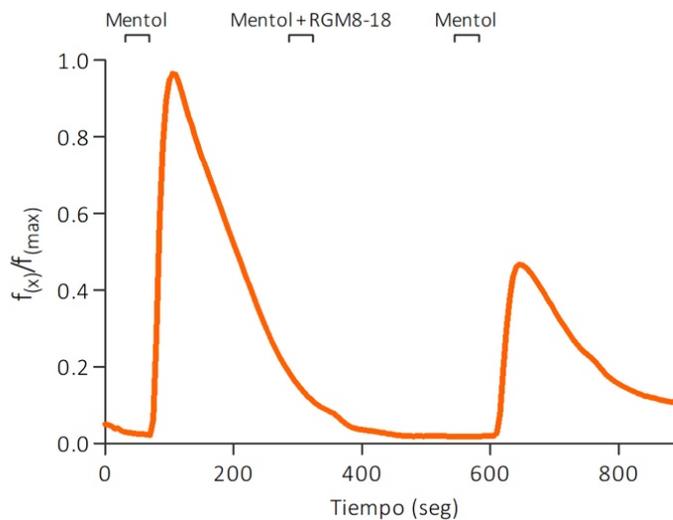


Figura 12. Medida del bloqueo de TRPM8 por RGM8-18 a 10 μM .

Para tener en cuenta no solo el efecto de bloqueo por parte del compuesto sino también el producido debido a la desensibilización del canal, se han representado los datos como la relación entre el pico 2 y el pico 3 con respecto al pico 1.

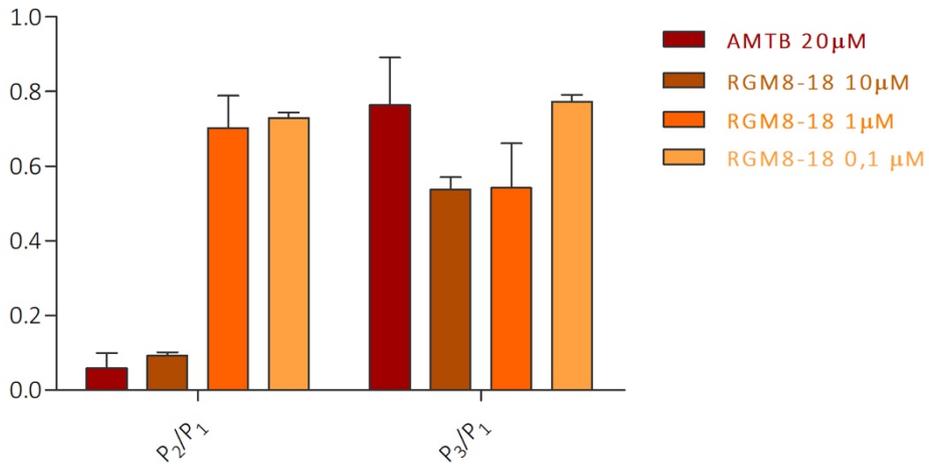


Figura 13. Efecto del compuesto RGM8-18 sobre la actividad de TRPM8.

En la *Figura 13* la relación P_2/P_1 indica el grado de bloqueo del canal, en este caso se aprecia que, si bien el compuesto RGM 18 es muy eficaz bloqueando TRPM8 a concentraciones de 10 μM , cuando se reduce la concentración, esta capacidad de bloqueo disminuye drásticamente. Por otra parte, la relación P_3/P_1 indica la reversibilidad de la acción bloqueante ya que en el tercer pulso se aplica solo el agonista. En este caso, se observa que el compuesto RGM18 a concentraciones mayores de 1 μM se elimina lentamente y tiene todavía efecto bloqueante.

El compuesto RGM8-51 se ensayó en primer lugar a una concentración de 10 μM , y como podemos ver en la *Figura 14* no producía el bloqueo del canal al 100%.

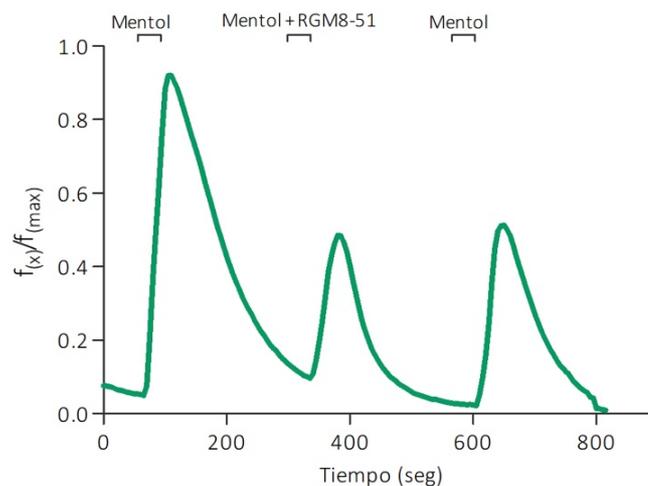


Figura 14. Medida del bloqueo de TRPM8 por RGM8-51 a 10 μM .

En base a estos resultados, se decidió aumentar la concentración del compuesto a 30 μM , En base a los resultados de bloqueo obtenidos y a la falta de solubilidad del compuesto a esas concentraciones se realizó un ensayo a menor concentración, 1 μM , para intentar obtener una correlación entre la dosis y la respuesta observada.

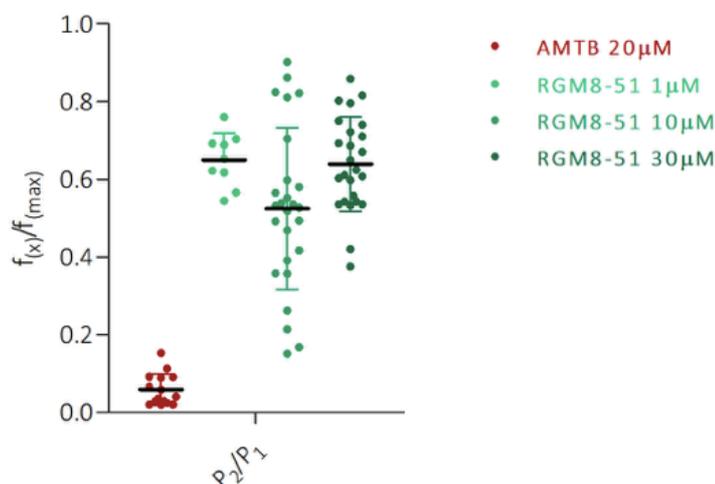


Figura 15. Efecto del compuesto RGM8-51 sobre la actividad de TRPM8. Los puntos representan los valores de fluorescencia y la raya negra la media de todos los valores a cada concentración.

Como se puede observar en la *Figura 15*, hay una cierta correlación entre la respuesta obtenida y la concentración del compuesto a bajas concentraciones, entre 1 y 10 μM , pero cuando se intenta aumentar la concentración del compuesto no se obtienen buenos resultados probablemente debidos a una baja solubilidad en el buffer de ensayo.

5.4 Caracterización de la citotoxicidad mediante MTT

El estudio de la toxicidad de cada uno de estos dos compuestos es necesario para su aplicación como posibles fármacos. El procedimiento utilizado podemos verlo detallado en el apartado 4.5 de Materiales y Métodos.

Se realizaron ensayos MTT en las células HEK-CR1 para ambos compuestos y también para el AMTB, puesto que es el bloqueador de referencia y podemos así comparar los resultados obtenidos. Las concentraciones utilizadas son 1, 10 y 100 μM tanto para los compuestos como para el AMTB. Se utilizó como control positivo de viabilidad celular, DMSO (vehículo) a una concentración no tóxica para las células, 1%; y como control negativo el mismo compuesto a una concentración letal para las células, DMSO al 10%. En el caso de los compuestos como aplicamos 1 μl en los 100 μl de medio, el DMSO tiene una concentración final de 1%.

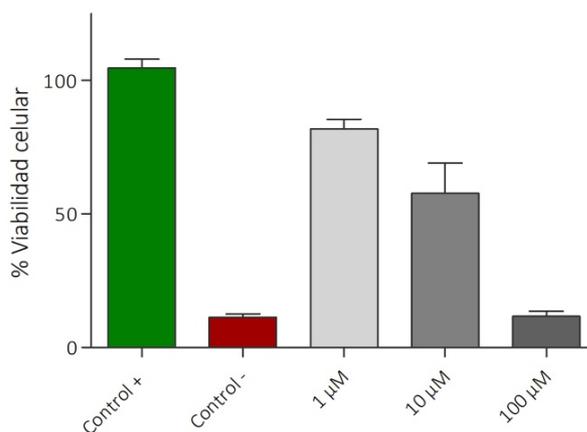


Figura 16. Viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de AMTB de 1 a 100 μM.

Podemos observar en la Figura 17 que ni RGM8-18 ni RGM8-51 mostraron citotoxicidad en el sistema celular a ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, el AMTB (Figura 16) a 10 μM muestra signos de toxicidad, y a 100 μM, el valor de viabilidad celular es igual al del control negativo.

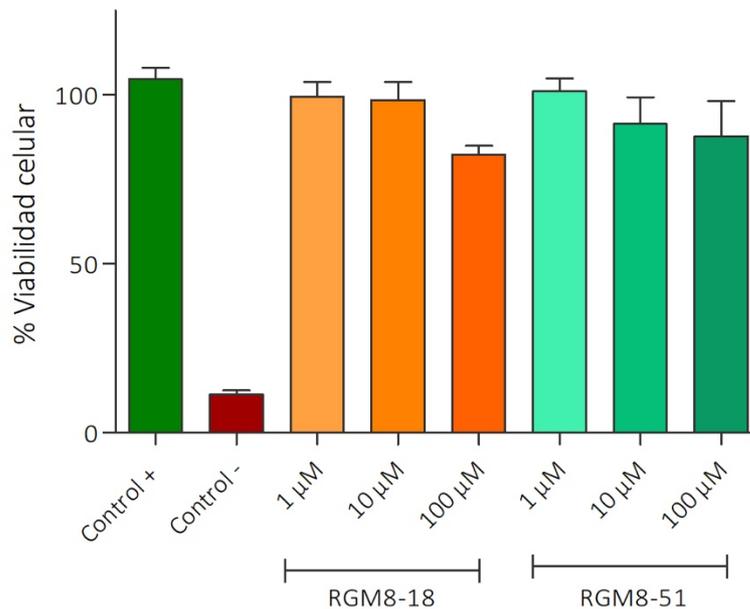


Figura 17. Viabilidad celular en presencia de concentraciones crecientes de RGM8-18 o RGM8-51.

Por lo tanto, podemos concluir que los compuestos no son tóxicos para las concentraciones comprendidas en el rango de eficacia.

5.5 Experimentos *in vivo*

Los ratones con alodinia al frío inducida mediante el tratamiento con oxaliplatino fueron tratados con ambos compuestos a diferentes dosis.

En primer lugar, vemos en la *Figura 18* los resultados de administrar intraplantariamente el compuesto RGM8-18 a una dosis de 1 μg . El efecto más significativo se observa a los 30 min de inyectar el compuesto y permanece 1 hora aproximadamente. A los 120 minutos, el efecto sigue observándose, aunque en menor medida.

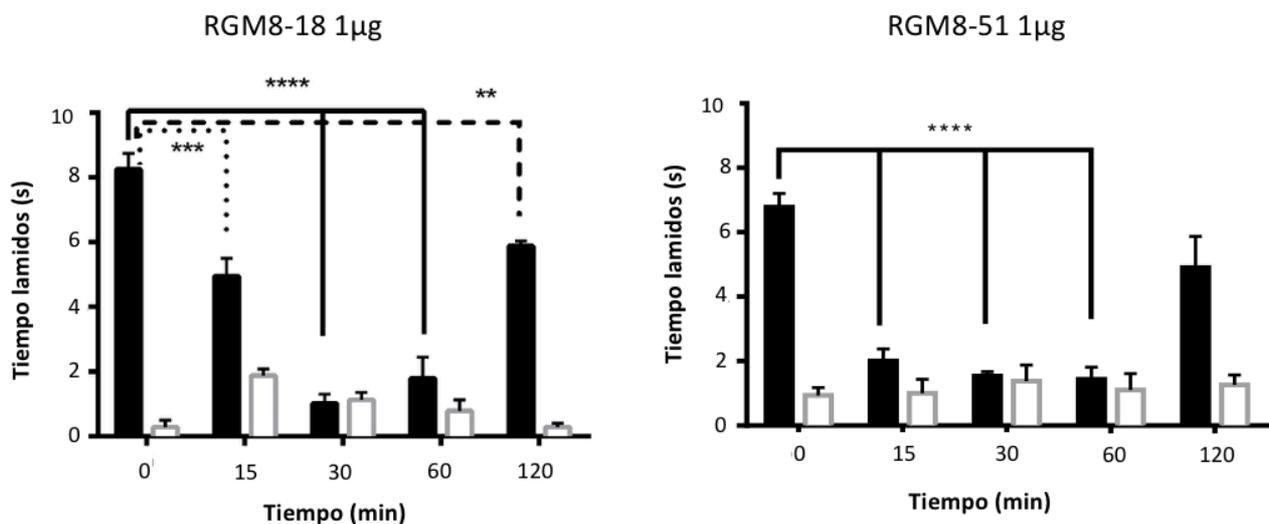


Figura 18. Efecto antihiperálgico de los compuestos RGM8-18 y RGM8-51 a 1 μg . Las barras blancas son los controles, que serían aquellos ratones a los que no se les induce alodinia, esto se puede ver en la medida basal que sería a tiempo 0, donde no hay respuesta. Las barras negras muestran los resultados de los ratones que han sido tratados con oxaliplatino y que han recibido cada uno de los compuestos.

La administración intraplantar del compuesto RGM8-51 a una dosis de 1 μg (*Figura 18*) produce una disminución significativa del tiempo de lamido desde los 15 min de administración, el efecto se mantiene durante 1 hora, y al cabo de 2 horas este efecto analgésico va desapareciendo.

Comparando el efecto de los dos compuestos a la misma concentración, podemos ver que, si bien los dos compuestos son igualmente eficaces a partir de 30 minutos después de la administración, el compuesto RGM8-51 actúa más rápidamente que el RGM8-18. En base a este resultado, se decidió disminuir la dosis de RGM8-51 a 0,1 μg para comprobar su eficacia a menores concentraciones.

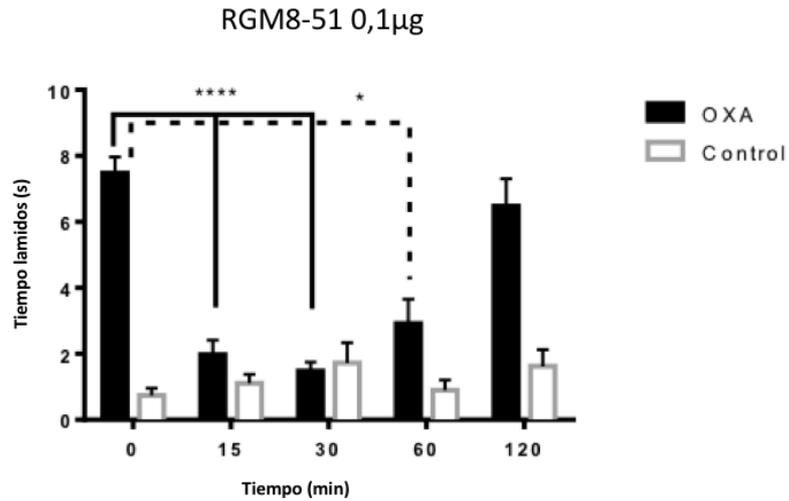


Figura 19. Efecto antihiperalgésico del compuesto RGM8-51 a una dosis de 0,1 μ g. Las barras blancas son los controles, que serían aquellos ratones a los que no se les induce alodinia, esto se puede ver en la medida basal que sería a tiempo 0, donde no hay respuesta. Las barras negras muestran los resultados de los ratones que han sido tratados con oxaliplatino y que han recibido cada uno de los compuestos.

En la *Figura 19* podemos ver que el efecto de este compuesto se mantiene a una dosis diez veces menor, teniendo un comportamiento similar al compuesto RGM8-18 a una dosis de 1 μ g.

5.6 Acoplamiento virtual (“Docking”)

La técnica del docking se basa en un estudio *in silico* que permite analizar las distintas conformaciones que adopta un ligando al acoplarse con la proteína, TRPM8 en nuestro caso. Dado que los dos compuestos tienen un anillo β -lactámico, los sitios de unión que hemos encontrado son similares.

Existen estudios previos de posibles sitios de unión para moléculas de estas características¹², previamente definidos en el laboratorio en donde se ha realizado este TFG. Debido a que no se disponía de una estructura a alta resolución del canal TRPM8, se empleó un modelo de este diseñado en base a la estructura del canal TRPV1 cuya estructura a alta resolución había sido publicada. Recientemente, se ha publicado la estructura a alta resolución de un canal TRPM8 procedente de *Ficedula albicollis* por lo que se ha utilizado esta estructura como punto de partida, originando el modelo tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. En esta estructura, el residuo Tyr745 (implicado en el sitio de unión al mentol) posee una nueva localización en la proteína, situándose en la parte central de S1, en contraposición al modelo previo, donde Tyr745 se localizaba en S2¹³.

El docking global para el compuesto RGM8-18 determinó 658 clústers sobre 800 intentos, es decir, posibles sitios de unión al receptor. Por otro lado, para RGM8-51 se obtuvieron un total de 644 clústers. Se estudiaron todos ellos, y se establecieron dos posibles sitios de unión a TRPM8 que presentaban buenas energías de unión además de coincidir para ambos compuestos.

Tabla 3. Energías de unión de los compuestos. Media de las energías de unión de todos los clústers donde aparece el mismo sitio de unión.

	Energías de unión kcal/mol	
	RGM8-18	RGM8-51
Sitio 1	7,05	6,58
Sitio 2	6,39	6,40

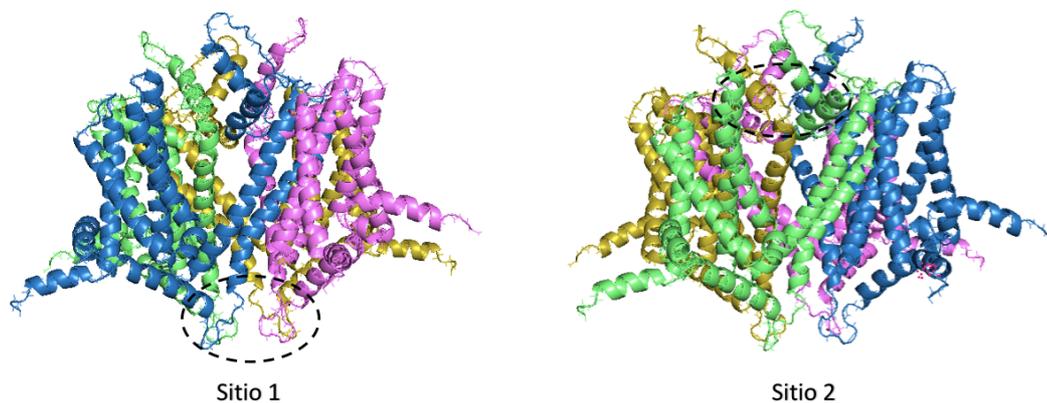


Figura 20. Localización de los dos posibles sitios de unión en TRPM8. Vemos las cuatro cadenas, cada una de ellas de un color. El sitio 1 localizado en la región intracelular y el sitio 2 en la región extracelular.

El primer sitio de unión (Figura 21) fue elegido por varias razones, en primer lugar, porque se encontraba en 10 clústers para RGM8-18 y en 8 para RGM8-51. Además, todos estos clústers poseen buenas energías de unión, y los residuos implicados coinciden la mayoría de ellos para ambos compuestos como podemos ver en la Tabla 4.

Tabla 4. Residuos implicados en la unión de los ligandos al Sitio 1.

	Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena D
RGM8-18	Tyr981, Thr982	Thr982	Tyr981	Val983, Ile985
RGM8-51	Ile985	Thr982, Ile985	Tyr981	Tyr981, Ile985

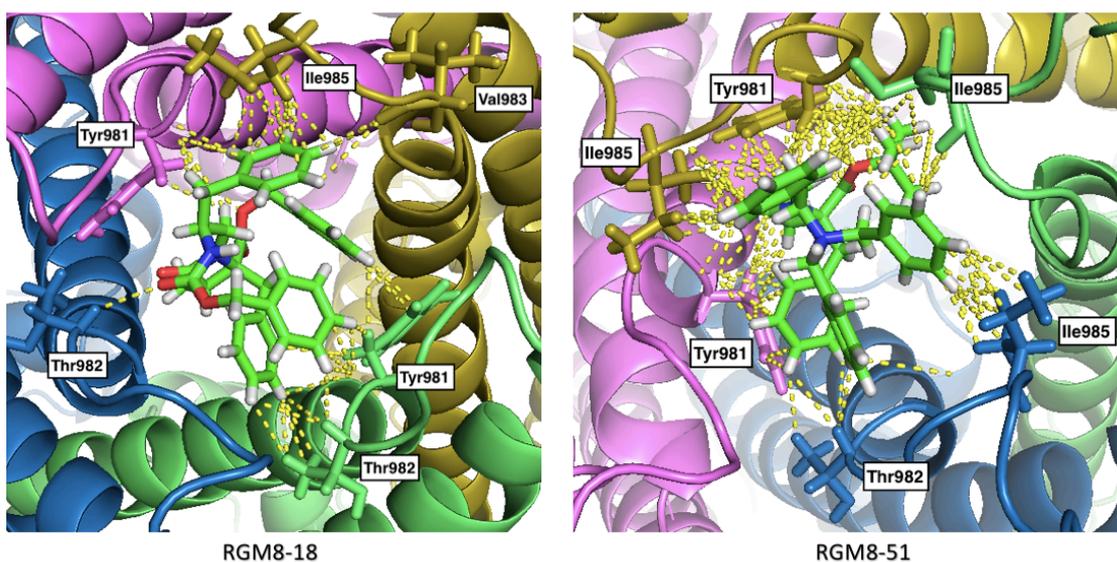


Figura 21. Sitio 1. En amarillo aparecen las interacciones hidrofóbicas que hay entre cada uno de los ligandos y las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión.

El segundo sitio (*Figura 22*), cuya energía media de unión podemos observar en la *Tabla 3*, se encontró en 12 y 22 clústers, para RGM8-18 y RM8-51 respectivamente. En la *Figura 20* podemos ver que este sitio está localizado en la región extracelular y no en el interior del poro como el sitio 1. Además, en este caso solo están implicadas 2 de las 4 cadenas que conforman el canal.

Tabla 5. Residuos implicados en la unión de los ligandos al Sitio 2.

	Cadena A	Cadena D
RGM8-18	Leu909	Gln914, Leu959, Tyr963
RGM8-51	Leu909, Phe912	Leu959, Tyr963

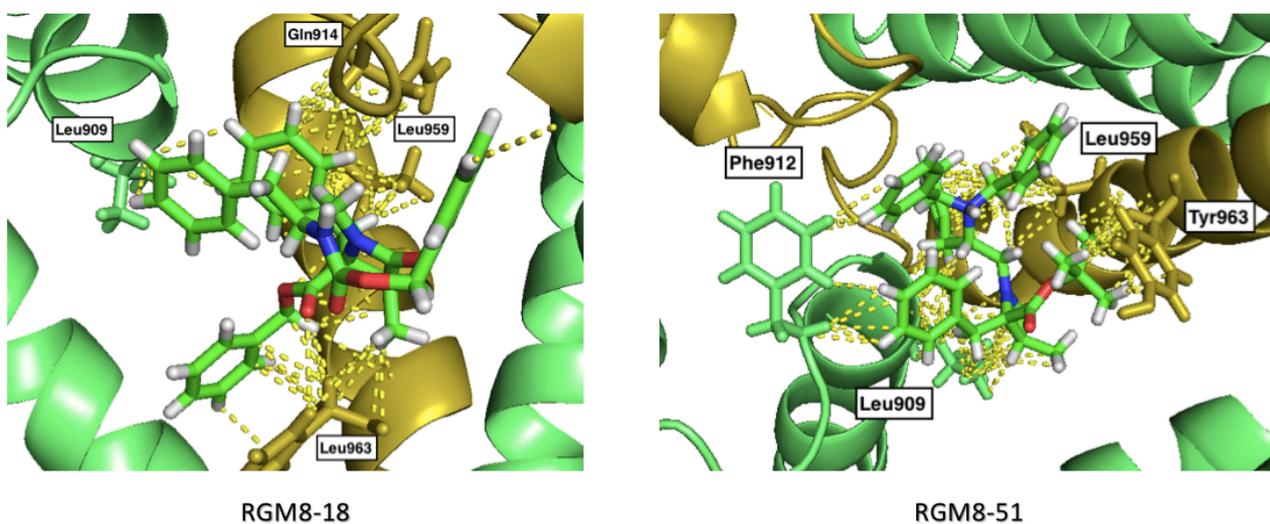


Figura 22. Sitio 2. En amarillo aparecen las interacciones hidrofóbicas que hay entre cada uno de los ligandos y las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión.

Además, se calculó el logP (logaritmo del coeficiente de partición) utilizando el programa Marvin para tener una idea del carácter hidrofóbico de estas moléculas. Fijándonos en los valores del logP en la *Tabla 6*, estas moléculas podrían acceder al Sitio 1 atravesando la membrana celular, accediendo así al poro.

Tabla 6. LogP para cada uno de los compuestos.

	LogP
RGM8-18	6,99
RGM8-51	6,67

5. Discusión

El canal TRPM8 se ha visto implicado en la alodinia al frío producida en condiciones inflamatorias y neuropáticas³¹, así como en tratamientos farmacológicos quimioterapéuticos derivados de platino²⁴.

El sistema celular utilizado, HEK-CR1, es una línea que expresa de manera estable la diana terapéutica que queremos estudiar. El uso de ensayos celulares supone una buena elección a la hora de realizar cribados, puesto que se trata de una aproximación rápida y económicamente viable.

Los ensayos fluorimétricos utilizando el equipo del POLARstar fueron una buena herramienta a la hora de realizar el cribado de la quimioteca obtenida del grupo de Rosario González Muñiz. Se trata de un ensayo con una alta reproducibilidad, simple y con un rápido análisis de datos. Dos de los 72 compuestos mostraron tener una buena potencia, obteniéndose unas IC_{50} de 6,37 y 2,78 μ M para los compuestos RGM8-18 y RGM8-51, respectivamente. Los datos obtenidos en los distintos ensayos validan a esta técnica como una plataforma de cribado idónea para buscar compuestos moduladores de TRPM8. Es importante resaltar que esta técnica se utiliza principalmente para identificar compuestos en las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos.

La técnica de Imagen de Calcio es más sensible que el ensayo fluorimétrico, puesto que en este ensayo se seleccionan las células y se observa la respuesta de estas individualmente, sin embargo, en la anterior se obtienen valores promedio de todas las células que tenemos en el pocillo. Además, esta técnica ha sido útil para estudiar la desensibilización del canal³², ya que los tres pulsos de mentol de 30 segundos cada uno, dieron como resultado una respuesta cada vez menor. Esto es importante tenerlo en cuenta a la hora de analizar los resultados, en lugar de representar en las gráficas los niveles de fluorescencia directamente se representa la relación entre los picos. Esta técnica a su vez permitió corroborar el efecto antagonista del compuesto RGM8-18 a una concentración de 10 μ M, que mostró una eficacia similar al control negativo del AMTB. Por otro lado, hubo problemas con el compuesto RGM8-51, puesto que a una concentración de 10 μ M bloqueaba al canal en torno al 50%, por esto se incrementó la concentración a 30 μ M. A una mayor concentración, el compuesto presentaba un menor porcentaje de bloqueo, lo cual carece de sentido, pero cuando nos fijamos en la disolución a pesar de ser homogénea era bastante opaca. RGM8-51 parece tener problemas de solubilidad

a concentraciones mayores de 10 μM en el buffer HBSS, y por lo tanto esta puede ser una de las razones por las que a una mayor concentración obtenemos un menor porcentaje de bloqueo de TRPM8. Sin embargo, entre las concentraciones de 1 y 10 μM si se observa un mayor porcentaje de bloqueo a mayor concentración. Deberían realizarse más experimentos con el fin de caracterizar de una manera más fiable la actividad de este compuesto.

En el desarrollo de un fármaco es importante determinar su posible toxicidad para poder continuar con el ensayo. En este sentido, los resultados obtenidos mediante el MTT permiten concluir que los agentes químicos seleccionados podrían ser candidatos para su posterior desarrollo, ya que ninguno de los dos resulta tóxico en el rango de concentraciones en las que son efectivos.

Mediante el acoplamiento virtual se han encontrado dos posibles sitios de unión a TRPM8, el sitio 1, localizado en el poro de la proteína, además de presentar una buena energía de unión para ambos ligandos (*Tabla 3*), podría tratarse de un mecanismo de bloqueo, pues al estar ocupando la cavidad del poro, impediría el paso de iones Ca^{+2} a través de este. Sin embargo, es necesario preguntarse cómo han accedido estas moléculas hasta esta posición. Existen dos posibles opciones, una de ellas que, por la hidrofobicidad, estas sean capaces de atravesar la membrana uniéndose a la parte intracelular del poro; la segunda posibilidad, sería atravesando el poro cuando el canal se encuentra abierto. Los valores de logP para ambos compuestos (*Tabla 6*), indican que pueden pasar a través de la membrana celular para acceder al sitio de unión y no necesariamente a través del poro. Sería necesario realizar experimentos adicionales que nos permitan distinguir entre las dos posibilidades.

Por otra parte, el sitio 2 se localiza en la parte extracelular del canal, lo que facilitaría la unión del compuesto. Al no estar localizado próximo al sitio de unión a mentol descrito en el último estudio de este canal¹³, podría tratarse de un modulador alostérico.

Los experimentos in vivo han permitido caracterizar el efecto de estos compuestos en un modelo animal con alodinia al frío. Los resultados muestran que tanto RGM8-18 como RGM8-51 pueden ser buenos candidatos para comenzar estudios en Fase Clínica con la finalidad de llegar al mercado como tratamiento para la alodinia que desarrollan numerosos pacientes tratados con Oxaliplatino. Además, entre ambos destacaríamos el RGM8-51 ya que con una dosis de 0,1 μg muestra una disminución significativa con respecto a las medidas basales.

6. Conclusiones y proyección futura

En cuanto al estudio de RGM8-18 y RGM8-51 podemos determinar las siguientes conclusiones:

- Los compuestos seleccionados a partir de una quimioteca de β -lactamas, RGM8-18 y RGM8-51, mostraron unas IC_{50} en concentraciones de rango micromolar.
- El compuesto RGM8-18 ha demostrado ser más efectivo y con un comportamiento más estable en la técnica de imagen de calcio.
- Por lo contrario, en cuanto a los ensayos in vivo, el compuesto RGM8-51 ha demostrado tener una mayor efectividad analgésica en los ratones con alodinia al frío inducida por oxaliplatino.
- Por lo tanto, estas β -lactamas proporcionan una nueva base para desarrollar moduladores de TRPM8 para tratar diferentes patologías asociadas a la disfunción de este canal iónico.

Este trabajo constituye la primera etapa en el desarrollo de moléculas con una posible aplicación farmacológica para el tratamiento de diferentes patologías en las que están implicadas la diana terapéutica, en este caso, el canal iónico TRPM8. La siguiente etapa consistiría en descubrir el mecanismo de acción de estos dos compuestos, que podría realizarse con la ayuda de técnicas electrofisiológicas, el Patch Clamp permitiría estudiar la cinética de apertura y cierre del canal iónico. Mediante esta técnica podemos saber si el bloqueo se produce con el canal abierto o cerrado. Para el canal TRPV1 (Receptor de potencial transitorio vanilloide 1) han sido descritos compuestos antagonistas de canal abierto³³, y esto podría estar ocurriendo en el Sitio 1. Los compuestos en el Sitio 1 se localizan en el interior del poro, por lo tanto, si son bloqueadores de canal abierto cabría la posibilidad de que entraran por el poro y consiguiesen así bloquearlo.

Además, sería de gran interés una vez se ha visto que los compuestos son efectivos en el modelo animal del ratón, realizar ensayos en un modelo animal superior y así ver si el compuesto sigue siendo efectivo en el rango de concentraciones ensayado.

Bibliografía

1. Benemei, S., Patacchini, R., Trevisani, M. & Geppetti, P. TRP channels. *Curr. Opin. Pharmacol.* **22**, 18–23 (2015).
2. Nilius, B. & Owsianik, G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* **12**, 218 (2011).
3. Zheng, J. Molecular Mechanism of TRP Channels. *Compr Physiol* **3**, 221–242 (2013).
4. Kim, J.-B. Channelopathies. *Korean J. Pediatr.* **57**, 1 (2014).
5. Hellmich, U. A. & Gaudet, R. Structural biology of TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* (2014). doi:10.1007/978-3-319-05161-1_10
6. Yang, J. W. *et al.* Recent advances of animal model of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. Exp. Nephrol.* **0**, 0 (2018).
7. Nilius, B. TRP channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1772**, 805–812 (2007).
8. Liu, Z. *et al.* TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1871–1881 (2016).
9. Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I. & Ferrer-Montiel, A. Trafficking of Thermo TRP channels. *Membranes (Basel)*. **4**, 525–564 (2014).
10. Vay, L., Gu, C. & McNaughton, P. A. The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 787–801 (2012).
11. Asuthkar, S., Velpula, K. K., Elustondo, P. A., Demirkhanyan, L. & Zakharian, E. TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells. *Oncotarget* **6**, 17221–36 (2015).
12. De La Torre-Martínez, R. *et al.* Synthesis, high-throughput screening and pharmacological characterization of β -lactam derivatives as TRPM8 antagonists. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
13. Yin, Y. *et al.* Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel. **4325**, 1–11 (2017).
14. Pérez De Vega, M. J., Gómez-Monterrey, I., Ferrer-Montiel, A. & González-Muñiz, R. Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. *J. Med. Chem.* **59**, 10006–10029 (2016).
15. Yee, N. S. Roles of TRPM8 ion channels in cancer: Proliferation, survival, and invasion. *Cancers (Basel)*. **7**, 2134–2146 (2015).
16. Pergolizzi, J. V., Taylor, R., LeQuang, J.-A. & Raffa, R. B. The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products. *J. Clin. Pharm. Ther.* 313–319 (2018).

doi:10.1111/jcpt.12679

17. Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X. & Gu, J. G. TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP2: distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* **106**, 3056–3066 (2011).
18. Lashinger, E. S. R. *et al.* AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am. J. Physiol. Physiol.* **295**, F803–F810 (2008).
19. Yudin, Y. & Rohacs, T. Regulation of TRPM8 channel activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **353**, 68–74 (2012).
20. Fernández-Peña, C. & Viana, F. Targeting TRPM8 for pain relief. *Open Pain J.* **6**, 154–164 (2013).
21. Weyer, A. D. & Lehto, S. G. Development of TRPM8 antagonists to treat chronic pain and migraine. *Pharmaceuticals* **10**, 1–9 (2017).
22. Jensen, T. S. & Finnerup, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* **13**, 924–935 (2014).
23. Dai, Y. TRPs and pain. *Semin. Immunopathol.* **38**, 277–291 (2016).
24. Naziroğlu, M. & Braidly, N. Thermo-sensitive TRP channels: Novel targets for treating chemotherapy-induced peripheral pain. *Front. Physiol.* **8**, 1–12 (2017).
25. Kono, T. *et al.* Oxaliplatin-induced neurotoxicity involves TRPM8 in the mechanism of acute hypersensitivity to cold sensation. *Brain Behav.* **2**, 68–73 (2012).
26. Colombo, E., Francisoni, S., Faravelli, L., Izzo, E. & Pevarello, P. Ion channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Future Med. Chem.* **2**, 803–842 (2010).
27. Wang, T., Collet, J.-P., Shapiro, S. & Ware, M. A. Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ* **178**, 1669–78 (2008).
28. Zhu, B. *et al.* Arylglycine derivatives as potent transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 2234–2237 (2013).
29. Hantute-ghesquier, A. & Prevarskaya, N. TRPM Family Channels in Cancer. 1–13 (2018). doi:10.3390/ph11020058
30. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* **89**, 271–277 (1986).
31. Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D. & Heppenstall, P. A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One* **4**, (2009).
32. Kühn, F. J. P., Kühn, C. & Lückhoff, A. Inhibition of TRPM8 by icilin distinct from

- desensitization induced by menthol and menthol derivatives. *J. Biol. Chem.* **284**, 4102–4111 (2009).
33. Vidal-Mosquera, M. *et al.* Triazine-based vanilloid 1 receptor open channel blockers: Design, synthesis, evaluation, and SAR analysis. *J. Med. Chem.* **54**, 7441–7452 (2011).