

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2020-21

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

---

# IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MODULADORES DE TRPM8

---

Autor: Marta Foronda García

Tutor académico: Dr. 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. Marta Foronda**

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 20 de junio de 2021.

Fdo.: Prof. Asia Fernández Carvajal

Dña. Alicia Medina Peris

## Resumen

El receptor de potencial transitorio subfamilia melastatina número 8 (TRPM8) es un termocanal polimodal catiónico no selectivo permeable a calcio. Es sensible a temperaturas suaves y a compuestos refrescantes naturales y sintéticos. Se expresa en varios tejidos del cuerpo humano, desempeñando importantes funciones fisiológicas. En neuronas sensoriales primarias de la vía somatosensorial media la termotransducción del frío. Debido a la ubicuidad del canal, un mal funcionamiento del mismo puede desencadenar diversas enfermedades. Aunque se ha caracterizado un heterogéneo grupo de moduladores y muchos de ellos muestran resultados prometedores en fase preclínica, pocos llegan a fase clínica. Una de las causas de la dificultad de aplicabilidad clínica puede radicar en la falta de traslación del modelo murino, el más utilizado en ensayos *in vitro*, al humano. Para determinar las posibles diferencias a la respuesta de moduladores entre el canal TRPM8 de humano (hTRPM8) y de rata (rTRPM8) en este trabajo se han estudiado la eficacia, potencia, selectividad y citotoxicidad de cuatro compuestos antagonistas ( $\beta$  – lactamas) y dos compuestos agonistas (mentol e icilina). Para ello se han llevado a cabo ensayos fluorimétricos y de viabilidad celular. Respecto a los antagonistas, los resultados obtenidos indican que la icilina presenta mayor afinidad por el canal rTRPM8 y el mentol por hTRPM8. En cuanto a los antagonistas, los 4 compuestos presentan mayor afinidad por rTRPM8. El compuesto 3 actúa como antagonista parcial del TRPM8 y presenta una mayor diferencia entre especies, resultando 16 veces más potente para rTRPM8. A altas concentraciones, estos compuestos presentan una ligera capacidad para activar el canal TRPV1, siendo el más potente el compuesto 1. Respecto a la toxicidad de los antagonistas, el compuesto 1 no es tóxico a ninguna de las concentraciones probadas, mientras que los compuestos 2, 3 y 4 son tóxicos a todas las concentraciones utilizadas, menos el compuesto 4 a  $1\mu\text{M}$  (100 % viabilidad). Pese a la similitud estructural entre rTRPM8 y hTRPM8, los resultados demuestran que existen diferencias en eficacia y potencia tanto con los agonistas mentol e icilina, como con los 4 antagonistas estudiados. Las diferencias existentes entre ambos ortólogos en cuanto a la eficacia y potencia de los moduladores estudiados, apoyan el empleo del modelo basado en hTRPM8 en estudios preclínicos.

## Palabras clave

hTRPM8, rTRPM8, canal iónico, fluorimetría, modulador

## Abstract

The transient receptor potential subfamily melastatin number 8 (TRPM8) is a non-selective calcium-permeable cationic polymodal thermo-channel. It is gated by mild temperatures and cooling natural or synthetic compounds. It is expressed in different tissues of the human body, performing important physiological functions. In primary sensory neurons of the somatosensory pathway, it mediates cold thermo-transduction. Due to the ubiquity of the channel, a malfunction might trigger various diseases. Although a heterogeneous group of modulators has been characterized and many of them show promising results in the preclinical phase, just a few of them reach clinical phases. One possible reason for this failure in clinical applicability may lie in the fact that there is a lack of translation from the murine model, the one most used in *in vitro* tests, to the human. In order to determine possible differences in the modulators responses between human TRPM8 (hTRPM8) and rat TRPM8 (rTRPM8), efficacy, potency, selectivity and cytotoxicity of four antagonist compounds ( $\beta$ -lactams) and two agonist compounds (menthol and icillin) were studied in this assay. Fluorometric and cell viability tests were carried out to assess those properties. Regarding the antagonists, the obtained results indicate that icillin has a higher affinity for the rTRPM8 channel and menthol for hTRPM8. Focusing on the antagonists, the 4 tested compounds have higher affinity for rTRPM8. Compound 3 acts as a partial antagonist of TRPM8 and shows the greatest species difference in potency, being 16 times more potent for rTRPM8 than for hTRPM8. These compounds show a slight capacity to activate the TRPV1 channel at high concentrations, being compound 1 the most potent of them all. Regarding the antagonists toxicity, compound 1 is not toxic at any of the tested concentrations while compounds 2, 3 and 4 are toxic at all used concentrations but compound 4 at 1  $\mu$ M (100% viability). Despite the structural similarities between rTRPM8 and hTRPM8, the obtained results show that there are differences in efficacy and potency for both the agonists menthol and icillin, and the 4 studied antagonists. The differences between the two orthologs, in terms of the efficacy and potency of the modulators studied, support the use of the hTRPM8 model in preclinical studies.

## Key words

hTRPM8, rTRPM8, ionic channel, fluorometry, modulator

## Glosario

- AMTB: (N-(3-Aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)benzamida hidrocloruro
- C/R: Curva Concentración – Respuesta
- Cryo-EM: Criomicroscopía electrónica
- cTRPM8: TRPM8 de pollo
- DAG: Diacilglicerol
- DMSO: Dimetil Sulfóxido
- EC<sub>50</sub>: Concentración Media Máxima Eficaz
- fTRPM8: TRPM8 de rana
- hTRPM8: TRPM8 de humano
- hTRPV1: TRPMV1 de humano
- IC<sub>50</sub>: Concentración Media Máxima Inhibidora
- IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato
- mTRPM8: TRPM8 de ratón
- MTT: 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
- PBS: Tampón fosfato salino
- PI(4,5)P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
- PLC: Fosfolipasas C
- rTRPM8: TRPM8 de rata
- SDS: Dodecilsulfato sódico
- TM: Segmento transmembrana
- *Trp*: Gen de TRP
- TRP: Receptores de potencial transitorio
- TRPA: Receptores de potencial transitorio anquirina
- TRPC: Receptores de potencial transitorio canónicos
- TRPM: Receptores de potencial transitorio melastatina
- TRPML: Receptores de potencial transitorio mucolipina
- TRPN: No-mechanoreceptor potential C channel
- TRPP: Receptores de potencial transitorio policistina
- TRPV: Receptores de potencial transitorio vaniloide
- TRPY: Receptores de potencial transitorio yeast

## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	Superfamilia de canales receptores de potencial transitorio .....	1
1.1.1.	Generalidades .....	1
1.1.2.	TRPs termosensibles .....	3
1.1.3.	Subfamilia TRPM .....	5
1.2.	Canal TRPM8.....	7
1.2.1.	Estructura y modulación .....	7
1.2.2.	Fisiología y patologías asociadas.....	11
2.	Antecedentes y objetivos.....	13
3.	Material y métodos.....	15
3.1.	Cultivo celular .....	15
3.2.	Preparación de compuestos y agonistas .....	17
3.2.1.	Compuestos.....	17
3.2.2.	Mentol.....	18
3.2.3.	Icilina .....	19
3.3.	Ensayos fluorimétricos .....	19
3.3.1.	Base teórica.....	19
3.3.2.	Procedimiento.....	21
3.3.3.	Análisis de datos.....	22
3.4.	Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT .....	24
3.4.1.	Base teórica .....	24
3.4.2.	Procedimiento.....	24
3.4.3.	Análisis de datos.....	25
4.	Resultados .....	25
4.1.	Ensayos fluorimétricos .....	25

4.2. Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT .....	28
5. Discusión .....	29
5.1. Ensayos fluorimétricos .....	29
5.2. Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT .....	33
5.3. Perspectivas futuras .....	33
6. Conclusiones.....	36
7. Bibliografía .....	37

# 1. Introducción

## 1.1. Superfamilia de canales receptores de potencial transitorio

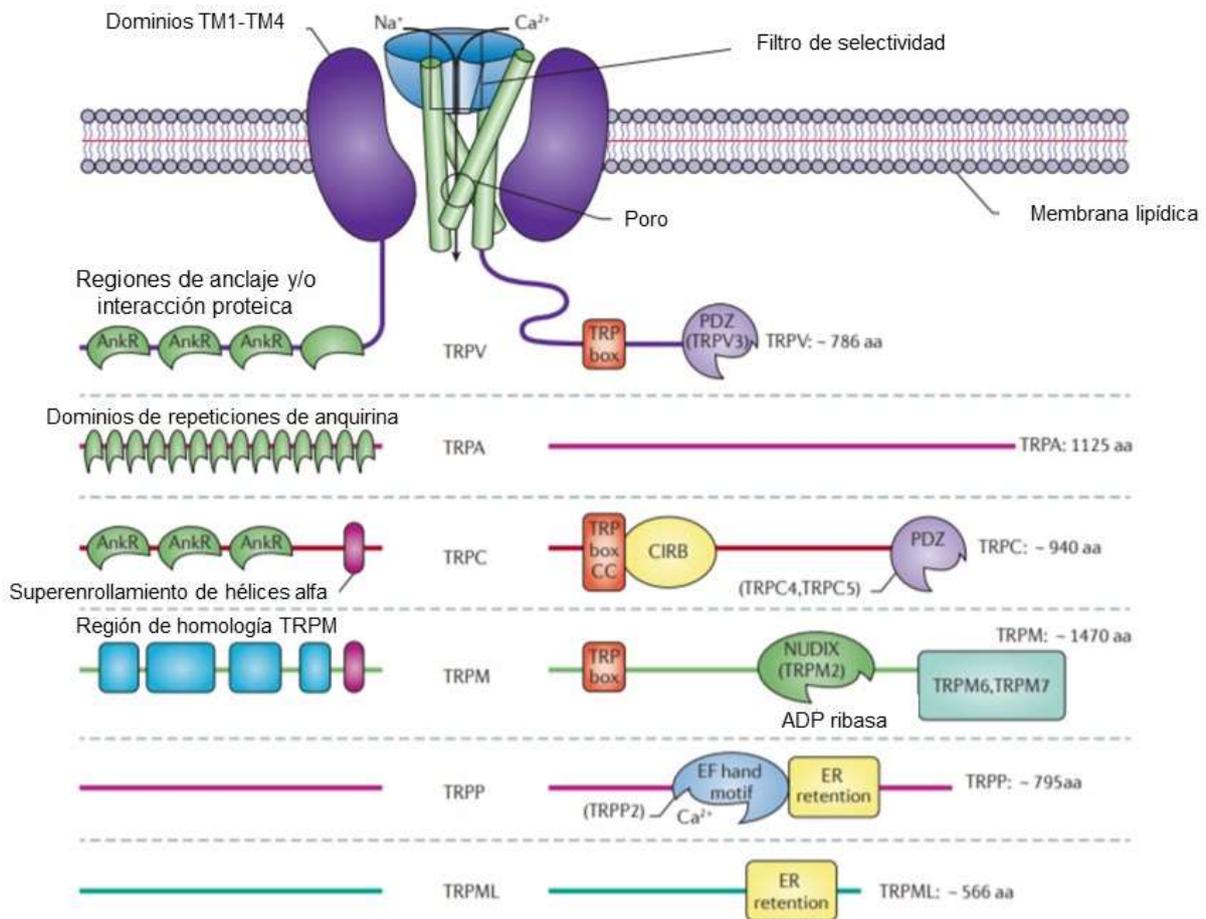
La superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP) se compone de un amplio y heterogéneo grupo de canales de membrana permeables a cationes. Están implicados en funciones fisiológicas asociadas a los sentidos, la supervivencia y el comportamiento de la especie. Actúan como sensores celulares ya que reaccionan a modificaciones en el ambiente, respondiendo a una extensa variedad de estímulos (Venkatachalam *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Generalidades

En la actualidad se han identificado un total de 30 tipos de TRPs, clasificados en ocho subfamilias según su filogenia. Éstas son: TRPC de “canónicos” o “clásicos” (TRPC1–7), homólogos al primer TRP identificado en mosca *Drosophila* y el primer canal encontrado en mamíferos; TRPV de “vaniloide” (TRPV1–6), recibe este nombre por el fundador de la subfamilia cuyo ligando es la capsaicina, un vaniloide; TRPA de “anquirina” llamado así por sus numerosas repeticiones de anquirina en el terminal amino; TRPM de “melastatina” (TRPM1–8), identificado inicialmente en melanocitos; TRPP de “policistina” (TRPP2, TRPP3, TRPP5), se relacionan con la enfermedad de riñón poliquístico; TRPML de “mucolipina” (TRPML1–3), que se caracteriza por presentar terminales amino y carboxilo cortos; TRPN, inicialmente llamado “No-mechanoreceptor potential C channel”, ausente en mamíferos y TRPY de “yeast”, presente en levaduras (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Rosasco y Gordon, 2018; Dietrich, 2019).

Aunque la homología de secuencia entre las diferentes subfamilias es baja y la arquitectura general difiere significativamente entre ellas (**Figura 1.1**), pueden identificarse semejanzas estructurales. Los TRPs son canales de membrana permeables a cationes monovalentes y/o calcio y se organizan en homo-tetrámeros, aunque también se han hallado hetero-tetrámeros puntuales. Cada subunidad está compuesta por 6 segmentos transmembrana (TM1 – TM6) de los cuales, los cuatro primeros (TM1 – 4), forman el dominio de detección de voltaje del canal. Variaciones en la secuencia aminoacídica en TM4 determinarán si la isoforma es dependiente o independiente de voltaje. Entre TM5 y TM6 se sitúa el dominio “loop-P” y estas tres regiones forman conjuntamente un poro cuya permeabilidad y selectividad variará dependiendo de la isoforma TRP. Tras el TM6, en el terminal carboxilo, se encuentra un dominio llamado “caja

TRP”, presente en todos los miembros de la superfamilia. La longitud de los terminales amino y carboxilo puede variar, así como la presencia/ausencia de motivos estructurales específicos, pero siempre se localizan intracelularmente (Froghi *et al.*, 2021; Tzagareli y Nozadze, 2020; Rosasco y Gordon, 2018).



**Figura 1.1:** Representación esquemática y general de los diferentes dominios representativos en los extremos C-terminal y N-terminal de los canales pertenecientes a las subfamilias TRPV, TRPA, TRPC, TRPM, TRPP, TRPML. TRPV, TRPA y TRPC presentan repeticiones de anquirina (AnKR), mientras que TRPP y TRPML poseen dominios de retención en retículo (ER Retention) y TRPM dominio NUDIX, sitio de unión de fosfohidrolasas (Modificado de Moran *et al.*, 2011).

Desde la caracterización del primer gen de TRP (*trp*) en mosca *Drosophila* en 1989 (Montell y Rubin, 1989), el número de publicaciones relacionadas con esta superfamilia de canales ha aumentado de forma exponencial. El motivo de este creciente interés viene dado por las numerosas enfermedades genéticas subyacentes a mutaciones en los *trp*. Los productos

aberrantes y las anomalías en su expresión pueden producir alteraciones cutáneas, sensoriales, esqueléticas, cardíacas, oculares o neuronales. Hasta la actualidad, se han descubierto 33 *trps* en humanos e identificado hasta 11 mutaciones en los mismos que pueden producir un abanico de 16 enfermedades. Es por esto que la comunidad científica estudia las diferencias estructurales entre los diversos TRPs e intenta asociar cada canal a procesos fisiológicos específicos. Comprendiendo mejor su morfología y funcionamiento, podrían encontrarse posibles dianas terapéuticas para las diversas fisiopatologías que pueden llegar a producir o a las que se asocian indirectamente (Dietrich, 2019; Flockerzi y Nilius, 2014).

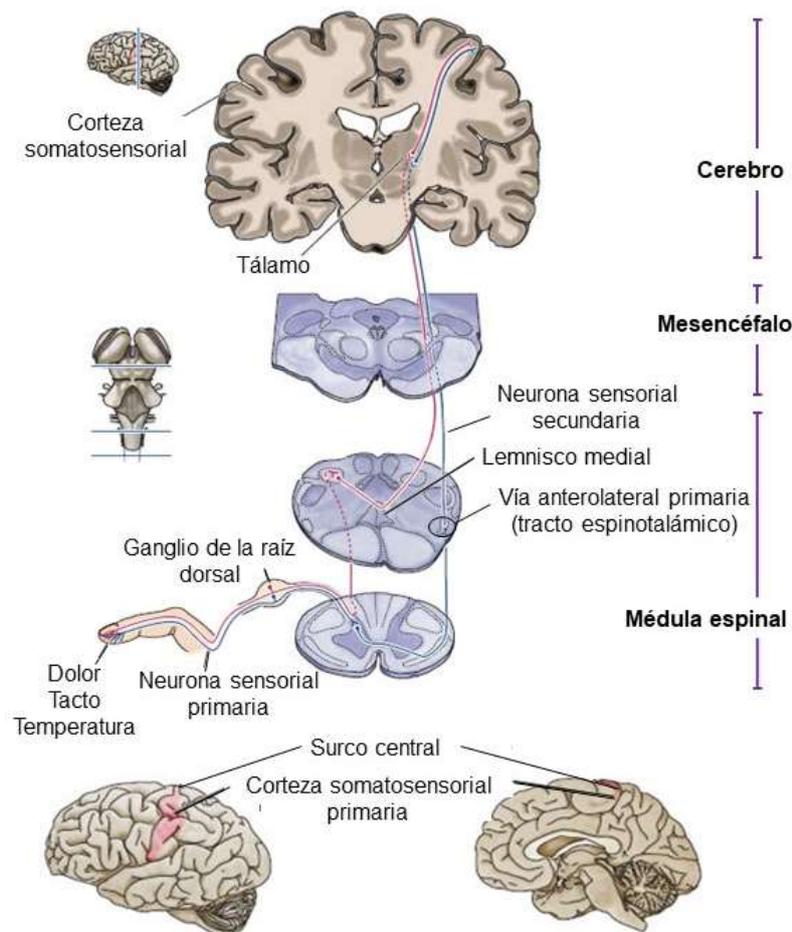
Tras analizar y comparar diversos estudios centrados en aspectos moleculares y fisiológicos, es razonable defender que los TRPs presentan un papel importante en la transducción sensorial térmica y nociceptiva, utilizando para ello diferentes mecanismos celulares. Los canales pueden encontrarse no solo en encéfalo y sistema nervioso, también en otros órganos como son corazón, próstata, testículos, ovarios, riñones, pulmones, bazo, hígado, intestino, placenta o útero, entre otros. Además, se ha identificado su presencia en diferentes líneas celulares, tanto neuronales como no neuronales (células de tejido muscular liso, endotelio vascular y varias células del sistema inmune). Debido a esta ubicuidad los TRPs toman parte en gran cantidad de procesos biológicos, algunos de ellos aún sin esclarecer (Froghi *et al.*, 2021; Tzagareli y Nozadze, 2020).

### 1.1.2. TRPs termosensibles

Dentro de la superfamilia de los TRPs, destacan los canales TRPs sensibles y dependientes de temperatura. Éstos reciben el nombre de termoTRPs y se han agrupado en función de su estímulo de activación, no de su filogenia, por lo que se encuentran TRPs de diferentes subfamilias. Son considerados los principales transductores moleculares activados por estímulos térmicos en el sistema somatosensorial de mamíferos (Wang y Siemens, 2015; Voets, 2014).

La sensibilidad térmica esta mediada por neuronas sensoriales de primer orden. Sus axones se encuentran principalmente en piel y mucosa, mientras que sus somas se localizan en el núcleo trigeminal o en los ganglios de las raíces dorsales, extendiendo sus conexiones hasta médula espinal. En condiciones de reposo, presentan potencial de membrana negativo gracias a la actividad de canales de potasio dependientes de voltaje. Cuando los termoTRPs perciben

modificaciones en temperatura, responden a estos cambios despolarizando la célula. Llegado a cierto umbral, se genera y propaga el potencial de acción a través de canales de sodio dependientes de voltaje. La señal se transmite a la neuronas sensoriales de segundo orden del asta dorsal y viaja por todo el circuito somatosensorial (**Figura 1.2**), transmitiendo el mensaje hasta tálamo y corteza cerebral para su posterior procesamiento (Voets, 2014).



**Figura 1.2:** Vía Somatosensorial. El canal TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales primarias. En presencia de estímulo, la célula se despolariza generando potenciales de acción. La señal se transmite a neuronas sensoriales secundarias y viaja por la vía anterolateral primaria. La información llega a corteza somatosensorial donde será procesada (modificado de Fitzpatrick, 2004).

Según Wang y Siemens (2015), para que un canal se considere termoTRP debe cumplir tres requisitos: ser sensible a estímulos térmicos y generar corrientes despolarizantes suficientemente robustas, expresarse en tejidos y células relevantes a la hora de detectar cambios en la temperatura y presentar evidencias de actividad termosensorial en estudios *in vivo*.

Cada uno de ellos responde a rangos concretos de temperatura, dentro de los umbrales fisiológicos, desde frío doloroso hasta calor extremo. Por ejemplo: TRPV1, TRPV2 y TRPV3 se activan a altas temperaturas; TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5 y TRPC5 a temperaturas cálidas; TRPM8 responde a temperaturas templadas y TRPA1 a frío nocivo (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020).

En mamíferos, pueden encontrarse en una gran variedad de tejidos, por lo que un mal funcionamiento de los mismos puede asociarse a diversas enfermedades. Aún existen incógnitas en los mecanismos subyacentes a la activación de los termoTRPs, pero debido a la cantidad de procesos fisiológicos en los que están involucrados se consideran objetivos potenciales en la industria farmacológica (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020).

### 1.1.3. Subfamilia TRPM

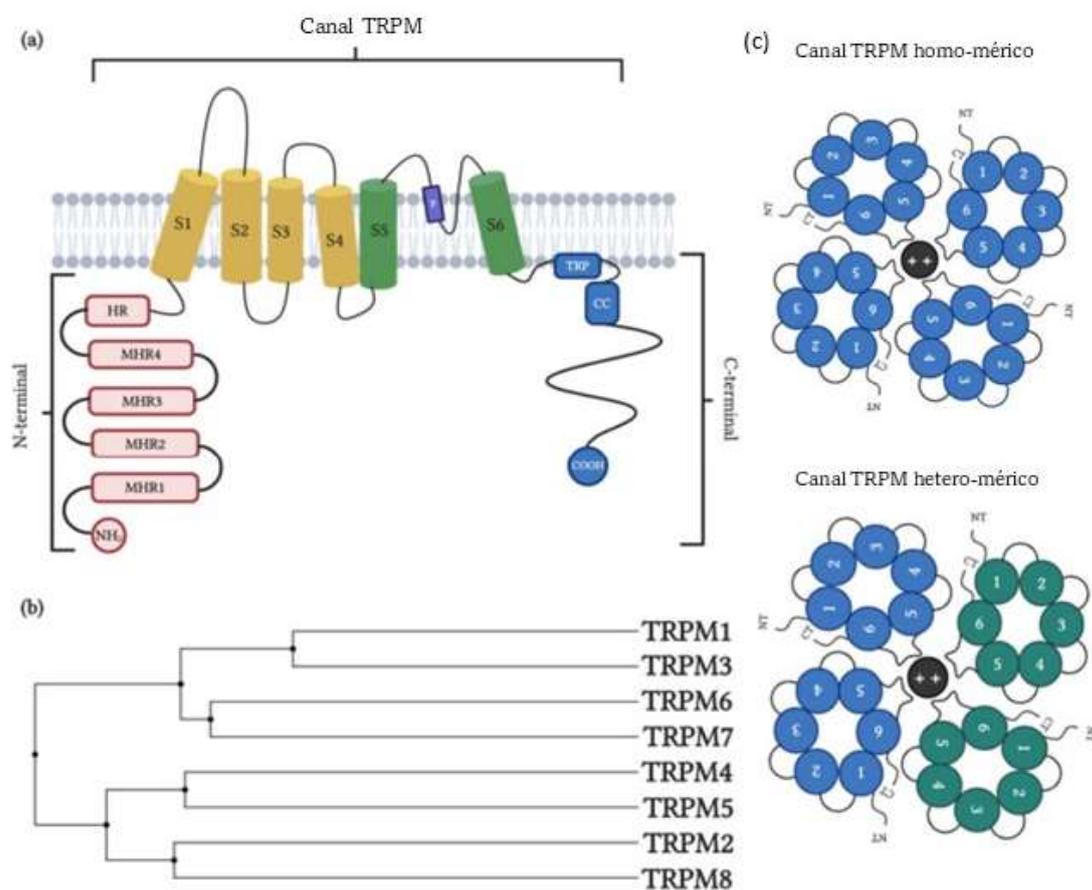
La subfamilia TRPM se considera una de las más diversas dentro de la superfamilia de los TRPs. Desde el descubrimiento del primer gen *TRPM1* en 1998 se han identificado un total de ocho miembros (TRPM1-TRPM8) (Jiménez *et al.*, 2020).

El dominio amino terminal de esta subfamilia de canales destaca por carecer de repeticiones de anquirina y el terminal carboxilo es significativamente más corto. Todos los miembros presentan cuatro regiones homólogas de melastatina y una región homóloga adicional situada justo antes del TM1. La bibliografía revisada sugiere que estos dominios se encargan de percibir los estímulos externos y favorecer la unión entre las distintas subunidades del canal. Por otro lado, se han encontrado indicios de que el TM4 participa en el mecanismo de activación por voltaje específico de los TRPMs. La secuencia aminoacídica de la “caja TRP” se encuentra altamente conservada dentro de la familia TRPM. Seguidamente se encuentra el dominio de superhélice (coiled-coil domain), que facilita la interacción entre las subunidades para formar el tetrámero y modular correctamente la apertura y cierre del poro. Además de estas características estructurales comunes para la subfamilia (**Figura 1.3.**), cada isoforma posee variaciones específicas (Jiménez *et al.*, 2020; Tsagareli y Nozadze, 2020).

De acuerdo a la homología del dominio superhélice, los TRPMs se pueden dividir en cuatro parejas (**Figura 1.3**): TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM6/ TRPM7 y TRPM4/TRPM5. Por otra parte, según su permeabilidad, se pueden agrupar en: muy permeables a calcio (TRPM3/TRPM6/TRPM7), no selectivos a cationes mono y divalentes (TRPM2/TRPM8) o

permeables solo a cationes monovalentes (TRPM4/TRPM5) (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Jiménez *et al.*, 2020).

Los canales de esta subfamilia también se encuentran altamente distribuidos por todo el organismo, expresándose en diferentes tejidos. Además, están implicados en procesos patológicos asociados con la inflamación, dolor neuropático, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, posicionándose como interesantes dianas terapéuticas (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Tzagareli y Nozadze, 2020).



**Figura 1.3:** (a) Estructura general de una subunidad de la subfamilia de canales TRPM. Se observan las regiones de homología de melastatina (MHR) y la región homóloga (HR) en el N-terminal; los seis segmentos transmembrana (S; en verde aquellos que forman el poro del canal) y, en el C-terminal, el dominio de la caja TRP (TRP) y el dominio superhélice (CC). (b) Representación del árbol filogenético de la subfamilia de los TRPMs. (c) Representación esquemática de un TRPM homotetramérico y heterotetramérico (modificado de Jiménez *et al.*, 2020).

Este trabajo de fin de máster (TFM) se centra en la caracterización de moduladores del canal TRPM8.

## **1.2. Canal TRPM8**

El canal TRPM8 es un canal catiónico no selectivo permeable a calcio sensible a temperaturas suaves (>28°C). Debido a su naturaleza polimodal, también reacciona a despolarizaciones del potencial de membrana, cambios en la osmolaridad extracelular y a agentes refrescantes sintéticos y naturales como son la icilina y el mentol. Además, algunos lípidos, proteínas y hormonas fisiológicas se han identificado como agonistas endógenos para el canal (Iftinca y Altier, 2020; González-Muñiz *et al.*, 2019).

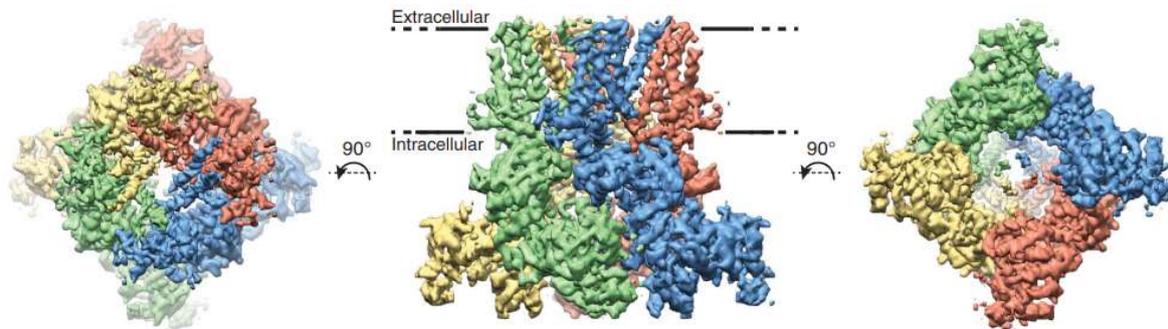
En humanos, el TRPM8 se codifica en la región 2q37.1 del cromosoma 2 y el *trpm8* se compone de 102.124 bases y contiene 25 exones. Inicialmente (2001), el gen se identificó gracias a una genoteca de ADN de próstata humana y se desconocía su función (Tsavaler *et al.*, 2001). Más tarde pudo obtenerse la secuencia genética del TRPM8 en otras especies como son en rata (McKemy *et al.*, 2002), ratón (Peier *et al.*, 2002) y pollo (Chuang *et al.*, 2004). Fue en 2007 cuando se descubrió su importancia en la transducción de la sensibilidad al frío (Dhaka *et al.*, 2007). Hoy en día se han caracterizado varias de sus funciones fisiológicas y existen evidencias de su expresión en tejidos diversos como son el cardíaco, vascular, pulmonar, placenta, ocular, hígado, piel y sistema nervioso (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; García-Ávila e Islas, 2019; Almaraz *et al.*, 2014).

Se ha identificado la presencia del canal TRPM8 en una amplia población de neuronas sensoriales primarias, tanto del tipo C amielínicas como Aδ ligeramente mielinizadas, que comparadas con otras neuronas aferentes, presentan diferencias significativas en la función y fenotipo neuroquímico. Sus terminaciones inervan zonas claves en la mediación de sensaciones de frío y dolor. En esta población neuronal, el TRPM8 desempeña la función específica de termoTRPM8 y se considera potencial responsable de una amplia gama de funciones sensoriales ligadas a estos estímulos (Almaraz *et al.*, 2014).

### **1.2.1. Estructura y modulación**

La estructura y actividad del canal TRPM8 aún presentan incógnitas para la comunidad científica. Sin embargo, estudios realizados mediante microscopía crioelectrónica (cryo-EM;

**Figura 1.4)** han conseguido esclarecer algunos aspectos de su arquitectura y cómo ésta afecta a su modulación (Diver *et al.*, 2019).



**Figura 1.4:** Reconstrucción del canal TRPM8 por criomicroscopía electrónica vista desde el plano extracelular (izquierda), plano de membrana (centro) y plano citosólico (derecha) (Yin *et al.*, 2018).

La hipótesis más generalizada es que el canal TRPM8 puede encontrarse en dos estados de inactivación diferentes: bloqueado por antagonista o desensibilizado por presencia de agonista o calcio, ion que posee un lugar de unión específico en el canal. El estado de desensibilización se adquiere tras una exposición prolongada a activador. Aunque el ligando permanezca unido en el bolsillo de unión del canal, el poro se encuentra cerrado impidiendo el flujo de iones a través de él (Diver *et al.*, 2019; Pérez de la Vega *et al.*, 2016).

Independientemente de la naturaleza activadora o inhibitoria del ligando, se ha demostrado que el bolsillo de unión se adapta a la estructura del modulador, determinando la afinidad de la unión. En decir, dos moduladores diferentes interactúan con el mismo bolsillo, pero se acoplan de diferente forma y orientación gracias a la reorganización de los TMs que delimitan la cavidad. Aún no se ha conseguido una descripción precisa de las orientaciones de los moduladores una vez unidos al TRPM8 (Diver *et al.*, 2019).

A pesar de las limitaciones de la técnica, se ha observado que la estructura general del canal en su estado libre de ligando se mantiene inalterable ante la unión de un antagonista. Esto sugiere que las moléculas inhibitorias se unen al bolsillo y bloquean el canal en su estado de reposo sin producir grandes cambios estructurales (Diver *et al.*, 2019).

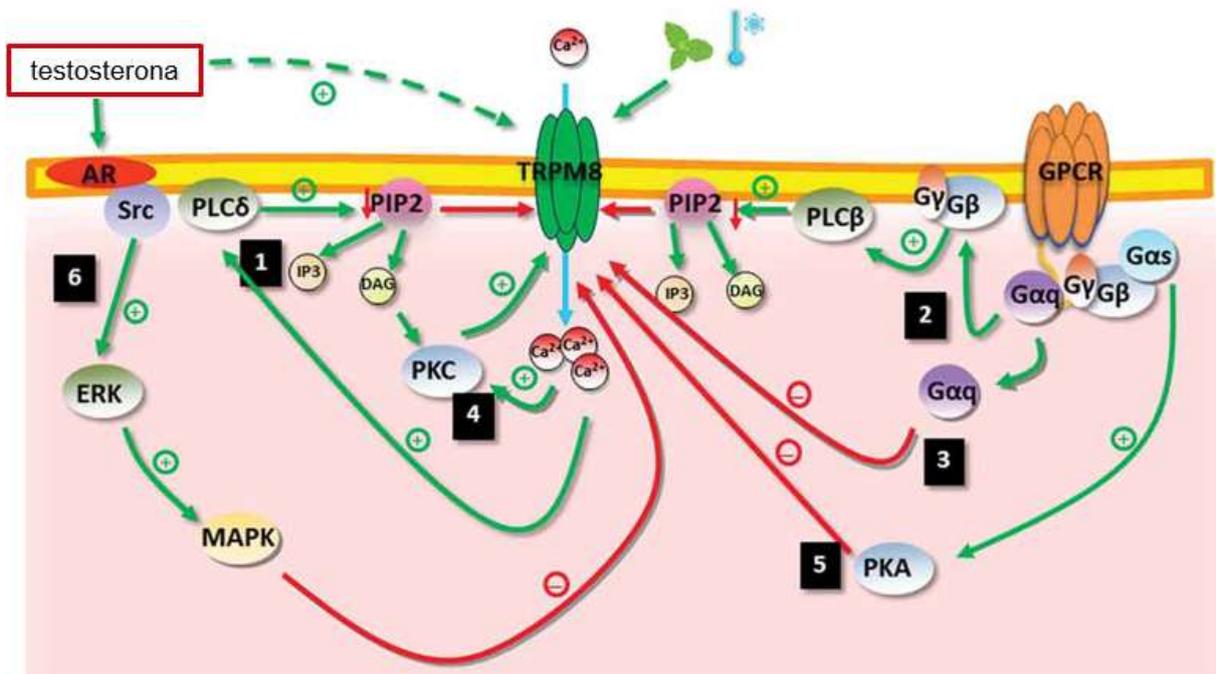
Se han identificado diferencias conformacionales cuando el canal se encuentra desensibilizado por agonista. Entre los cambios observados se encuentran los diferentes

grados de inclinación de los TM1 – TM4 y del dominio TRP, así como la formación de un segmento de unión entre TM4 y TM5 en el estado de desensibilización. Debido a estas modificaciones se califica, no solo al TRPM8, sino a toda la subfamilia de los TRPMs, de “muy dinámicos” (Diver *et al.*, 2019).

Aunque la unión se produzca en el mismo bolsillo, los mecanismos de acción de cada modulador son específicos. Por ejemplo, si bien mentol e icilina son ambos agonistas, la respuesta del mentol se considera inmediata, mientras que la producida por icilina es retardada. Algunos autores indican que la icilina es calcio-dependiente y precisa de la unión del ion para activar al canal, ralentizando la respuesta. Paralelamente, la presencia de determinados aminoácidos en la estructura del canal confiere cierta afinidad por algunos compuestos. Por ejemplo, los aminoácidos Asn<sup>799</sup>, Asp<sup>802</sup> y Gly<sup>805</sup> en el TM3 se relacionan con la unión icilina – TRPM8 y su modificación no influye en la afinidad mentol – TRPM8. Además, Arg<sup>842</sup> se asocia con la activación del canal por mentol y frío, mientras que Tyr<sup>745</sup> y Tyr<sup>1005</sup> únicamente con mentol. Estos resultados sugieren que existen residuos específicos a ciertos moduladores y que su modificación afectaría solo al compuesto en cuestión (Diver *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2018; Chuang *et al.*, 2004).

Centrándonos en la actividad del canal, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) se ha caracterizado como principal agonista endógeno para TRPM8, crucial en su activación. La afinidad de esta unión aumenta ante la presencia de mentol o icilina. PI(4,5)P<sub>2</sub> interacciona con el canal a través del dominio TRP, produciendo cambios conformacionales que permiten la entrada de calcio a la célula a través del poro. Dependiendo del agonista se necesitará la presencia de diferentes cofactores, como el propio calcio, para que esto ocurra. Al aumentar la concentración de ion intracelular se activan diferentes fosfolipasas C (PLCβ, PLCδ4) sensibles a calcio que hidrolizan PI(4,5)P<sub>2</sub> en inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), comenzando así la cascada de señalización intracelular (**Figura 1.5**). Los artículos revisados sugieren que el flujo inicial de calcio, la propia unión del ion al canal y el agotamiento de PI(4,5)P<sub>2</sub> podrían ser eventos que desencadenan el estado de desensibilización (Tsagareli y Nozadze, 2020; Pérez de la Vega *et al.*, 2016; Chuang *et al.*, 2004).

Sin embargo, en la modulación del canal TRPM8 también pueden intervenir otras moléculas como: receptores acoplados a proteína, receptores de bradiquinina y diferentes quinasas (PKA, PKC, ERK) tal y como se muestra en la **Figura 1.5**.



**Figura 1.5:** Esquema de algunas de las vías de señalización implicadas en la regulación del TRPM8; en rojo inhibición y en verde activación y posterior desensibilización. 1) Activación de PLCδ4 por la entrada de calcio; 2) Estimulación de PLCβ por receptor acoplado a proteína G. 3) En respuesta a la estimulación del receptor de bradiquinina (B2R), Gαq se une directamente al canal; 4) DAG y calcio activan PKC, (activación y posterior desensibilización de TRPM8); 5) Receptores acoplados a proteína G activan PKA; 6) Activación directa o indirecta por testosterona. AR: receptor de andrógenos, DAG: diacilglicerol, ERK: quinasa regulada por señal extracelular, GPCR: receptor acoplado a proteína G, IP<sub>3</sub>: trifosfato de inositol, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol bifosfato, PKA: proteína quinasa A, PKC: proteína quinasa C, PLC: fosfolipasa C (Modificado de Iftinca y Altier, 2020).

Es imposible aislar y delimitar la actividad de un canal únicamente a un modulador o ruta de señalización puesto que varias de ellas pueden solaparse entre sí. Aunque en ciertas ocasiones un único estímulo sea capaz de activar, bloquear o desensibilizar el canal, normalmente se precisa la integración colaborativa de diversos eventos celulares concomitantes (Iftinca y Altier, 2020; Chuang *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Fisiología y patologías asociadas

En condiciones fisiológicas, la función principal del TRPM8 es actuar como sensor térmico, reaccionando a bajas temperaturas, induciendo la termogénesis y participando en la autorregulación del individuo (Liu *et al.*, 2020).

Gracias a los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados, se han caracterizado otras funciones en las que se ve implicado el canal. Por ejemplo, en el sistema genitourinario, se encarga de la contractibilidad de la vejiga y de percibir el llenado de la misma; en próstata, media la proliferación celular, apoptosis y secreción de iones y proteínas del epitelio prostático. En el sistema respiratorio, se encarga de iniciar el reflejo de la tos, de la constricción de las vías respiratorias y de aumentar la secreción mucosa como mecanismo protector en presencia de frío. En el sistema inmune, media respuestas anti y pro – inflamatorias, regulando la concentración de citocinas y además actúa como receptor metabólico modulando los niveles de insulina en sangre y mediando el flujo lacrimal en córnea (Liu *et al.*, 2020).

Debido a esta gran variedad de órganos y tipos celulares en los que se ha identificado la presencia de TRPM8, la alteración de su expresión o disfunción del canal tienen como resultado múltiples enfermedades.

Varios estudios experimentales relacionan el TRPM8 con la fisiopatología de la alodinia por frío, la hiperalgesia y el dolor. De lo que se deduce que el canal debe expresarse en la ruta nociceptiva. Esta sintomatología aparece ante una regulación positiva del canal por lesión mecánica neuronal, inflamación o efecto secundario de la quimioterapia (De Caro *et al.*, 2019).

Las migrañas son una de las formas más típicas de manifestación de dolor. Mutaciones puntuales en *trpm8* se asocian con una mayor susceptibilidad a padecer migrañas. Aunque no se han identificado la relación directa entre el canal y la enfermedad, sí se sabe de su implicación en la misma. Además, los pacientes que padecen alodinia suelen padecer también dolor de cabeza (Liu *et al.*, 2020; Pérez de la Vega *et al.*, 2016).

Algunos autores confirman que la presencia de agonistas específicos de TRPM8 tiene efecto analgésico, mitigando la hiperalgesia y dolor. El mismo efecto se ha observado en estudios *in vivo* mediado por la sobreestimulación del canal y su posterior desensibilización. Estos datos,

a priori contradictorios, confirman la teoría de que el TRPM8 tiene un papel crucial en la modulación del dolor neuropático (Jiménez *et al.*, 2020; De Caro *et al.*, 2019).

Fallos en la expresión y arquitectura del canal se han asociado con diferentes tipos de cáncer, dependiendo del tipo de tejido y línea celular en el que se encuentre (melanoma, cáncer de mama, de páncreas, pulmón, colon). Además, también se relaciona con la propia progresión, proliferación y migración del tumor. Sorprendentemente, algunos autores afirman que el TRPM8 puede tener un efecto protector en fases avanzadas de cáncer de próstata, pero en cáncer de mama aumenta la agresividad del mismo (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Iftinca y Altier, 2020; Jiménez *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Se han utilizado agonistas como tratamiento en pacientes con dermatitis para aliviar el prurito. Aunque en aquellos casos de enfermedad más severa, estos agonistas producen irritación y no son tan efectivos. Son precisos estudios más profundos en la implicación del TRPM8 en enfermedades de la piel (Liu *et al.*, 2020).

El TRPM8 también se considera objetivo de investigación a la hora de tratar enfermedades como asma, disfagia orofaríngea, broncoconstricción o tos crónica. Diferentes estudios muestran resultados contradictorios en cuanto al uso de mentol. En fumadores se ha demostrado que reduce la irritabilidad en garganta, sin embargo, una sobreexposición a agonista produce el colapso de las vías respiratorias o puede llegar a causar mayor irritación. También se han caracterizado antagonistas que sí reducen los síntomas (Jiménez *et al.*, 2020; De Caro *et al.*, 2019).

Tratamientos basados en agonistas han demostrado su eficacia para tratar el síndrome del ojo seco, pues la activación del canal aumenta el flujo lacrimal. Paralelamente, el uso de antagonistas se considera un potencial tratamiento para el síndrome de ojos llorosos o epífora (Pérez de la Vega *et al.*, 2016).

Debido al gran abanico de enfermedades producidas por anomalías en la función y expresión del canal, el TRPM8 se considera una importante diana terapéutica no solo para el tratamiento de estas patologías, si no también para su prevención. Los agonistas y antagonistas caracterizados hasta la fecha son un punto de partida a la hora de comprender mejor la modulación del canal y desarrollar así tratamientos más eficaces.

## 2. Antecedentes y objetivos

Los canales TRPs han sido objeto de estudio de la comunidad científica durante décadas. Actualmente, existe una amplia variedad de técnicas para profundizar tanto en aspectos funcionales como estructurales de esta superfamilia de canales. Esto ha permitido la identificación de un gran número de agonistas y antagonistas para el canal TRPM8, entre otros.

La alta ubicuidad e implicación fisiológica del TRPM8 conlleva que cualquier fallo en el funcionamiento del canal pueda derivar en diferentes condiciones patológicas. De esta manera, el TRPM8 se considera una potencial diana terapéutica. Un conocimiento profundo de su modulación facilitaría el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas. La búsqueda de moduladores selectivos para el canal tiene como fin el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades ligadas recientemente al TRPM8, reducción de efectos secundarios de fármacos actuales y la mejora de los mismos (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020).

Diferentes estudios han demostrado que tanto el bloqueo del canal por antagonista como la desensibilización mediante agonista son estrategias válidas para el desarrollo de nuevas terapias (De Caro *et al.*, 2019).

Entre los agonistas naturales destacan, el mentol (alcohol terpénico), la menta (monoterpeno), el eucaliptol (1,8-cineol) o el borneol (terpeno). Como agonistas sintéticos cabe mencionar la icilina, ciertas amidas terciarias y algunos derivados del mentol (Jiménez *et al.*, 2020; González-Muñiz *et al.*, 2019).

El mentol es el agonista más utilizado en el desarrollo de productos cosméticos y tratamientos tópicos. Se han realizado más de 200 ensayos clínicos utilizándolo en diferentes concentraciones para tratar un amplio abanico de patologías asociadas con el dolor, inflamación neurogénica e hiperalgesia. No obstante, solo han sido publicados resultados favorables derivados de dos ensayos clínicos: uno relacionado con el síndrome del túnel carpiano (NCT01716767) y otro con el tratamiento de la migraña (NCT01687101). Destacar el fármaco AVX-012 que ha completado ensayos clínicos fase I y II (NCT03162094) con éxito a la hora de tratar la sequedad ocular (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020; Pérez de la Vega *et al.*, 2016).

Aunque muchos de los otros compuestos mencionados han mostrado resultados prometedores en fases preclínicas, como con los casos de IGM-5 (De Caro *et al.*, 2019), WS-12 (tratamiento del cáncer de próstata, Sherkheli *et al.*, 2008) o cryosim-3 (tratamiento para el síndrome del ojo seco, Yang *et al.*, 2017) en la mayoría de los casos no llegan a realizarse ensayos clínicos fase 1. En otras ocasiones, los estudios se abandonan sin concluir, no se publican los resultados o, como en el caso de D-3263 (tratamiento del cáncer de próstata, Tolcher *et al.*, 2010), no se continúan los ensayos clínicos fase 2 (Fernández-Carvajal *et al.*, 2020).

En cuanto a los antagonistas, se ha identificado un gran grupo heterogéneo en la última década. Destacan los compuestos con grupos centrales acíclicos (amida, sulfonamida, urea, glicina, triptófano) y heterocíclicos (tiazoles, benzotioterpenos, bencimidazoles, isoquinolinas) a los que se les añaden como radicales grupos de anillos aromáticos (Bonache *et al.*, 2021).

De entre todos los antagonistas descritos, solo en dos de ellos se han completado ensayos fase 1 para estudiar su seguridad y tolerabilidad. Estos compuestos son PF – 05105679 (tratamiento del dolor inducido por frío medido con el “Cold Pressor Test”; Winchester *et al.*, 2014) y AMG – 333 (tratamiento de la migraña; Horne *et al.*, 2018). Debido a los severos efectos secundarios presentes en ambos compuestos, fueron desestimados y no se continuaron futuros ensayos clínicos (Bonache *et al.*, 2021, Fernández-Carvajal *et al.*, 2020).

A pesar de la diversidad existente en los moduladores del TRPM8 y el potencial que muestran muchos de ellos para tratar dolor crónico, hipersensibilidad al frío e inflamación neuropática, pocos candidatos llegan a ensayos en humanos. La experiencia demuestra que no en todos los casos es posible predecir el éxito clínico basándonos en resultados de experimentación *in vitro* e *in vivo*.

Una de las causas de la dificultad de aplicabilidad clínica puede radicar en que el modelo de receptor murino, el más utilizado en este tipo de ensayos, no sean trasladables al humano.

La habilidad de percibir modificaciones en la temperatura ambiental es fundamental para la correcta adaptación animal al medio. Por esto, la presión evolutiva ha conducido a la aparición de ortólogos de TRPM8 entre especies acorde con su fisiología y ecosistema, asegurando su supervivencia. Aunque podamos referirnos a los TRPM8 como canales relativamente

conservados entre especies, cada canal reacciona de forma diferente ante el mismo estímulo (frio, voltaje y ligandos). Es decir, las pequeñas diferencias existentes entre los ortólogos son significativas a la hora de determinar la modulación del canal y se pueden encontrar compuestos especie – dependientes (Pertusa *et al.*, 2018; Myers *et al.*, 2009).

Estas variaciones en afinidad y potencia producen un sesgo en las metodologías y protocolos de estudio empleados en la actualidad, dificultando la traslación de resultados obtenidos en fase preclínica a clínica.

En este trabajo se han llevado a cabo ensayos fluorimétricos y ensayos colorimétricos de viabilidad celular para la caracterización de moduladores del TRPM8. El objetivo principal es la caracterización de moduladores del canal TRPM8 para el posterior desarrollo de fármacos y tratamientos de patologías asociadas con el canal. Puesto que recientemente se ha podido trabajar con una nueva línea celular capaz de expresar TRPM8 de humano (hTRPM8) de forma estable, se busca determinar posibles diferencias en eficacia y potencia entre el canal TRPM8 de humano y el de rata utilizando para ello mentol, icilina y cuatro compuestos sintéticos.

Para ello se fijan los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar potencia y citotoxicidad de los compuestos 1 – 4 en hTRPM8.
- Determinar posibles diferencias en eficacia de los compuestos en TRPM8 de rata (rTRPM8) y en hTRPM8.
- Estudiar la selectividad de los compuestos 1 – 4.

### **3. Material y métodos**

Para estudiar el potencial terapéutico de los compuestos, se realizan ensayos fluorimétricos en 3 líneas celulares distintas (HEK-rTRPM8, HEK-hTRPM8, HEK-hTRPV1), que determinarán la potencia, IC<sub>50</sub> y selectividad de los mismos. Además, se llevan a cabo ensayos de viabilidad celular, que definirán su citotoxicidad.

#### **3.1. Cultivo celular**

Para la realización de este trabajo se utilizaron tres líneas celulares: HEK-rTRPM8, HEK-hTRPM8, HEK-hTRPV1. Todas ellas células embrionarias de riñón humano transfectadas con

plásmidos diferentes, de manera que expresan los canales rTRPM8, hTRPM8 y TRPV1 de humano (hTRPV1), de forma estable respectivamente.

Para su mantenimiento se requieren medios celulares específicos con su correspondiente enriquecimiento, tal y como se ilustra en la **Tabla 3.1**.

**Tabla 3.1:** Preparación del medio celular de mantenimiento para HEK-RTRPM8, HEK-HTRPM8, HEK-HTRPV1.

	LÍNEA CELULAR		
	rTRPM8	hTRPM8	hTRPV1
<b>Medio celular base</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Eagle's Minimum Essential Medium	Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
<b>ENRIQUECIMIENTO (%)</b>			
<b>Suero fetal bovino</b>	10	10	10
<b>Geneticina</b>	1	1	1
<b>Penicilina/Streptomicina</b>	1	1	1
<b>L-Glutamato</b>	-	1	-
<b>Glucosa</b>	-	1	-
<b>Minimum Essential Medium Non-essential Amino Acid</b>	-	-	1

Las tres líneas celulares precisan un cambio de medio dos veces por semana (cada 3-4 días) para su correcto crecimiento. Cuando los frascos de cultivo alcanzan entre el 95 – 100 % de confluencia, se tripsinizan las células. Para ello realizamos el siguiente procedimiento:

1. En campana, retirar el medio del frasco con una pipeta.
2. Añadir disolución Tripsina - EDTA 0,25 % (1 ml para HEK-rTRPM8 y HEK-hTRPV1, 2 mL para HEK-hTRPM8) y dejar actuar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Dar unos golpecitos en la base del frasco con la mano para asegurar que se hayan despegado las células.
3. Añadir medio celular para inhibir la tripsina (5 ml para HEK-rTRPM8 y HEK-hTRPV1, 10 mL para HEK-hTRPM8).

4. Disgregar completamente las células.

Con ayuda de una pipeta se toma la mezcla medio – células resuspendidas y se suelta por las paredes del frasco, retirando las células que puedan haber aún pegadas en las paredes.

5. Trasvasar un volumen (**tabla 3.2**) de la mezcla de células resuspendidas a un frasco nuevo para que las células continúen multiplicándose.

6. Guardar las células en un incubador con humedad controlada (5% CO<sub>2</sub>) y temperatura constante de 37°C hasta que los frascos alcancen el 100 % de confluencia y sembrar las células en las placas de 96 pocillos para realizar el experimento (apartado 3.3.2).

La **Tabla 3.2** muestra las características de los frascos de cultivo y el volumen de células resuspendidas necesario para alcanzar el 100 % de confluencia a los 7, 5 y 3 días en HEK-rTRPM8, HEK-hTRPM8 y HEK-hTRPV1.

**Tabla 3.2:** Características de los frascos de cultivo y el volumen de células resuspendidas necesario para alcanzar 100 % confluencia.

		LÍNEA CELULAR		
		rTRPM8	hTRPM8	hTRPV1
Tipo de frasco (cm <sup>2</sup> )		25	75	25
Volumen total del frasco (mL)		7	12	7
Volumen de células resuspendidas (µL) para 100% confluencia en:	7 días	50	1000	100
	5 días	200	3000	400
	3 días	1000	5000	2000

## 3.2. Preparación de compuestos y agonistas

### 3.2.1. Compuestos

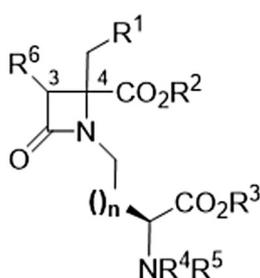
Los compuestos utilizados en este trabajo pertenecen a una quimioteca de compuestos derivados de β-lactamas (**Figura 3.1**). Éstos en concreto han sido identificados ya como antagonistas de rTRPM8.

Se encuentran resuspendidos en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración stock de 50 mM. A partir de esta disolución madre, se preparan de forma seriada las diferentes

disoluciones correspondientes a las concentraciones de cada ensayo utilizando DMSO como diluyente.

Concentraciones de DMSO superiores al 1 % resultan tóxicas en la línea celular HEK. Puesto que en cada pocillo de los ensayos ya hay un volumen de 100  $\mu\text{L}$  (ver apartado 3.3), se añade un máximo de 1  $\mu\text{L}$  de los compuestos a probar; de esta forma se asegura mantener el porcentaje de DMSO inferior a 1. Por esto las disoluciones deben de prepararse 100 veces más concentradas.

Se utilizaron 6 concentraciones iniciales para los compuestos en las diferentes líneas celulares (20 – 0,01  $\mu\text{M}$  en pocillo para HEK-rTRPM8 y HEK-hTRPM8; 100 – 0,5  $\mu\text{M}$  en pocillo para HEK-hTRPV1) y dependiendo de los resultados, se escogieron otras concentraciones puntuales para definir mejor la curva concentración – respuesta y potencia de cada compuesto de forma independiente.



**Figura 3.1:** Esqueleto químico general de compuestos  $\beta$ -lactámicos.

### 3.2.2. Mentol

A partir de una disolución madre de 500 mM en DMSO se realizan las disoluciones seriadas, utilizando como diluyente tampón de ensayo acuoso, ya que el mentol es soluble en solvente acuoso a las concentraciones utilizadas. En este caso se añaden 10  $\mu\text{L}$  de las disoluciones de mentol para realizar los ensayos fluorimétricos (ver apartado 3.3), por lo que deben de prepararse 10 veces más concentradas.

El rango de concentraciones utilizado ha sido 1000 – 1  $\mu\text{M}$  en pocillo para HEK-rTRPM8, HEK-hTRPM8 y HEK-hTRPV1.

### 3.2.3. Icilina

Según la ficha técnica de Cayman Chemical (2021) la icilina ( $M = 311,3 \text{ kg/ mol}$ ) posee una solubilidad máxima de  $321 \mu\text{M}$  en una relación DMSO:PBS 1:5. A partir de una disolución stock a  $1200 \mu\text{M}$  en DMSO se realizan las disoluciones seriadas.

En primer lugar se prepara una disolución a  $200 \mu\text{M}$  que guarda la relación DMSO:PBS 1:5 para la correcta disolución de la icilina. Se toma un volumen de la disolución a  $1200 \mu\text{M}$  en DMSO y se añaden 5 volúmenes de PBS. A partir de esta disolución madre se realizan las siguientes disoluciones, utilizando PBS como diluyente.

En este caso se añaden  $5 \mu\text{L}$  de disolución de icilina al pocillo, por lo que las disoluciones deben de prepararse 20 veces más concentradas.

El rango de concentraciones analizado ha sido  $5 - 0,01 \mu\text{M}$  en pocillo para HEK-rTRPM8, HEK-hTRPM8 y HEK-hTRPV1.

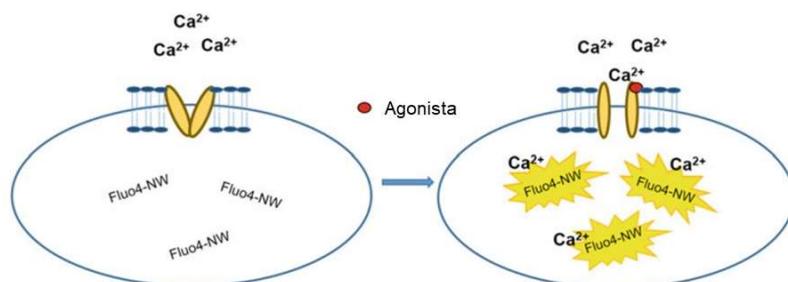
## 3.3. Ensayos fluorimétricos

### 3.3.1. Base teórica

Los ensayos fluorimétricos se basan en el estudio indirecto de la actividad de un canal, monitorizando y detectando cambios en la fluorescencia producida por sondas dependientes de ion.

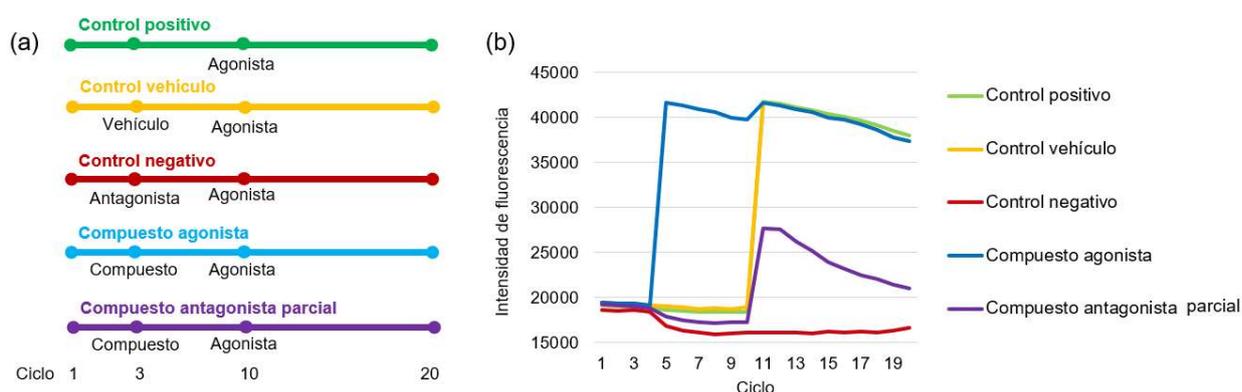
En biología molecular, el calcio se considera el segundo mensajero universal. Controla tanto procesos fisiológicos como patológicos, modificando su concentración intracelular dependiendo del contexto. Las sondas sensibles a calcio son las más utilizadas en el estudio de la actividad de los TRPs ya que son canales permeables a este ion. En este trabajo se utilizó la sonda Fluo4 – NW (sin lavado) (Cordero-Sánchez *et al.*, 2019).

En primer lugar, la sonda accede al interior celular y es activada por las esterasas. Ante la presencia de agonista el canal se abre y se produce un aumento de concentración citosólica de calcio (**Figura 3.2**). Éste interacciona con la sonda y se produce un aumento en la intensidad de fluorescencia. Si por el contrario se trata de un antagonista, el canal permanece cerrado impidiendo el flujo de ión; no se observa un aumento en la fluorescencia (Cordero-Sánchez *et al.*, 2019).



**Figura 3.2:** Diagrama de flujo de calcio por apertura de canal en presencia de agonista (Cordero-Sánchez *et al.*, 2019)

Dependiendo de la apertura y cierre del canal se producirán aumentos y disminuciones en la intensidad de fluorescencia que se pueden registrar utilizando lectores de placa. Conociendo los patrones típicos de agonistas (mentol para TRPM8 y capsaicina para TRPV1) y antagonistas ((N-(3-aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)benzamida hidrocloreuro (AMTB) para TRPM8 y rojo rutenio para TRPV1) se puede inferir la naturaleza activadora o inhibidora de ciertos compuestos o sustancias desconocidas (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3:** Diseño de un ensayo fluorimétrico para cribado de compuestos moduladores de termoTRPs. (a) Esquema simplificado de los compuestos a añadir en los ciclos 3 y 10 en los diferentes tipos de control y experimentos con agonistas o antagonistas. (b) Ejemplo de patrones de intensidad de fluorescencia para los diferentes controles, agonistas y antagonistas (Modificado de Cordero-Sánchez *et al.*, 2019).

En cada experimento, se realiza un control positivo y uno negativo para comprobar la viabilidad de las células. Así mismo, se lleva a cabo un control del vehículo en el que se diluirán los compuestos, para descartar un posible efecto sobre las células.

### 3.3.2. Procedimiento

Para asegurar la adherencia de las células, se tratan las placas de 96 pocillos de fondo oscuro a utilizar con L - polilisina. Posteriormente, se siguen los pasos 1-4 del apartado 3.1 y a continuación se procede a realizar la siembra de las células:

1. Una vez resuspendidas las células, determinar la concentración celular (células/ mL) de la mezcla utilizando la cámara Neubauer. Para ello se cargan 10  $\mu$ L de células resuspendidas, se cuenta el número de células en los cuatro cuadrantes de 0,1 mm<sup>3</sup> y se obtiene el valor promedio. Este número multiplicado por 10<sup>4</sup> corresponde a la concentración células/ mL.
2. Calcular el volumen de mezcla de células resuspendidas y medio celular que se requiere para obtener la concentración deseada de células por pocillo (300.000 células/ mL para HEK-rTRPM8, 550.000 células/ mL para HEK-hTRPM8, 400.000 células/ mL para HEK-hTRPV1) para alcanzar el 100 % de confluencia a los 3 días teniendo en cuenta que el volumen máximo por pocillo es de 100  $\mu$ L.
3. En campana, volver a mezclar la dilución de células con ayuda de una pipeta para asegurar su disgregación.
4. Añadir 100  $\mu$ L de mezcla en cada pocillo.
5. Incubar las placas bajo las mismas condiciones de mantenimiento durante 3 días.

El día del experimento, se comprueba que las células hayan crecido de forma homogénea en todos los pocillos de la placa y se haya alcanzado el 100 % de confluencia. Se prepara la sonda Fluo 4 -NW utilizando el kit correspondiente:

1. Atemperar todos los componentes del kit (tampón de ensayo acuoso, mezcla liofilizada de sonda y probenecid diluido en tampón de ensayo acuoso) 37°C en el baño María del laboratorio.
2. En campana y con oscuridad, añadir 10 mL del tampón de ensayo acuoso y 100  $\mu$ L de probenecid en el recipiente opaco donde se encuentra la mezcla liofilizada de sonda.

Se procede a realizar el ensayo:

1. Eliminar el medio celular de cada pocillo (100  $\mu$ L).
2. Añadir 100  $\mu$ L de sonda Fluo 4 – NW en cada pocillo.

3. Incubar la placa 30 minutos en condiciones de mantenimiento y 30 minutos dentro del lector (POLARstar Omega BMG LABtech), a 25°C, para que las células se atemperen. Mantener la temperatura de la habitación alrededor de 25°C para que al sacar la placa durante el experimento las células no perciban cambio en la temperatura.
4. Iniciar la lectura de placa utilizando el protocolo programado.  
Éste se compone de 20 ciclos de lectura a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 520 nm de emisión. Los tres primeros ciclos miden la emisión de fluorescencia basal. Después del ciclo 3 la lectura se pausa.
5. Extraer la placa del lector.
6. Añadir de forma manual los compuestos a probar, los controles positivos (mentol a 100 µM en pocillo para TRPM8 y capsaicina a 10 µM en pocillo para TRPV1), los negativos (AMTB a 1 µM en pocillo para TRPM8 y rojo rutenio a 10 µM en pocillo para TRPV1) y el control del vehículo (1% DMSO en pocillo) (**Figura 3.3**).
7. Introducir la placa en el lector.
8. En el caso de que se esté probando agonistas, retomar la lectura inmediatamente. Si se prueban antagonistas, esperar 5 minutos antes de continuar con la medida.  
En el ciclo 10 el propio lector inyecta de forma automática en toda la placa el agonista escogido.

### 3.3.3. Análisis de datos

Para el tratamiento inicial de los datos se utiliza Excel. El parámetro estadístico empleado para la validación de los resultados obtenidos en cada ensayo es el Factor Z, definido por la siguiente ecuación (1) (Cordero-Sánchez *et al.*, 2019):

$$Factor\ Z = 1 - \frac{3 \times (SD_p + SD_n)}{|M_p - M_n|} \quad (1)$$

Donde  $M$  es la media de los valores de intensidad de fluorescencia y  $SD$  es la desviación estándar de los controles positivos ( $p$ ) y negativos ( $n$ ). El valor máximo del Factor Z es 1 y se consideran válidos aquellos ensayos con valores mayores a 0,5.

En el caso de que el compuesto se comporte como un agonista, el grado de activación se calcula a partir de la ecuación (2) (modificado de Cordero-Sánchez *et al.*, 2019):

$$Activación (\%) = \left( \frac{F c}{F ct} \right) \times 100 = \left( \frac{Fcd - Fca}{Fctd - Fcta} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde  $Fcd$  es el valor máximo entre los ciclos 4-6 y  $Fca$  es el valor en el ciclo 3 en los pocillos donde se ha probado el compuesto, es decir, la diferencia de intensidad de fluorescencia antes y después de añadir el compuesto.  $Fctd$  es el valor máximo entre los ciclos 11-20 y  $Fcta$  es el valor del ciclo 10 en los pocillos de control positivo, la diferencia de intensidad de fluorescencia producida por el agonista conocido.

Si el compuesto se comporta como un antagonista, el grado de bloqueo se calcula siguiendo la siguiente fórmula (3) (modificada de Cordero-Sánchez *et al.*, 2019):

$$Inhibición (\%) = 1 - \left( \frac{F c'}{F ct} \right) \times 100 = 1 - \frac{(F cd' - Fca')}{Fctd - Fcta} \times 100 \quad (3)$$

Donde  $Fcd'$  es el valor máximo entre los ciclos 11-14 y  $Fca'$  es el valor del ciclo 10 en los pocillos donde se ha probado el compuesto, lo que se traduce en la diferencia de intensidad de fluorescencia antes y después de añadir el agonista en presencia del compuesto a probar.

Tanto los valores de actividad como de inhibición de los compuestos desconocidos se normalizan respecto a los valores del agonista conocido (mentol para M8 y capsaicina para V1), que se considera 100 % activador.

La curva concentración – respuesta de los compuestos se realiza con el programa Graphpad Prism 8.0. Para ello, se representa el logaritmo de las concentraciones frente el porcentaje de respuesta. Para determinar la potencia se calcula el valor  $EC_{50}$  o  $IC_{50}$ , dependiendo si el compuesto se comporta como un agonista o antagonista respectivamente, siguiendo la ecuación (4) (Motulsky, 2021):

$$Y = Vmin + \frac{Vmax - Vmin}{1 + 10^{X - Log IC_{50}}} \quad (4)$$

Donde  $Vmin$  es el valor mínimo de actividad y  $Vmax$  el valor máximo.

Los valores obtenidos en rTRPM8 y hTRPM8 para cada compuesto y agonista fueron comparados por pares mediante el estadístico T de student (t-test) con el programa Graphpad Prism 8.0.

### **3.4. Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT**

#### **3.4.1. Base teórica**

Para caracterizar la citotoxicidad de ciertas sustancias, se realizan ensayos de supervivencia y proliferación celular. Las metodologías más empleadas para estimar el número de células vivas son las basadas en ensayos colorimétricos, donde un compuesto incoloro es modificado por las células vivas produciendo una sustancia coloreada. Este cambio de color se mide con lectores de placa (Mosmann, 1983).

En este trabajo se realizó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular mediante bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la transformación de MTT en formazano, una sal azul, gracias a la actividad reductora de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El ensayo detecta las células vivas mediante la funcionalidad mitocondrial, por lo que la cantidad de células vivas sería proporcional a la cantidad de formazano producido (Denizot y Lang, 1986).

#### **3.4.2. Procedimiento**

En este caso se ha utilizado la línea celular HEK-rTRPM8, se siguen los pasos 1-4 del apartado 3.1 y se siembran las células siguiendo el siguiente procedimiento:

1. En campana, sembrar las placas a una concentración de 300.000 células/ mL para alcanzar el 100 % de confluencia en cada pocillo a los 3 días (en detalle en apartado 3.3.2).
2. Incubar las placas en las mismas condiciones de mantenimiento durante 24 h para permitir su adherencia.
3. En campana, añadir 1  $\mu$ L de los compuestos diluidos en DMSO y controles:
  - a. Control 100 % crecimiento celular: se toman de referencia pocillos de la placa sin tratamiento y pocillos con DMSO al 1 %.
  - b. Control 100 % mortalidad celular: tampón de ensayo enriquecido con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% y TRITON al 1 %. Se retira el medio celular (100  $\mu$ L) y se sustituye por 100  $\mu$ L de tampón, asegurando así la lisis celular.
4. Incubar las placas 24 h en condiciones de mantenimiento.
5. En campana y en oscuridad, añadir 5  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL en tampón de ensayo sin enriquecer) en total oscuridad.

6. Incubar la placa durante 4 h en condiciones de mantenimiento para permitir la formación de cristales de formazano, que aparecerán en el fondo de los pocillos.
7. En bancada, eliminar sobrenadante con ayuda de una pipeta y añadir 150 µL de DMSO puro.
8. Depositar la placa en un orbital a 200 rpm durante 10 minutos para que los cristales se disuelvan, a temperatura ambiente.
9. Realizar la lectura de densidad óptica en el lector POLARstar Omega BMG LABtech, utilizando un protocolo prediseñado que mide a una longitud de onda de 570 nm con el filtro de referencia a 620 nm y efectúa una lectura puntual en cada pocillo.

### 3.4.3. Análisis de datos

Para el tratamiento de datos se utiliza Excel y se calcula el porcentaje de viabilidad celular mediante la ecuación (5):

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control } 100 \% \text{ crecimiento}} \times 100 \quad (5)$$

Para determinar si existen diferencias significativas de viabilidad entre el control 100 % crecimiento y los pocillos con compuesto, se realiza un ANOVA utilizando el programa Graphpad Prism 8.0.

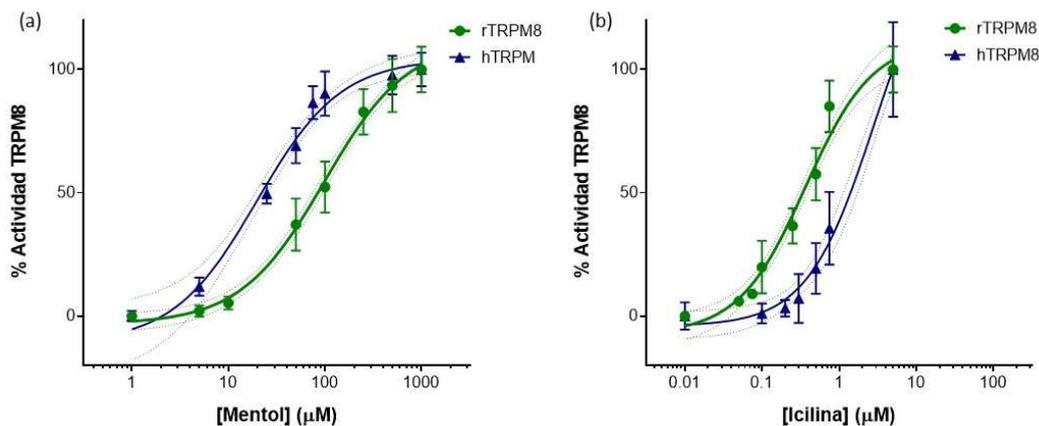
## 4. Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en los ensayos fluorimétricos y en los ensayos de viabilidad celular.

### 4.1. Ensayos fluorimétricos

Los ensayos fluorimétricos han permitido determinar la potencia, eficacia máxima, rango de acción y selectividad de los agonistas y antagonistas utilizados en este trabajo en los canales rTRPM8 y hTRPM8.

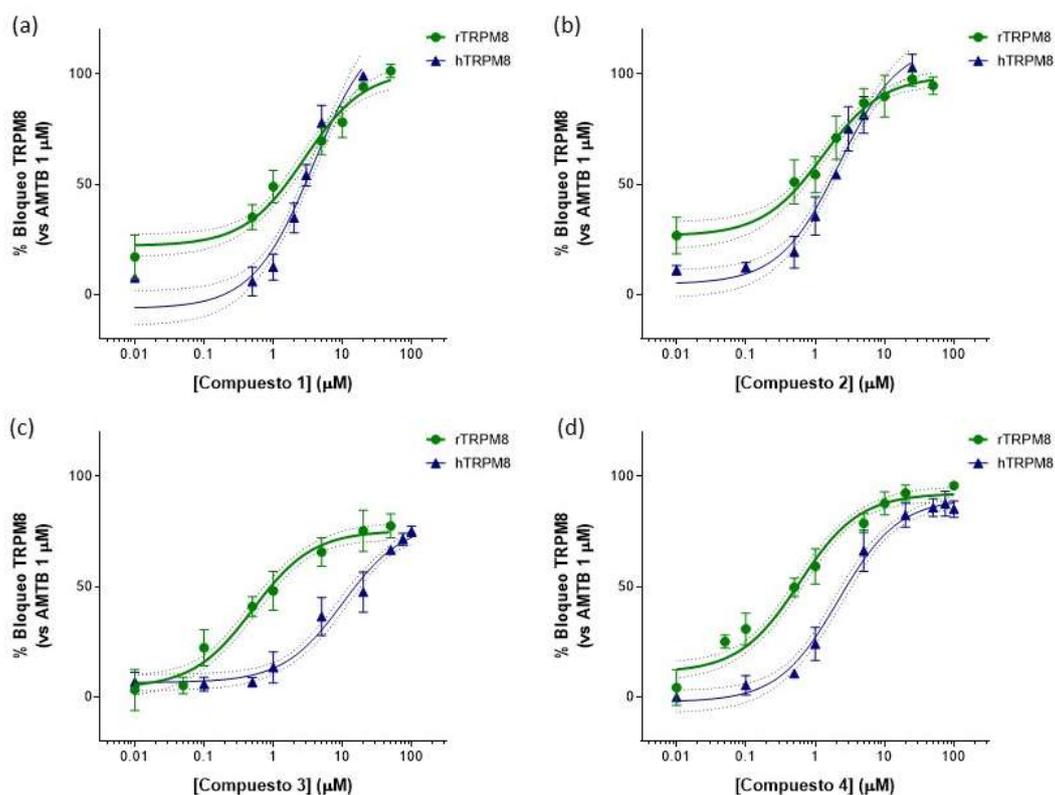
Las curvas concentración – respuesta obtenidas para mentol e icilina se muestran en la **figura 4.1**. En el caso del mentol, tanto la curva de rTRPM8 como de hTRPM8 abarcan el rango de concentraciones 1 – 1000 µM en pocillo y los datos están normalizados con respecto a la máxima actividad a máxima concentración del mentol.



**Figura 4.1:** Curva concentración – respuesta de agonistas en rTRPM8 y hTRPM8. (a) Mentol. (b) Icilina. Los datos se han representado como media  $\pm$  sd;  $n = 3$ ,  $Z > 0,7$ . Las líneas continuas representan el ajuste a la ecuación 4 y las líneas discontinuas el intervalo de confianza al 95% para el ajuste.

Las curvas de icilina se encuentran en el rango 0,01 – 5  $\mu$ M en pocillo y también se normalizaron en base a la máxima actividad a máxima concentración de la icilina. Las curvas concentración – respuesta de los compuestos 1 – 4 pueden observarse en la **figura 4.2**. Los resultados se normalizaron frente la actividad del canal TRPM8 a 100  $\mu$ M de mentol en pocillo.

Establecido el rango de concentraciones donde se distribuye la curva, se obtiene la potencia de los agonistas y compuestos; para ello se utiliza la ecuación 4. Los valores correspondientes al  $IC_{50}$  o  $EC_{50}$  de cada compuesto se agrupan en la **tabla 4.1.**, representados como media  $\pm$  desviación estándar junto con el intervalo de confianza (95 %). Al comparar el  $IC_{50}$  o  $EC_{50}$  de cada compuesto probado en ambos canales se obtuvieron diferencias significativas en mentol ( $p$ -valor  $< 0.0001$ ), icilina ( $p$ -valor = 0,0303), compuesto 1 ( $p$ -valor = 0,0420), compuesto 3 ( $p$ -valor  $< 0.0001$ ), compuesto 4 ( $p$ -valor = 0,0101), pero no para el compuesto 2 ( $p$ -valor = 0,0625).



**Figura 4.2:** Curva concentración – respuesta de compuestos 1 – 4. Los datos se han representado como media  $\pm$  sd; n = 3, Z > 0,7. Las líneas continuas representan el ajuste a la ecuación 4 y las líneas discontinuas el intervalo de confianza al 95% para el ajuste.

**Tabla 4.1:** Valores EC<sub>50</sub> o IC<sub>50</sub> de mentol, icilina y compuestos 1 – 4 en rTRPM8 y hTRPM8 y el resultado de su respectiva comparación. NS: no significativo.

Compuesto	EC <sub>50</sub> $\pm$ sd	IC (95%)	EC <sub>50</sub> $\pm$ sd	IC (95%)	P-valor
	( $\mu$ M) rTRPM8		( $\mu$ M) hTRPM8		
Mentol	98,1 $\pm$ 1,1	78,8 - 122,3	22,0 $\pm$ 1,1	14,5 – 27,0	< 0.0001
Icilina	0,4 $\pm$ 1,2	0,3 - 0,5	1,7 $\pm$ 1,3	1,6 - 5,1	0,0303
	IC <sub>50</sub> $\pm$ sd ( $\mu$ M)		IC <sub>50</sub> $\pm$ sd		
	rTRPM8		hTRPM8		
1	2,9 $\pm$ 1,2	2,0 – 4,1	4,1 $\pm$ 1,2	2,9 – 5,7	0,0420
2	1,3 $\pm$ 1,2	0,9 - 1,7	2,4 $\pm$ 1,2	1,7 – 3,0	N.S
3	0,5 $\pm$ 1,2	0,4 - 0,7	8,1 $\pm$ 1,3	7,2 - 14,5	< 0.0001
4	0,6 $\pm$ 1,1	0,5 - 0,8	2,2 $\pm$ 1,1	1,7 - 2,8	0,0101

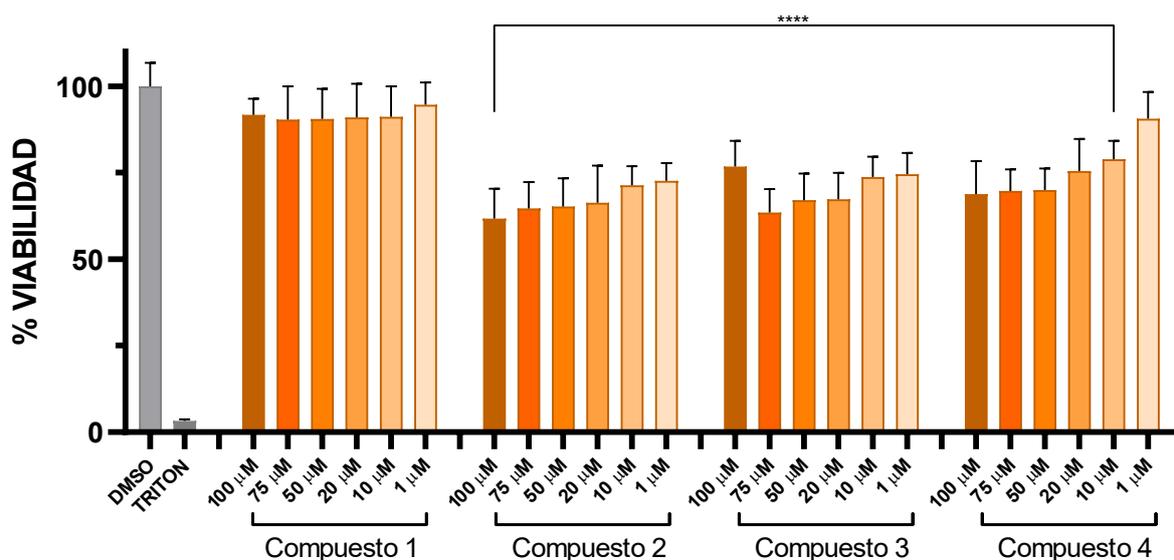
Para determinar la selectividad, se realizaron ensayos fluorimétricos utilizando como diana el canal hTRPV1; los resultados muestran que en este caso los compuestos actúan como agonistas. La **tabla 4.2** recoge los porcentajes de actividad del canal a diferentes concentraciones de compuesto (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 1  $\mu$ M).

**Tabla 4.2:** Actividad del canal hTRPV1 en presencia de compuestos 1 – 4 a diferentes concentraciones. Los datos se han representado como media  $\pm$  sd.

Compuesto	% Actividad hTRPV1 a diferentes concentraciones de compuesto		
	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M
1	82,4 $\pm$ 9,5	59,2 $\pm$ 8,1	25,1 $\pm$ 1,4
2	31,4 $\pm$ 9,7	25,0 $\pm$ 3,6	19,5 $\pm$ 3,6
3	28,6 $\pm$ 7,3	25,2 $\pm$ 3,2	16,3 $\pm$ 0,6
4	46,1 $\pm$ 5,7	30,3 $\pm$ 1,8	7,7 $\pm$ 1,5

#### 4.2. Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT

Los ensayos de viabilidad celular se realizan para determinar la citotoxicidad de los compuestos 1 – 4. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.3**.



**Figura 4.3:** Viabilidad (%) de los compuestos 1 – 4 a diferentes concentraciones en HEK-hTRPV1. Significancia ANOVA frente control DMSO: P-valor < 0,0001. \*\*\*\* n = 4; Z > 0,7.

La menor concentración utilizada (1  $\mu\text{M}$ ) es la más cercana al  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos. Se escogió 100  $\mu\text{M}$  como máxima concentración porque se observaron modificaciones en la permeabilidad de la membrana a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  en los compuestos 3 y 4 en los ensayos fluorimétricos realizados en hTRPM8.

Se realiza un ANOVA comparando los porcentajes de viabilidad de cada compuesto a cada concentración respecto al control 100 % crecimiento (DMSO) y se obtienen diferencias significativas en los compuestos 2 – 4.

## 5. Discusión

### 5.1. Ensayos fluorimétricos

El análisis de las curvas concentración – respuesta de icilina y mentol en TRPM8 muestran que las concentraciones de icilina (0,01 – 5  $\mu\text{M}$ ) necesarias para activar el canal son considerablemente más bajas que para mentol (1 – 1000  $\mu\text{M}$ ), tanto en rata como en humano (**figura 4.1**). La  $\text{EC}_{50}$  de icilina ( $\text{EC}_{50} = 0,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$  en rTRPM8;  $\text{EC}_{50} = 1,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$  en hTRPM8) es inferior que la de mentol ( $\text{EC}_{50} = 98,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$  en rTRPM8;  $\text{EC}_{50} = 22,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$  en hTRPM8) en ambos canales, como se muestra en la **tabla 4.1**.

Los resultados obtenidos sugieren que la icilina es un agonista más potente que el mentol, tanto en rTRPM8 como en hTRPM8. Estos datos concuerdan con los descritos en la literatura (Journigan *et al.*, 2021; DeFalco *et al.*, 2011; Liu y Qin, 2011; Bödding *et al.*, 2007).

La curva hTRPM8 del mentol (**figura 4.1.a**) se encuentra desplazada hacia valores más altos de activación que la curva rTRPM8. Esto sugiere que una misma concentración de mentol activa de forma más eficaz el canal humano que el de rata. En el caso de la icilina, la curva hTRPM8 (**figura 4.2.b**) se encuentra ligeramente desplazada hacia valores inferiores de activación en comparación con rTRPM8. Al contrario que el mentol, una misma concentración de icilina activa más eficazmente el canal de rata que el de humano. Las diferencias estadísticamente significativas en la potencia entre ambos canales (**tabla 4.1**) indica que cada agonista se comporta con una eficacia distinta en función de la especie.

La comparación de las curvas concentración – respuesta de los canales rata y humano (**figura 4.1**) indican que el mentol posee mayor potencia por el canal humano. Sin embargo, en el caso de la icilina la potencia es mayor por el canal de rata.

En cuanto a los antagonistas, los compuestos utilizados en este trabajo son  $\beta$  – lactamas, moléculas utilizadas tradicionalmente en el desarrollo de antibióticos. Estudios realizados por Torre-Martínez *et al.*, (2017) y Bonache *et al.*, (2021; 2020) apoyan su uso como antagonistas para el TRPM8.

Las curvas concentración – respuesta (C/R) de todos los compuestos se encuentran en el rango micro molar (**figura 4.2**). Los compuestos 1 (**figura 4.2.a**) y 2 (**figura 4.2.b**) son capaces de bloquear totalmente tanto el canal humano como el de rata, por lo que podrían tratarse de agonistas totales del TRPM8. Sin embargo, a las menores concentraciones utilizadas, el canal de rata presenta mayores porcentajes de bloqueo que el canal humano. Estos datos apoyan que los compuestos son más potentes en el canal murino.

En cuanto al compuesto 3 (**figura 4.2.c**), ambas curvas C/R presentan similares porcentajes de bloqueo a concentraciones mínimas y máximas de compuesto, sin llegar a bloquear totalmente la actividad del canal a las concentraciones máximas utilizadas. Los datos indican que podría tratarse de un antagonista parcial para ambos canales. Este compuesto presenta una potencia de unas 16 veces mayor para rTRPM8 que para hTRPM8.

En el caso del compuesto 4 (**figura 4.2.d**), tanto la curva C/R para canal humano como para canal de rata, presentan valores similares a concentraciones mínimas y máximas, bloqueando totalmente la actividad el canal a las concentraciones máximas utilizadas. Esto sugiere que el compuesto 4 podría actuar como antagonista total del TRPM8, siendo más potente en canal de rata.

En términos generales, la potencia de los compuestos es mayor para el canal de rata que para el humano, si bien únicamente alcanzan significación estadística los compuestos 1, 3 y 4. Los compuestos que inhiben con mayor potencia el canal rTRPM8 serían el compuesto 3 ( $IC_{50} = 0,5 \pm 1,2 \mu M$ ) y 4 ( $IC_{50} = 0,6 \pm 1,1 \mu M$ ), cuya potencia es similar a la del AMTB ( $IC_{50} = 0,58 \mu M$ ; Lashinger *et al.*, 2008). El compuesto 4 ( $IC_{50} = 2,2 \pm 1,1 \mu M$ ) y 2 ( $IC_{50} = 2,4 \pm 1,2 \mu M$ ) inhiben con mayor potencia al hTRPM8 (**tabla 4.1**).

Destacar que una alta potencia no siempre se asocia con resultados favorables en ensayos in vivo. El bloqueo completo del canal y por tanto de la vía de señalización es posible que desencadene efectos colaterales no siempre deseados. Para obtener una utilidad clínica el fármaco debería reducir la hipersensibilidad al frío sin eliminar por completo la normo-termosensación (De Caro *et al.*, 2019).

El estudio de selectividad se realizó en el canal hTRPV1. Los resultados obtenidos (**tabla 4.2**) indican que los compuestos 1 – 4 activan el canal hTRPV1 con baja potencia. Debido a problemas de solubilidad, no pudieron realizarse experimentos a mayor concentración, por lo que no ha sido posible caracterizar curvas concentración – respuesta. Sin embargo, teniendo en cuenta estos valores de activación, los resultados indican que los compuestos no son selectivos para el canal TRPM8. Si bien las concentraciones necesarias para activar el hTRPV1 son mucho más altas a las utilizadas para bloquear TRPM8, a concentraciones cercanas a su IC<sub>50</sub> en TRPM8 (5 µM) sí se aprecia una ligera activación del canal TRPV1. El compuesto 1 es el más potente.

Los resultados del estudio demuestran que existe diversidad en la potencia de los moduladores del canal TRPM8 dependiendo de la especie. A pesar de que existe una gran similitud en cuanto a la secuencia aminoacídica entre los canales hTRPM8, rTRPM8 y mTRPM8, los ortólogos mamíferos (humano, ratón y rata) comparten un 94 – 98 % de homología de secuencia (Liu *et al.*, 2005) y solo 10 aminoácidos diferencian el canal hTRPM8 de rTRPM8 (Journigan *et al.*, 2021), se puede afirmar que presentan propiedades farmacológicas diferentes.

Estudios previos han demostrado que existen ligandos especie – dependientes que se unen con mayor o menor afinidad a ciertos ortólogos (Behrendt *et al.*, 2004). La icilina es un ejemplo, ya que parece que solo activa TRPM8 de mamíferos (Myers *et al.*, 2009). Resultados de estudios donde se realizaban mutaciones controladas sobre aminoácidos concretos de TRPM8 de diferentes especies vinculan la diferencia de sensibilidad entre ortólogos con el aminoácido Ala<sup>796</sup> (Chuang *et al.*, 2004). Además, el mentol activa TRPM8 de pollo (cTRPM8 de “chicken”) con mayor potencia que el TRPM8 de ratón (mTRPM8 de “mouse”) (Pertusa *et al.*, 2018).

Caceres *et al.*, (2017) describen el fenómeno de especie – dependencia comparando la potencia del eucaliptol en hTRPM8, rTRPM8 y mTRPM8. El agonista de TRPM8 presenta una  $EC_{50}$  diferente en los tres ortólogos, resultando más potente en humano ( $EC_{50} = 245,6 \mu M$ ) en comparación con el canal de ratón ( $EC_{50} = 924,5 \mu M$ ) y rata ( $EC_{50} = 1,21 mM$ ), que se encuentran en el rango de milimolar en vez de micro molar.

Journigan *et al.*, (2021) comparan el efecto de diferentes antagonistas, mentol e icilina en canal rTRPM8 y hTRPM8. Aunque los diferentes experimentos fueron llevados bajo las mismas condiciones, la sensibilidad del canal de rata y humano eran diferentes y concluyen que para inhibir la actividad de hTRPM8 se necesitan concentraciones significativamente mayores que en rTRPM8.

Otros estudios centrados en la sensibilidad al frío apoyan el diferente comportamiento de los canales en función de la especie. Este caso concreto puede explicarse debido a la presión evolutiva y necesidad de adaptación al medio de cada animal para asegurar la supervivencia. Los canales hTRPM8, rTRPM8 y mTRPM8 responden todos a temperaturas inferiores a  $26^{\circ}C$  (Myers *et al.*, 2009). Sin embargo, el TRPM8 de rana (fTRPM8 de “frog”) responde a temperaturas mucho más bajas ( $13^{\circ}C$ ), probablemente porque los anfibios viven en ecosistemas húmedos y sombríos. El cTRPM8 responde a temperaturas más altas ( $29^{\circ}C$ ); este hecho se explica porque la temperatura corporal de las aves también es superior (García-Ávila, 2019; Myers *et al.*, 2009).

Estos resultados permiten considerar la utilización de modelos in vitro que expresen el canal humano en vez del canal de rata o ratón porque, a pesar de presentar una alta homología de secuencia sí existen diferencias en la modulación de los canales dependiendo del ligando y la especie. No se puede generalizar las funciones de los TRPs entre los diferentes organismos (García-Ávila e Islas, 2019).

Por último, los ensayos fluorimétricos son técnicas muy utilizadas en la caracterización de moduladores del TRPM8 (Bonache *et al.*, 2020; Bertamino *et al.*, 2018; de la Torre-Martínez *et al.*, 2017; Pérez de Vega *et al.*, 2016; Bertamino *et al.*, 2016).

Como se ha podido comprobar en este trabajo, permiten una rápida caracterización del comportamiento de canales iónicos en presencia de compuestos desconocidos. Debido a su

alta reproducibilidad y bajo coste, son un buen punto de partida a la hora de estudiar agentes con potencial actividad terapéutica. Sin embargo, al ser un método *in vitro* indirecto, existe un sesgo en el estudio profundo del canal. Para determinar los mecanismos de acción, cinética del canal o evaluar la reversibilidad del efecto de moduladores es necesario contrastar los resultados obtenidos con otros ensayos alternativos, ya sean *in vitro* (como puede ser Patch o imagen de calcio), *in silico* o *in vivo* (Cordero-Sánchez *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2016).

## 5.2. Ensayos colorimétricos de viabilidad celular mediante MTT

La **figura 4.3** muestra los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular. Se compararon todos los compuestos respecto el control DMSO de 100 % crecimiento. El compuesto 1 muestra una viabilidad del 100 % en todas las concentraciones utilizadas. En cuanto los compuestos 2, 3 y 4, se aprecia una disminución de viabilidad celular conforme aumenta la concentración del compuesto. Es decir, a mayor concentración, mayor toxicidad. Los compuestos 2 y 3 son tóxicos a todas las concentraciones, mientras que el compuesto 4 no lo es a 1  $\mu$ M.

Para determinar el potencial terapéutico de un compuesto se tienen en cuenta su citotoxicidad, potencia y selectividad. Contrastando los resultados del ensayo de viabilidad celular (**figura 4.3**), los valores  $IC_{50}$  tanto en canal de rata como en humano (**tabla 4.1**) y su actividad respecto al canal hTRPV1 (**tabla 4.2**), los resultados sugieren que ninguno de los compuestos podría considerarse un potencial agente terapéutico. El compuesto 1 es el único no tóxico, sin embargo, es también el que activa con mayor eficacia el canal hTRPV1, lo que demuestra su falta de especificidad. Los compuestos 2, 3 y 4 resultan tóxicos a concentraciones cercanas a su  $IC_{50}$ , por lo que tampoco son viables para su posterior desarrollo.

## 5.3. Perspectivas futuras

Una posible causa del fracaso clínico de ciertos compuestos puede deberse a la falta de traslación de estudios preclínicos, realizados en animales, a estudios clínicos en humanos. Los resultados expuestos en este trabajo indican diferencias significativas en la potencia de los compuestos entre los canales de ratón y humano, corroborando el sesgo existente en los protocolos utilizados actualmente para caracterizar moduladores de TRPs. Estos resultados

cuestionan el uso de receptor murino para caracterizar moduladores de TRPM8 en aplicación clínica.

Estudios que investiguen en profundidad el comportamiento de los ligandos especie – dependientes ayudarían a esclarecer las diferencias entre ortólogos y así crear nuevos procedimientos más útiles y eficaces.

Diferentes grupos investigadores abordan este problema sugiriendo diversas soluciones. Pertusa *et al.*, (2018) sugiere la fabricación de canales quimera fusionando diferentes ortólogos. De esta forma se pueden comparar las regiones no conservadas entre especies e identificar los dominios proteicos implicados en la modulación del canal.

Journigan *et al.*, (2021) proponen el antagonista mentilo(-) como potencial herramienta para estudiar las diferencias del TRPM8 entre las diferentes especies, puesto que ya se ha caracterizado su actividad en rTRPM8 y hTRPM8 utilizando diferentes ensayos.

Otra opción sería estudiar las interacciones ligando – canal utilizando técnicas Cryo-EM. Así se podrían caracterizar los aminoácidos específicos que intervienen en la unión con el modulador en las diferentes especies de TRPM8. Esto permitiría diseñar compuestos más específicos dirigidos ayudando al desarrollo de nuevas familias de agonistas y antagonistas (González-Muñiz *et al.*, 2019).

Sin embargo, los resultados obtenidos en modelos *in vitro* e *in silico* deberían validarse en tejidos u organismos completos para garantizar el paso de fase preclínica a clínica (Iftinca y Altier, 2020).

La creación de tejidos y organoides viables a través de la bioimpresión permitiría hacer frente a este problema. Se podrían diseñar órganos completos utilizando la línea celular adecuada. La técnica de diferenciación celular es otra solución prometedora. Utilizando biopsias de pacientes, se diferenciarían estas células en el tejido diana y podrían desarrollarse tratamientos individualizados.

Estas propuestas podrían aumentar teóricamente el porcentaje de éxito en fase clínica y reduciría considerablemente el uso de animales en experimentación.

Mälkiä *et al.*, (2011) resumen en una revisión bibliográfica los diferentes resultados de potencia obtenidos al estudiar un mismo modulador en diferentes técnicas (microscopia de imagen de calcio, ensayos fluorimétricos, patch-clamp, etc). Para facilitar la comunicación entre la comunidad científica y agilizar el proceso de caracterización de agonistas y antagonistas, sería interesante estandarizar la metodología y modelos empleados.

A pesar de las dificultades a afrontar para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para enfermedades relacionadas con el TRPM8, la demanda clínica continua aumentando. El descubrimiento de la expresión del TRPM8 en tejidos antes no vinculados al canal, ha permitido asociar diferentes condiciones patológicas al mal funcionamiento del mismo. Estas enfermedades carecen de tratamiento dirigido al TRPM8. Un nuevo punto de vista a explorar es el beneficio clínico de fármacos multifuncionales combinados que actúen simultáneamente sobre varios TRPs, puesto que en algunas enfermedades se involucran diferentes canales (Pérez de Vega *et al.*, 2016; Bharate *et al.*, 2012).

## 6. Conclusiones

Los resultados del estudio muestran las siguientes conclusiones:

- Existen diferencias en eficacia y potencia entre canal TRPM8 de humano y de rata tanto con los agonistas mentol e icilina como con los antagonistas estudiados.
- La icilina es un agonista más potente que el mentol tanto en hTRPM8 como en rTRPM8. Siendo más potente activando el ortólogo murino, mientras que el mentol es más potente activando el canal humano.
- Todos los antagonistas bloquean con mayor potencia el ortólogo murino, destacando la diferencia de potencia del compuesto 3 que es 16 veces más potente bloqueando dicho ortólogo.
- Los antagonistas probados han resultado ser activadores poco potentes del canal TRPV1.
- De los antagonistas probados, todos excepto el 1, resultan tóxicos en el rango de potencia para cada uno de ellos.
- Debido a su falta de especificidad y su toxicidad, ninguno de los compuestos podría considerarse para su posterior desarrollo.
- Las diferencias existentes entre ambos ortólogos apoyan el uso del modelo basado en hTRPM8 en lugar del rTRPM8 en estudios preclínicos.

## 7. Bibliografía

- Almaraz L, Manenschijn JA, de la Peña E, Viana F. TRPM8. En: Nilius B, Flockerzi V, editores. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. Vol 222. 2ª ed. Berlín: Springer; 2014. p 547- 583.
- Behrendt HJ, Germann T, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British J. Pharm.* 2004; 141: 737 – 745.
- Belvisi MG, Dubuis E, Birrell MA. Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. *Chest*. 2011; 140 (4): 1040-1047. DOI: 10.1378/chest.10-3327.
- Bertamino A, Iraci N, Ostacolo C, Ambrosino P, Musella S, *et al.* Identification of a Potent Tryptophan-Based TRPM8 Antagonist With in Vivo Analgesic Activity. *J. Med. Chem.* 2018; 61 (14): 6140 – 6152. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00545.
- Bertamino A, Ostacolo C, Ambrosino P, Musella S, Di Sarno V, *et al.* Tryptamine-based derivatives as Transient Receptor Potential Melastatil tipo-8 (TRPM8) channel modulators. *J. Med. Chem.* 2016; 59 (12): 5661 – 5683. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01914.
- Bödding M, Wissenbach U, Flockerzi V. Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium*. 2007; 42: 618 – 628. DOI: 10.1016/j.ceca.2007.03.005.
- Bonache MA, Llabrés PJ, Martín-Escura C, De la Torre-Martínez, Medina-Peris A, *et al.* Phanylalanine-Derived  $\beta$ -Lactam TRPM8 Modulators. Configuration Effect on the Antagonist Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22: 2370. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052370>.
- Bonache MA, Martín-Escura C, De la Torre-Martínez, Medina-Peris A, Rodríguez-González S, *et al.* Highly functionalized  $\beta$ -lactams and 2-ketopiperazines as TRPM8 antagonists with antiallodynic activity. *Scientific Reports*. 2020; 10: 14154. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70691-x>.
- Aceres AI, Liu B, Jabba SV, Achanta A, Morris JB *et al.* Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 channels mediate the anti-inflammatory effects of eucalyptol. *Brit. J. Pharm.* 2017; 174 (9): 876 – 879. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.13760>.

- Caymanchem [Internet]. Michigan: Caymanchem; c2021. [Consultado el 20 de Mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.caymanchem.com/product/10137/icilin>.
- Chuang H, Neuhausser WM, Julius D. The Super-Cooling Agent Icilina Reveals a Mechanism of Coincidence Detection by a Temperature-Sensitive TRP Channel. *Neuron*. 2004; 43: 859-869.
- Cordero-Sánchez C, Mudarra-Fraguas I, Fernández-Carvajal A. Fluorescence -Based Functional Assays for Ca<sup>2+</sup>-Permeable ThermoTRP Channels. En: Ferrer-Montiel A, Hucho T, editores. *TRP Channels, Methods in Molecular Biology*, vol 1987. New York: Humana; 2019. p 99 – 110. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9446-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9446-5_7).
- De Caro C, Cristiano C, Avagliano C, Bertamino A, Ostacolo C, *et al.* Characterization of New TRPM8 Modulators in Pain Perception. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;10 (22): 5544. DOI: 10.3390/ijms20225544.
- DeFalco J, Duncton MAJ, Emerling D. TRPM8 Biology and Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011; 11: 2237 – 2252.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 1986; 89: 271–277.
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron Report*. 2007; 54 (3) : 371 – 8. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.024.
- Dietrich A. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Health Disease. *Cells*. 2019; 8: 413. DOI: 10.3390/cells8050413.
- Diver MM, Cheng Y, Julius D. Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization. *Structural Biology*. 2019; 365: 1434-1440. DOI: 10.1126/science.aax6672.
- Fernández-Carvajal A, Muñoz-González R, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Investigational drugs in early phase clinical trials targeting thermotransient receptor potential (thermo TRP) channels. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2020; 29 (11): 1209-1222. DOI: <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1825680>.
- Fitzpatrick D. Unit II Sensation And Sensory Processing, The Somatic Sensory System. En: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, *et al.*, editores. *Neuroscience*. 3ª ed. Sunderland: Sinauer; 2004. p 188- 369.

- Flockerzi V, Nilius B. TRPs: Truly Remarkable Proteins. En: Nilius B, Flockerzi V, editores. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. Vol 223. 2ª ed. Berlín: Springer; 2014. p 937- 963.
- Froghi S, Charlotte TG, Tandon R, Quaglia A, Davidson B, *et al*. New Insights on the Role of TRP Channels in Calcium Signalling and Immunomodulation: Review of Pathways and Implications for Clinical Practice. *Clinical Review in Allergy and Immun*. 2021; 60: 271-292. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08824-3>.
- García-Ávila M, Islas LD. What is new about mild temperature sensing? A review for recent findings. *Temperature*. 2019; 6 (2): 132-141. DOI: 10.1080/23328940.2019.1607490.
- González-Muñiz R, Bonache MA, Martín-Escura C, Gómez-Monterrey I. Recent Progress in TRPM8 Modulation: An Update. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20 (11): 2618. DOI: 10.3390/ijms20112618.
- Horne DB, Biswas K, Brown J, Bartberger MD, Clarine J, *et al*. Discovery of TRPM8 Antagonist (S)-6-(((3-Fluoro-4-(trifluoromethoxy)phenyl)(3-fluoropyridin-2-yl)methyl)carbonyl)nicotinic Acid (AMG 333), a Clinical Candidate for the Treatment of Migraine. *J Med Chem*. 2018; 61: 8186 – 8201.
- Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium*. 2020; 85. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102111>.
- Iftinca M, Altier C. The cool things to know about TRPM8!. *Channels*. 2020; 14 (1); 413-420. DOI: <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1841419>.
- Jiménez I, Prado Y, Marchant F, Otero C, Eltit F, *et al*. TRPM Channels in Human Diseases. *Cells*. 2020; 9 (12): 2604. DOI: 10.3390/cells9122604.
- Journigan VB, Alarcón-Alarcón D, Feng Z, Wang Y, Liang T, *et al*. Structural and in Vitro Functional Characterization of a Menthyl TRPM8 Antagonist Indicates Species-Dependent Regulation. *ACS Med. Chem. Lett*. 2021; 12 (5): 758 – 767. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00001>.
- Lashinger ESR, Steingra MS, Hieble JP, Leon LA, Gardner SD, *et al*. AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am. J. Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: 803 – 810. ; DOI:10.1152/ajprenal.90269.2008.

- Liu Ti, Lubin ML, Reitz TL, Wang Y, Colburn RW, *et al.* Molecular identification and functional characterization of a temperature-sensitive transient receptor potential channel (TRPM8) from canine. *European J. Pharm.* 2006; 530: 23 – 32.
- Mälkiä A, Morenilla-Palao C, Viana F. The Emerging Pharmacology of TRPM8 Channels: Hidden Therapeutic Potential Underneath a Cold Surface. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2011; 12: 54 – 67.
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 2002; 416: 52–58.
- Myers BR, Sigal YM, Julius D. Evolution of Thermal Response Properties in a Cold-Activated TRP Channel. *PLoS ONE.* 2009; 4 (5): e5741. DOI: 10.1371/journal.pone.0005741.
- Montell C, Rubin GM. Molecular Characterization of the *Drosophila trp* Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. *Neuron.* 1989; 2: 1313-1323. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90069-x.
- Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient Receptor Potential Channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2011; 10: 601 – 620. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd3456>.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55–63.
- Motulsky HJ. Confidence intervals of parameters, GraphPad Curve Fitting Guide [Internet]. [Consultado el 15 Mayo 2021]. Disponible en: [http://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg\\_standard\\_errors\\_and\\_confidence.htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_standard_errors_and_confidence.htm).
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, *et al.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002; 108: 705–715.
- Pérez de Vega M, 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.* 2016; 59 (22): 10006-10029. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00305.
- Pertusa M, Rivera B, González A, Ugarte G, Madrid R. Critical role of the pore domain in the cold response of TRPM8 channels identified by ortholog functional comparison. *J. Biol. Chem.* 2018; 293 (32): 12454 – 12471. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002256.

- Rosasco MG, Gordon SE. TRP Channels: What Do They Look Like?. En: Rosenbaum Emir TL, editor. *Neurobiology of TRP Channels*. 1ª ed. Londres: Taylor and Francis Group; 2018. p 1-10.
- Sherkheli MA, Gisselmann G, Vogt-Eisele A, Doerner JF, Hatt H. Menthol derivate WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels. *Pak J Pharm Sci*. 2008; 21 (4): 370-8.
- Silverman HA, Chen A, Kravatz NL, Chavan SS, Chang EH. Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 590161. DOI: 10.3389/fimmu.2020.590261.
- Tolcher A, Patnaik A, Papadopoulos K, Mays T, Stephan T, *et al*. 376 Preliminary results from Phase 1 study of D-3263 HCl, a TRPM8 calcium channel agonist, in patients with advanced cancer. *European Journal of Cancer Supplements*. 2010; 8 (7): 119. DOI: 10.1016/s1359-6349(10)72083-8.
- Tsagareli MG, Nozadze I. An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behavioural Pharmacology*. 2020; 31 (5): 413-434. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000524.
- Tsvaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*. 2001; 61: 3760–3769.
- Venkatachalam K, Luo J, Montell C. Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. En: Nilius B, Flockerzi V, editores. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. Vol 222. 2ª ed. Berlín: Springer; 2014. p 1- 15.
- Voets T. TRP Channels and Thermosensation. En: Nilius B, Flockerzi V, editores. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. Vol 223. 2ª ed. Berlín: Springer; 2014. p 729- 743.
- VWR [Internet]. FORTUNE; c2021. [Consultado el 07 de Junio de 2021]. Disponible en: <https://es.vwr.com/store/product/23567594/icilin-97-by-tlc>.
- Wang H, Siemens J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature*. 2015; 2 (2):178-187. DOI: <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1040604>.

- Winchester WJ, Gore K, Glatt S, Petit W, Gardiner JC, *et al.* Inhibition of TRPM8 Channels Reduces Pain in the Cold Pressor Test in Humans. *J. Pharm. Exp. Therap.* 2014; 351 (29); 259 – 269. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.114.216010>.
- Yang JM, Li F, Liu Q, Rüedi M, Wei ET, *et al.* A novel TRPM8 agonist relieves dry eye discomfort. *BMC Ophthalmology.* 2017; 17: 101. DOI: 10.1186/s12886-017-0495-2.
- Liu Y, Qin N. TRPM8 in Health and Disease: Cold Sensing and Beyond. *Advances in Experimental medicine and biology.* 2011; 704; 185 – 208.
- Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee SY. Structure of the cold- and menthol- sensing ion channel TRPM8. *Structural Biology.* 2018; 359: 237- 241. DOI: 10.1126/science.aan4325.
- Yu H, Li M, Wang W, Wang X. High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2016; 37: 37 – 43. DOI: 10.1038/aps.2015.108.