



Universidad Miguel Hernández de Elche  
Máster universitario en Biotecnología y Bioingeniería  
Trabajo Final de Máster

---

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
NUEVOS MODULADORES DE TRPM8**

---

**Autora:**

Jenny Moya Arízaga

**Directora:**

Asia Fernández Carvajal

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología  
Sanitaria de Elche

Curso 2019-20



**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.

CERTIFICA

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. Jenny Moya**

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 06 de julio de 2020.

Fdo.: Prof. Asia Fernández Carvajal

## Resumen

---

Los receptores de potencial transitorio (TRP) están constituidos por 8 subfamilias de canales iónicos con diferentes grados de homología y permeabilidad a cationes, que desempeñan papeles críticos en la respuesta ante estímulos externos. Este estudio se centra en el canal TRPM8, conocido termorregulador implicado en la transducción sensorial de diversos estímulos. Varios estudios han demostrado que la expresión desregulada de este canal está asociada con el desarrollo de diversas patologías. A pesar de todos los avances en su investigación, los moduladores específicos de TRPM8 son aún una necesidad clínica insatisfecha. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue caracterizar una serie de compuestos derivados de triptaminas sintetizados químicamente, como moduladores de TRPM8, mediante ensayos de cribado, potencia, citotoxicidad y especificidad en modelos *in vitro*. Los compuestos con las mejores propiedades farmacológicas, alta potencia y baja citotoxicidad fueron C5 ( $IC_{50} = 0.4 \pm 1.5 \mu M$ ) y C8 ( $IC_{50} = 0.4 \pm 1.1 \mu M$ ). Todos los derivados de triptamina testados generaron un antagonismo específico en TRPM8, lo que confirmó la relevancia de esta configuración en el desarrollo de futuros moduladores del canal. Finalmente, la caracterización completa de los mejores antagonistas mediante ensayos electrofisiológicos permitirá la continuación en estudios preclínicos y clínicos futuros.

---

**Palabras clave:** TRP, canales iónicos, TRPM8, antagonistas, triptaminas.

## Abstract

---

Transient potential receptors (TRPs) are a group of eight ion channel subfamilies based on sequence homology and cation permeability, which play critical roles in the responses of external stimuli. This study is focused on TRPM8, a well-known thermoregulator channel involved in sensory transduction of different stimuli. Several studies have found that the TRPM8 dysregulation is associated with diverse pathologies development. Although all the research advances, TRPM8 specific modulators still are a clinical need. Therefore, the objective of this study was to characterize eight compounds derived from tryptamines, chemically synthesized, as modulators of TRPM8, through screening, potency, cytotoxicity, and specificity tests by *in vitro* techniques. Compounds with the best pharmacological properties were C5 ( $IC_{50} = 0.4 \pm 1.5 \mu M$ ) and C8 ( $IC_{50} = 0.4 \pm 1.1 \mu M$ ). All tryptamine derivatives tested induced specific antagonism in TRPM8, which highlight the relevance of this configuration in future modulators development. Finally, the complete characterization of best antagonists by electrophysiological characterization it's the key for further development into preclinical and clinical studies.

---

**Keywords:** TRP, cation channel, TRPM8, antagonist, tryptamine.

## Contenido

---

Resumen .....	2
Abstract .....	4
Índice de figuras .....	6
Abreviaturas .....	7
1. Introducción .....	8
1.1 Superfamilia de canales TRP.....	8
1.2 Termo TRPs.....	9
1.3 Canal TRPM8.....	11
1.3.1 Estructura molecular de TRPM8 .....	12
1.3.2 Regulación de TRPM8 .....	15
1.3.3 Implicación en condiciones patológicas .....	17
2. Antecedentes y objetivos.....	20
3. Procedimiento experimental.....	24
3.1 Sistemas celulares.....	24
3.2 Cribado y medición de actividad mediante técnicas fluorimétricas.....	24
3.3 Ensayos de Potencia .....	26
3.4 Ensayo de viabilidad celular MTT .....	26
3.5 Ensayos de especificidad.....	27
3.6 Transfección .....	28
4. Resultados .....	29
4.1 Cribado de compuestos.....	29
4.2 Dosis Respuesta.....	31
4.3 Especificidad .....	33
4.4 Ensayos de especificidad en TRPA1 .....	35
4.5 Ensayos de Viabilidad celular .....	36
5. Discusión.....	38
6. Conclusiones y perspectivas futuras .....	42
7. Bibliografía.....	44

## Índice de figuras

---

Figura 1. Diagrama esquemático de canales TRP.....	9
Figura 2. Representación esquemática de los canales termo-TRP en mamíferos.....	10
Figura 3. Los canales TRP como nociceptores. ....	10
Figura 4. Representación de la estructura molecular de TRPM8.....	14
Figura 5. Figura representativa de un agonista (mentol 100 $\mu$ M) y un antagonista (AMTB 10 $\mu$ M) en HEK 293 TRPM8. ....	25
Figura 6. Ensayo representativo de la acción de C8 sobre el canal TRPM8 a 5 $\mu$ M. ....	29
Figura 7. Resultados del cribado de los 8 compuestos en el modelo de TRPM8. ....	30
Figura 8. Representación de las curvas de dosis respuesta obtenidas para C2, C4, C6 y C8. .	31
Figura 9. Ensayo representativo de TRPV1 en respuesta a C8 a 5 $\mu$ M. ....	33
Figura 10. Resultados de la caracterización de los 8 compuestos en HEK 293 TRPV1..	34
Figura 11. Ensayo representativo del efecto de C8 a 5 $\mu$ M en el canal TRPV1.....	34
Figura 12. Resultados de los ensayos de citotoxicidad para C4, C5, C6, C7 y C8.....	36



UNIVERSITAS  
*Miguel Hernández*

## Abreviaturas

**Ad5:** Adenovirus tipo 5

**AM1241:** (2-yodo-5-nitrofenil) - [1 - [(1-metilpiperidin-2-il) metil] indol-3-il] metanona

**AM630:** [6-yodo-2-metil-1- (2-morfolin-4-ilet) indol-3-il] - (4-metoxifenil) metanona

**AMTB:** N- (3-aminopropil) -2 - [(3-metilfenil) metoxi] -N- (tiofen-2-ilmetil) benzamida

**BCTC:** N- (4-terc-butilfenil) -4- (3-cloropiridin-2-il) piperazina-1-carboxamida

**CBD:** Cannabidiol

**CBG:** Cannabigerol

**CTPC:** ácido 1-lambda1-oxinil-2,2,5,5-tetrametilpirrol-3-carboxílico

**DAG:** Diacilglicerol

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DO:** Densidad óptica

**DRG:** Dorsal root ganglion

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**FBS:** Suero fetal bovino

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media máxima

**IP3:** Inositol trifosfato

**LB:** Caldo de cultivo Luria Bertani

**LPL:** Lisofosfolípidos

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

**MWC:** Monod-Wyman-Changeux Model

**NADA:** N-Arachidonoyl dopamina

**NEM NEAA:** Solución de aminoácidos no esenciales

**NF-M:** Neurofilamentos M

**OPRM:** Receptores de opioides  $\mu$

**PGE2:** Prostaglandina E2

**PIP2:** Fosfatidilinositol 2,4-bifosfato

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PLA2:** Fosfolipasa A2

**PLC:** Fosfolipasa C

**PolyP:** Polifosfato

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados

**RIPA:** Radioimmunoprecipitation assay buffer

**SARS CoV-2:** Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave

**SN2:** Sustitución nucleofílica bimolecular

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido simple

**THC:** Tetrahidrocannabinol

**TNBS:** Ácido picrisulfónico

**TRP:** Transient receptor potential

**TRPA:** Transient receptor potential ankyrin

**TRPC:** Transient receptor potential canonical

**TRPML:** Transient receptor potential mucolipins

**TRPN:** Transient receptor potential nompC

**TRPP:** Transient receptor potential polycystins

**TRPV:** Transient receptor potential vanilloid

**TRPY:** Transient receptor potential yeast



## 1. Introducción

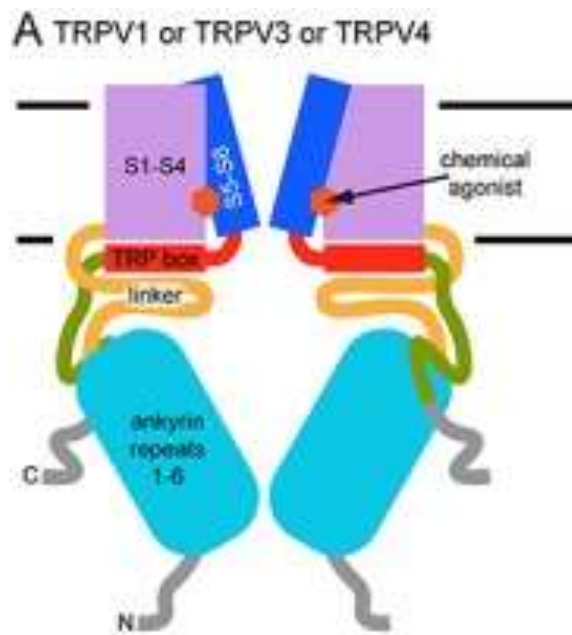
---

### 1.1 Superfamilia de canales TRP

La superfamilia de canales TRP (Transient Receptor Potential) tiene su origen en las observaciones de Consens y Manning en 1969, de un mutante de *Drosophila* con disfunción hacia la detección de luz, que fue explicada por alteraciones de un canal de cationes no selectivo, posteriormente se encontraron homólogos del canal TRP de *Drosophila* en mamíferos<sup>1</sup>. Con el descubrimiento de entidades similares, estos canales se constituyeron como una gran familia, de más de 30 miembros con diferentes grados de homología y permeabilidad a cationes. Se han agrupado en 8 subfamilias según las estructuras primarias de sus aminoácidos y el miembro original descrito inicialmente: TRPA (ankyrin), TRPC (canonical), TRPML (mucolipins), TRPP (polycystins) y TRPV (vanilloid). Además de los canales TRPN (nompC de *Drosophila*) y TRPY (yeast) ausentes en mamíferos<sup>2</sup>.

Todos los canales TRP muestran diversas selectividades, características polimodales y mecanismos de activación heterogéneos. Desempeñan papeles críticos en las respuestas ante estímulos externos, tales como la luz, el sonido, las sustancias químicas, la temperatura y el tacto<sup>3</sup>. Son canales catiónicos, homo o hetero tetrámeros, que permiten el flujo de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ) en función de sus gradientes electroquímicos. Este flujo incrementa las concentraciones de cationes intracelulares y despolariza a la célula<sup>4</sup>.

Los canales TRP son estructuralmente similares, tienen una configuración tetramérica con seis regiones transmembrana (S1 a S6) y una región formadora del poro entre S5 y S6. Además, contienen de tres a cuatro repeticiones de anquirina, dominios en espiral en los extremos N y C, una región rica en prolina en el C-terminal y otra de unión a calmodulina/IP3 en el dominio llamado TRP<sup>5</sup> (Fig. 1). Este dominio, comprende 25 aminoácidos situados en la región C-terminal, relacionados con la regulación y empaquetamiento del canal<sup>6</sup>. Mediante criomicroscopía electrónica fue posible dilucidar las estructuras de varios canales TRP y algunas características que son clave para su funcionalidad.

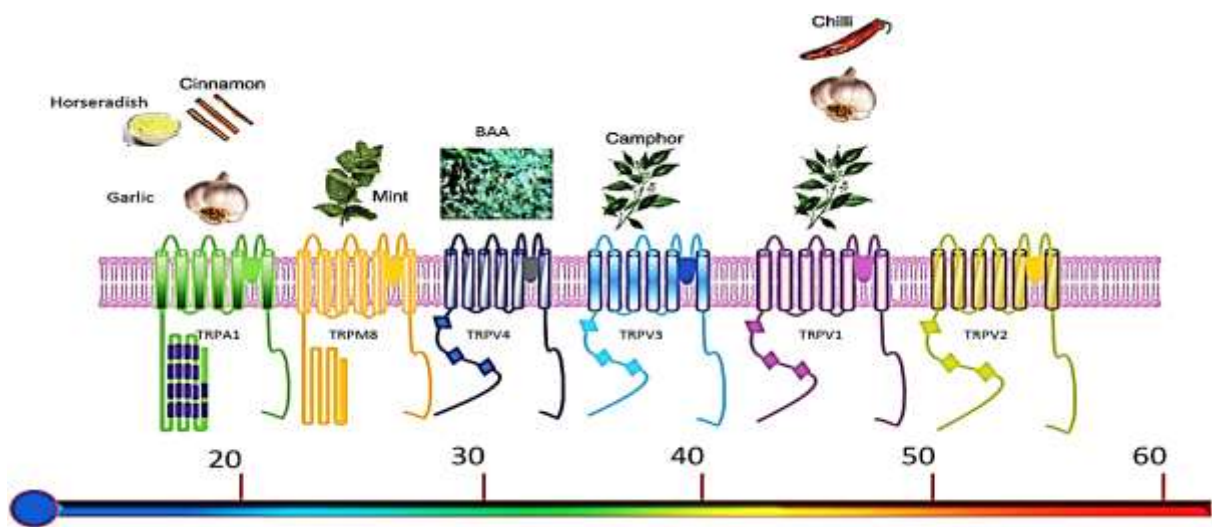


**Figura 1. Diagrama esquemático de canales TRP<sup>7</sup>.** Se muestran dos subunidades de las cuatro estructuras tetraméricas, cada una de ellas está constituida por el dominio citoplasmático N-terminal (turquesa), enlazador (amarillo), dominios transmembrana S1-S4 (lila) y S5-S6 (azul), dominio TRP (rojo), C-terminal (verde), y extensiones flexibles de N o C-terminal (gris). Se presenta también el sitio de unión a un agonista químico en la interfaz de regiones S1-S4 y S5-S6 (círculos rojos)<sup>4</sup>.

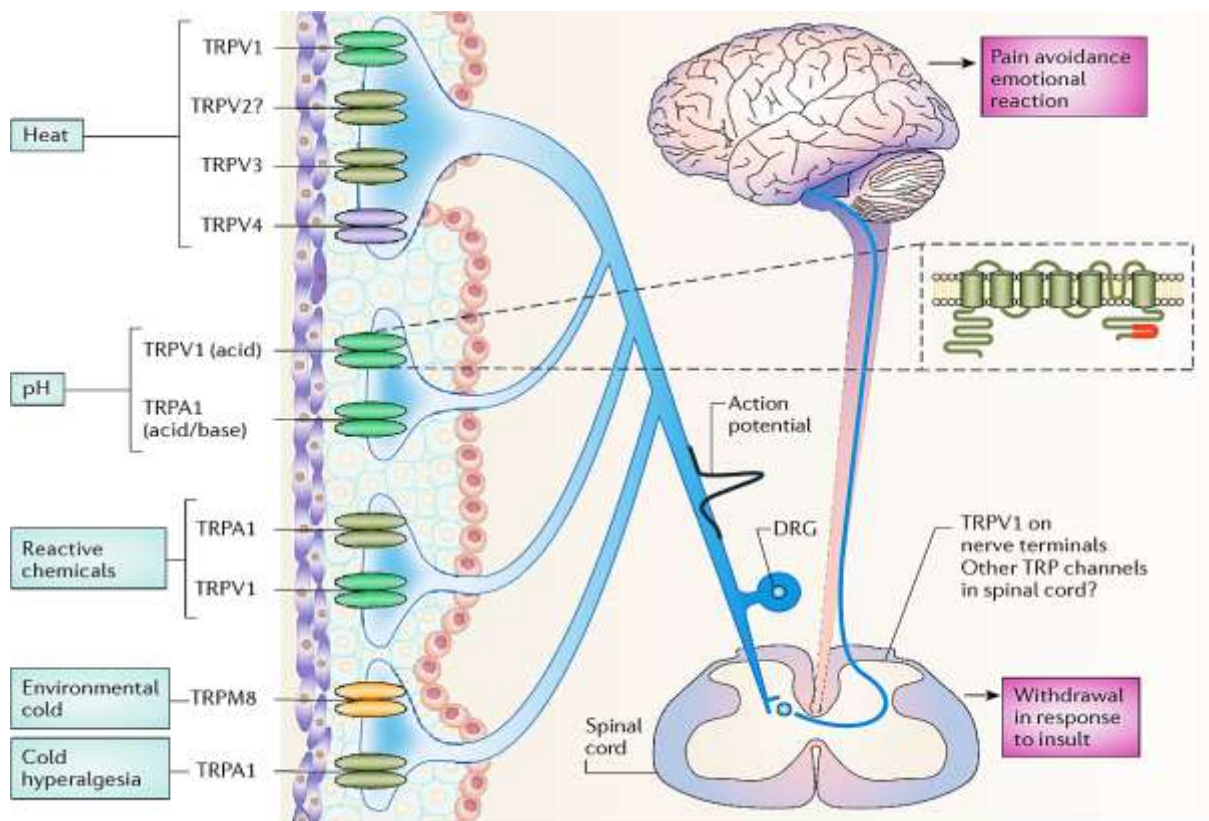
## 1.2 Termo TRPs

Se ha determinado que los canales TRP tienen un papel fundamental en la transducción sensorial térmica. Su análisis ha permitido la comprensión de los mecanismos de detección y percepción de estímulos dolorosos, y de la sensibilización provocada por lesiones externas<sup>9</sup>. Los seis canales implicados son TRPV1/4, TRPM8 y TRPA1 que se expresan en neuronas sensoriales, nociceptores aferentes primarios y se activan a temperaturas específicas en el rango de calor nocivo, hasta frío doloroso.

Las neuronas sensoriales primarias presentes en las fibras sensitivas que inervan las regiones de tronco y cabeza, captan los estímulos térmicos, y los convierten en señales eléctricas, que llegan hacia la médula espinal. Se produce la sinapsis y mediante el tracto espino talámico (cuando la señal es dolorosa) la comunicación neuronal atraviesa el tálamo y alcanza finalmente la corteza somato sensorial, donde la información es analizada (Fig. 3). Los canales termo TRP son capaces de detectar además de las variaciones de temperatura, cambios químicos y mecánicos del ambiente, por lo que se consideran integradores moleculares de múltiples modalidades sensoriales<sup>10</sup>.



**Figura 2.** Representación esquemática de los canales termo-TRP en mamíferos. Cada canal presenta distintos umbrales térmicos y se activa en función de compuestos naturales y sustancias sintéticas<sup>11</sup>.



**Figura 3.** Los canales TRP como nociceptores<sup>10</sup>. Las neuronas sensoriales primarias aferentes expresan varios canales TRP. Cada canal se activa en función de diversos estímulos permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y desencadenando potenciales de acción. Algunos de estos canales, como TRPV1, pueden expresarse también en la médula espinal.

Las alteraciones en los canales termo TRP debido a estímulos dañinos, mutaciones o desensibilización, se han relacionado con la desregulación de la percepción de frío y calor nocivo, y estados patológicos como el dolor crónico de origen neuropático, la migraña y otros déficits sensoriales. Por lo tanto, los TRP nociceptivos son objetivos terapéuticos atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos.

### 1.3 Canal TRPM8

La subfamilia de TRPM de mamíferos está conformada por ocho miembros (TRPM1/8), que a diferencia de las subfamilias TRPC y TRPV, carecen de repeticiones de anquirina en el extremo N-terminal. El primer canal de esta familia identificado en mamíferos fue TRPM1, que se denominó melastatina debido a su localización en un gen expresado en melanocitos, involucrado en la aparición de melanomas<sup>12</sup>. Mientras que TRPM8 ha sido uno de los canales más estudiados por su implicación como sensor primario del frío en humanos<sup>13</sup>.

TRPM8 es un canal no selectivo permeable a  $Ca^{2+}$ , que se activa por temperaturas menores a 28 °C, presión, voltaje, compuestos como el mentol, la icilina, el eucalipto y varios agentes sintéticos. En humanos, el gen de TRPM8 está localizado en la región 2q37.1 del cromosoma 2, abarca 102.124 bases y contiene 25 exones. Se transcribe en un ARN mensajero que codifica una proteína de 1104 aminoácidos. Se han descrito varias isoformas, pero no todas están caracterizadas aún<sup>14</sup>.

Originalmente, este canal fue identificado en el tracto urogenital masculino y tejido prostático. Sin embargo, se ha encontrado expresión alta en tejido vascular, células del epitelio pulmonar, miocitos arteriales, útero, placenta, en el hígado, la piel, los ojos e inclusive en melanocitos humanos<sup>14</sup>.

En los últimos años, mediante estudios funcionales y morfológicos se ha encontrado que TRPM8 está expresado fuertemente en una subpoblación de neuronas sensoriales primarias dentro de la raíz dorsal (DRG), ganglios del trigémino (TG) y en los nervios sensoriales. Como estas terminaciones nerviosas regulan las distintas percepciones de frío y dolor, se ha relacionado la expresión de TRPM8, con una amplia gama de funciones sensoriales.

### 1.3.1 Estructura molecular de TRPM8

Tanto la estructura molecular, como los mecanismos implicados en la activación de TRPM8 se han construido con el paso de los años. Estas deducciones se han logrado debido a la información publicada sobre otros canales TRP. La arquitectura del canal y los sitios de unión de sus ligandos se han podido visualizar mediante análisis de las estructuras obtenidas con el modelado molecular y la criomicroscopía.

TRPM8 presenta 6 dominios transmembrana con C y N-terminales citoplasmáticos y un ensamblaje homo tetramérico de cuatro subunidades<sup>15</sup> (Fig. 4A). El poro de TRPM8 está formado por las subunidades S5 y S6. Todos los miembros de la familia TRPM presentan una región de alrededor de 700 aminoácidos junto a la hélice superenrollada (coiled-coil) en la región del N-terminal y un dominio TRP en el C-terminal. Este dominio contiene una región de 23-25 residuos de aminoácidos denominada EWKFAR TRP-box1 y una región TRP-box2 de prolina localizada cerca de los seis dominios transmembrana en la región citoplasmática<sup>16</sup>.

En la región C-terminal del dominio TRP se encuentra el sitio de unión para fosfatidilinositol 2,4-bisfosfato (PIP2) y la región relacionada con la apertura del canal. Mientras que en la región N-terminal se presentan varios sitios de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA) y un segmento entre los residuos 40-86 relacionado con la localización plasmática y la estabilización de la proteína. En el residuo Tyr del segmento S2 se produce la unión con el mentol, mientras que la interacción con icilina se produce en residuos específicos de la región S3.

Los análisis de criomicroscopía (Fig. 4B) han permitido visualizar los segmentos del dominio TRP. En la región N-terminal se encuentra la zona de regulación del calcio que comprende cuatro residuos cargados negativamente (Glu773, Gln776, Asn790 y Asp793) en las hélices transmembrana S2 y S3 junto al sitio de unión al ligando<sup>17</sup>. Estos sitios de unión son maleables, pueden adoptar diferentes conformaciones y adaptarse a estructuras diversas debido a movimientos sutiles de la cadena lateral. Por lo que esta flexibilidad local podría favorecer la solubilidad y disponibilidad de los ligandos del canal TRPM8<sup>18</sup>.

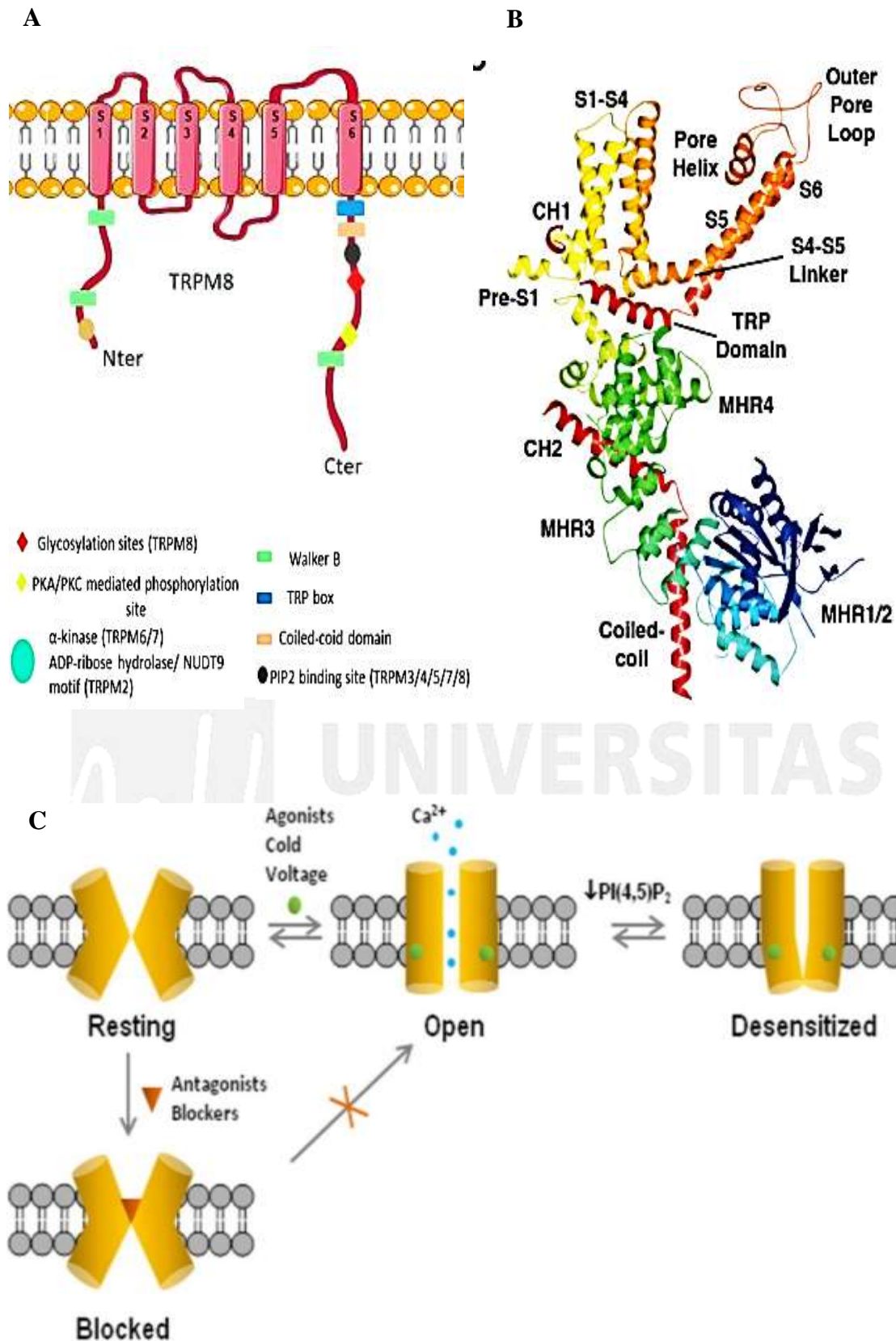
Los canales TRPM8 pueden presentarse en tres estados: (Fig. 4C) abierto (conductor), cerrado (no conductor) y desensibilizado (inactivo). La apertura del canal depende de una activación polimodal determinada por los diferentes estímulos mencionados previamente. Cuando el canal se abre genera permeabilidad a sodio, calcio, cesio y potasio, debido a la carga negativa de la región S6, que modula la preferencia por cationes<sup>19,20</sup>.

Existen varios modelos para describir el acoplamiento entre el sitio de unión de un agonista para que se produzca la apertura del canal. Inicialmente se describió un modelo mediante una compuerta de dos estados, donde la temperatura fría genera un cambio en la dependencia del voltaje y la activación del canal<sup>21</sup>. Más adelante, se describió un modelo alostérico de activación basado en reacciones equilibradas, donde los estímulos mediados por el voltaje y por la temperatura, incrementan la apertura del canal, tanto de forma combinada como de forma individual, a través de interacciones alostéricas<sup>20</sup>.

Se ha postulado que los sensores de voltaje, de agonistas químicos y de temperatura están ubicados en diferentes dominios de la proteína. Esta idea concuerda con el mecanismo de activación de TRPM8 planteado por otros autores, ya que algunas mutaciones del canal tienen efecto en la activación por mentol, pero no ante la temperatura fría<sup>22</sup>, lo que sugiere que los dominios implicados en la activación por mentol o por estímulos térmicos, serían diferentes.

En los últimos años, se ha planteado que la regulación se puede describir mediante el modelo “Monod-Wyman-Changeux” (MWC) que combina los efectos del voltaje, la temperatura y el mentol para predecir la activación de TRPM8. Este modelo plantea que las proteínas reguladas, presentan estados interconvertibles en ausencia de su regulador. Y la relación entre los diferentes estados conformacionales se determina mediante equilibrio térmico<sup>23</sup>.

Los agonistas de TRPM8 desplazan la curva de activación de voltaje hacia potenciales más negativos y hacia temperaturas más altas, lo que incrementa la probabilidad de apertura del canal y genera potenciales de membrana fisiológicos<sup>24</sup>. Los agonistas conocidos de TRPM8 son el frío, el mentol y sus derivados; pero el canal también puede activarse mediante compuestos refrescantes como la icilina, el eucalipto y compuestos de origen sintético como WS12, WS148, W30, CPS113, CPS369, Frescolat (ML y MGA), compuestos químicos volátiles como hidroxicitronelal, heliotropil, y acetona<sup>14</sup>. Es importante destacar que gran parte de estos agonistas son efectivos solamente con concentraciones elevadas y presentan baja especificidad.



**Figura 4. Representación de la estructura molecular de TRPM8.** (A) Diagrama esquemático de la proteína TRPM8 y sus dominios<sup>17</sup>. (B) Representación mediante criomicroscopía de un monómero en estado desensibilizado de TRPM8. Se aprecia la estructura secundaria de la proteína, con los dominios N-terminal (en azul) y C-terminal (en rojo)<sup>18</sup>. (C) Canales TRPM8 en estados de reposo, abierto, desensibilizado y bloqueado<sup>25</sup>.

Por otro lado, se han identificado diversos antagonistas para TRPM8. Entre estos se encuentran medicamentos como fenantrolina, capsazepina, BCTC, thio-BCTC, CTPC y derivados de urea, aunque con baja especificidad. Otros moduladores del canal son el etanol a concentraciones de 0.5-3%, varios derivados de metilamina<sup>14</sup> y el AMTB, que inhibe las respuestas provocadas por la icilina de forma moderada, en TRPM8, TRPV1 y TRPV4<sup>26</sup>.

El mecanismo de modulación mediante antagonistas no se encuentra estudiado del todo, pero se postula que los moduladores alostéricos negativos desplazan la activación de voltaje hacia potenciales más positivos, lo que elimina los efectos despolarizantes de la temperatura o de los agonistas químicos<sup>27</sup>.

Además, se está estudiando la administración de cannabinoides como antagonistas de TRPM8. Entre estos se encuentran endocannabinoides como Anandamida (AEA) y N-Arachidonoyl dopamina (NADA) que regulan el canal tras la activación por mentol o icilina, a nivel submicromolar. Otros antagonistas de este tipo son el tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG) y algunos compuestos de origen sintético derivados de aminoalquilindol como AM630 y AM1241<sup>28</sup>.

Cuando TRPM8 se expone de forma prolongada ante los agonistas, se limita la capacidad de conducir iones y la entrada del canal se cierra<sup>29</sup>, generando el estado desensibilizado (inactivo) mediante una regulación negativa dependiente de calcio. Si la exposición continúa por largos periodos de tiempo se puede generar taquifilaxia, que reduce gradualmente la respuesta ante los agonistas<sup>30</sup>.

### **1.3.2 Regulación de TRPM8**

Aunque el conocimiento sobre la estructura del canal ha avanzado, el entendimiento sobre su comportamiento no está claro del todo. Este hecho se debe principalmente a que TRPM8 es una proteína de transmembrana, por lo que interactúa con una serie de ligandos intra y extracelulares que median los mecanismos de transducción del receptor. Se ha observado que el frío y diversos agonistas actúan sobre el canal, sin embargo, la complejidad de comportamiento de la proteína y la influencia del entorno celular solamente han permitido generar hipótesis sobre las vías por las que diversos reguladores modulan la función de TRPM8 a nivel celular.

Uno de los mecanismos que determinan la función y la alteración de la sensibilidad del canal es la fosforilación/desfosforilación mediada por las proteínas quinasas A y C (PKA y PKC). Cuando la PKC está activa, inhibe la actividad de TRPM8 a través de una desfosforilación



reversible y dependiente de calcio, mediante la enzima serina-treonina fosfatasa. Algunos inhibidores selectivos de PKC, como la braquinina, PGE2 e histamina, reducen la respuesta del canal tras la activación por frío o por mentol. Mientras que algunos activadores de PKA modulan la actividad de TRPM8 tras la activación por icilina mediante fosforilación en los residuos Ser9 y Thr17 del extremo N-terminal<sup>14</sup>.

En ausencia de estímulos químicos y térmicos, TRPM8 puede activarse mediante PIP2<sup>31</sup> mediante la interacción de su carga negativa con regiones con cargas positivas del dominio TRP del C-terminal. La entrada de Ca<sup>2+</sup> activa a la enzima fosfolipasa C (PLC) que hidroliza PIP2 hacia 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 permite la liberación del Ca<sup>2+</sup> y DAG es un activador de la PKC<sup>32,33</sup>. La síntesis de PIP2 mantiene la función del canal, mientras que la hidrólisis o las bajas concentraciones hacen que la función se anule, por un cambio en la activación, que desplaza la dependencia del voltaje hacia potenciales más positivos<sup>34</sup>.

La presencia de calcio regula los mecanismos de desensibilización de TRPM8 y depende de la activación mediada por PLC o la hidrólisis de PIP2 cerca del canal<sup>34</sup>. La desensibilización aguda se produce por interacción del canal con calmodulina, mientras que la taquifilaxia depende de la fosforilación mediante PLC o PKC y agotamiento de PIP2. A mayor concentración de cationes divalentes extracelulares, la dependencia del voltaje de activación se desplaza hacia potenciales más positivos<sup>14</sup>.

Algunos moduladores endógenos del canal son los lisofosfolípidos (LPL) y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)<sup>14</sup>. Estos moduladores participan aguas abajo de la regulación mediada por la fosfolipasa A2 (PLA2) y pueden modular la sensibilidad al frío, icilina y el mentol al reprimir la función del canal<sup>35</sup>. Las enzimas PLA2 eliminan la cadena de acilo en la posición SN2 de fosfolípidos y generan ácido araquidónico y lisofosfolípidos, que son ácidos grasos poliinsaturados capaces de cambiar el umbral de temperatura de TRPM8<sup>36</sup>.

A su vez, algunos polifosfatos (PolyP) pueden modular la actividad de TRPM8, al formar complejos con otros polímeros endógenos y asociarse a las proteínas de membrana. Aunque el mecanismo no se ha caracterizado del todo, se cree que esta modulación se genera mediante la formación de un enlace covalente, que no depende de los niveles de PIP2 o de la degradación de la proteína<sup>37</sup>.

Inclusive, la activación prologada de ligandos contra los receptores de opioides  $\mu$  (OPRM), localizados en el cerebro y la médula espinal, genera reducción en la actividad de TRPM8,

mediante la internalización progresiva del canal cuando forma un complejo con el receptor OPRM1<sup>38</sup>.

Finalmente, TRPM8 puede modularse por la compartimentación de la membrana plasmática mediante un mecanismo determinado por el agotamiento de colesterol que genera respuestas mayores del canal ante el mentol y el frío, lo que activa TRPM8 hacia potenciales más negativos y desplaza el umbral de temperatura, provocando la sensibilización del canal hacia la temperatura por debajo del nivel fisiológico<sup>39</sup>.

### 1.3.3 Implicación en condiciones patológicas

Varios estudios han demostrado que TRPM8 está implicado en diferentes patologías. Cuando TRPM8 se activa puede generar despolarización de las terminaciones nerviosas, lo que permite percibir los estímulos del ambiente, pero también sensaciones dolorosas. La expresión desregulada del canal también se ha implicado en la migraña, cáncer, además de diversas patologías y procesos inflamatorios, que se describen a continuación:

La implicación de TRPM8 en la migraña se ha analizado en varios estudios. La migraña es un dolor de cabeza pulsátil recurrente que afecta la calidad de vida de quienes lo padecen y comúnmente se presenta junto a alodinia cutánea al frío. Se cree que tanto TRPM8 como TRPV1 participan en el equilibrio de la temperatura corporal a nivel basal. Si existe desregulación, se pueden generar desequilibrios transitorios de incremento en la temperatura (hipertermia) o de descenso de temperatura (hipotermia) cuando los canales se activan, lo que produce la sensación dolorosa. Se ha determinado que algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), no codificantes o dentro del gen *TRPM8* (rs10166942 [C] y rs17862920 [T]) inducen una sensibilidad menor ante los estímulos fríos, lo que genera protección. Por lo que se cree que el uso de antagonistas de TRPM8 podría modular la temperatura corporal, reducir la migraña y el dolor debido al frío, en pacientes que no presentan este alelo protector<sup>40</sup>.

Algunos estudios en modelos animales han analizado el papel de TRPM8 en la analgesia. En un modelo de ratón se ha observado que el silenciamiento de TRPM8 impide el desarrollo de trastornos de mayor sensibilidad al frío (alodinia), mientras que cuando el trastorno se ha desarrollado, la aplicación de agonistas del canal genera efecto analgésico<sup>41</sup>. Otros experimentos han demostrado que el silenciamiento de TRPM8 provoca deficiencia para detectar temperaturas frías y un fenotipo defectuoso de respuesta ante el frío normal o hipersensibilidad debido a lesiones<sup>25</sup>. En modelos animales de dolor neuropático, dolor

inflamatorio y dolor crónico también se ha determinado que la activación mediante agonistas de TRPM8, como mentol o icilina, disminuye la sensación nociceptiva y produce efectos antiinflamatorios en un modelo de ratón con colitis inducida químicamente (DSS y TNBS)<sup>42</sup>.

La función de los canales TRPM8 también se ha relacionado con la mitigación del dolor oncológico. Se ha reportado que en pacientes con cáncer que han sido tratados con oxaliplatino, se genera mayor sensibilidad al mentol debido a la actividad potenciada de TRPM8. En este sentido, la aplicación de mentol tópico ha generado efecto analgésico también en pacientes con neuropatía periférica inducida por quimioterapia y en pacientes con el síndrome de dolor post mastectomía, con una reducción del puntaje de dolor de un 82% luego de 4-6 semanas de tratamiento<sup>25</sup>. Además, se ha observado que la aplicación de mentol tópico genera mejores respuestas sobre el umbral de dolor mecánico y disminuye la alodinia al frío en pacientes quimioterapéuticos tratados con bortezomib<sup>43</sup>.

Inclusive se han observado efectos analgésicos frente a la irritación respiratoria que provocan algunos componentes del humo de cigarrillo. Varios agonistas de TRPM8 regulan las respuestas de irritación sensorial frente a algunos aldehídos insaturados, terpenos y muchos irritantes respiratorios que están en el humo del cigarrillo. En un modelo de ratón se ha comprobado que la exposición a mentol o eucalipto disminuye la irritación, mientras que la aplicación de AMTB, atenúa el efecto contrairritante. La administración errónea de agonistas de TRPM8 podría facilitar la inhalación del humo, promoviendo la adicción a la nicotina y el tabaquismo<sup>44</sup>. En efecto, otros estudios han determinado que la estimulación desregulada de los canales TRPM8 puede generar un efecto dañino en pacientes con asma o con enfermedades crónicas pulmonares<sup>25</sup>.

La regulación positiva de la expresión de TRPM8 se ha relacionado con varios tipos de cáncer. Se ha encontrado sobreexpresión del gen en diferentes tejidos neoplásicos de próstata, de mama, de colon, de pulmón y de piel. Mediante estudios en líneas celulares estables y en tejidos de pacientes, se ha identificado inclusive la regulación positiva de TRPM8 en neuroblastoma, osteosarcoma, carcinoma urotelial y carcinoma escamoso oral humano<sup>25</sup>. Todos estos hallazgos han contribuido al estudio de esta proteína como marcador pronóstico o para el diagnóstico tumoral. Los niveles de ARNm de TRPM8 en sangre y orina se han usado para diagnosticar si el cáncer de próstata está clínicamente localizado o se ha producido metástasis<sup>45</sup>, lo que resulta esencial para la aplicación de tratamientos oportunos.

La relación de TRPM8 con la termorregulación también ha sido estudiada. La interrupción de la maquinaria del ritmo circadiano se ha asociado con diversos síndromes metabólicos. Se ha determinado en un modelo *in vivo* de ratón que el canal modula el comportamiento alimentario y el uso de combustible celular cuando se producen ajustes termorreguladores frente al frío leve, estos desequilibrios continuos resultan en obesidad, disfunción metabólica, hiperfagia diurna y reducción de la oxidación de grasas<sup>46</sup>. Por lo tanto, se estudia la modulación de TRPM8 como mecanismo para contrarrestar el aumento de peso mediante el incremento de la termogénesis y activación de los genes del ritmo circadiano<sup>47</sup>.

TRPM8 tiene un papel en la fisiopatología de la disfunción de la vejiga. A pesar de los múltiples estudios que se han desarrollado con el paso de los años, aun no existe un tratamiento efectivo para el síndrome de vejiga dolorosa (cistitis intersticial) o para el síndrome de la vejiga hiperactiva, caracterizado por una necesidad recurrente por orinar que puede llevar hasta incontinencia. Se ha propuesto que los receptores fríos del tracto urinario participan en la regulación y mantenimiento de la temperatura. Un estudio *in vivo* ha demostrado que en las fibras nerviosas de animales con síndrome de vejiga dolorosa existe alta expresión de TRPM8, y la administración del agonista del canal, AMTB ha disminuido la frecuencia de las contracciones de la vejiga en un modelo de rata<sup>48</sup>. Otro estudio ha demostrado que en pacientes con sobreactividad idiopática del detrusor, existe incremento de la expresión del canal, lo que se asoció con contracciones involuntarias de vejiga constantes y reducción del umbral de respuesta ante agua fría<sup>25</sup>.

Estudios recientes han determinado que la desregulación de la actividad de TRPM8 es un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Los pacientes que presentan esta enfermedad generalmente sufren de dolor crónico. Mediante un estudio de asociación de todo el genoma se ha determinado que dos SNP (2q37.1 rs115663108 y rs12465950) se asocian con el dolor y son independientes de los SNP relacionados con la migraña, lo que abre nuevas oportunidades de terapias dirigidas en función del perfil genético de los pacientes<sup>49</sup>.

Todas las evidencias mencionadas sobre estudios tanto en humanos como en animales demuestran la relación de TRPM8 con los procesos inflamatorios, el dolor y el desarrollo de varias patologías, por lo que la generación de compuestos que modulen la actividad del canal puede conducir al desarrollo de alternativas de tratamiento que mejoren la calidad de vida de las personas que padecen estos trastornos.

## 2. Antecedentes y objetivos

---

El papel de los canales TRPM8 en diversas patologías ha generado múltiples estrategias de diseño de compuestos que regulen este canal. Durante los últimos años, varios grupos científicos y compañías farmacéuticas han centrado sus investigaciones en la búsqueda de nuevos antagonistas del canal.

La farmacéutica Janssen ha patentado cientos de antagonistas de TRPM8 derivados de benzotiofeno, de amino etil sulfonilo, análogos de naftaleno<sup>25,50</sup>, una serie de compuestos con un residuo fosfonato en lugar de sulfonamida<sup>51</sup> y varios derivados de bencimidazol, con una estructura central de N-sulfonamida. Algunos de estos compuestos han mostrado eficacia en la reducción de dolor neuropático en modelos animales<sup>52</sup>. Además, recientemente la farmacéutica patentó otra colección de derivados de fenilglicina, N-arilfenilglicina amidas<sup>53</sup>, con sustituyentes de arilpirrolidina e isoquinolina que generaron actividad antagonista mejorada en un modelo animal de dolor.

La farmacéutica RaQualia Pharma también ha patentado derivados de piridinas, con estructuras N-benzil-N-piridilsulfoamidas y actividad antagonista de TRPM8. A partir de esa serie se han desarrollado compuestos con diversos sustituyentes de benzofurano, indol, indazol y derivados de benzotriazol que han sido probados en modelos *in vitro* e *in vivo*<sup>54,55</sup>.

Otra serie de antagonistas de TRPM8 ha sido desarrollada por Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation en base a un resto de piridina condensada<sup>56</sup>. Por otro lado, Glenmark ha patentado una familia de compuestos antagonistas del canal en base a N-heteroarilo, benzotiazol o benzoxazol y un residuo N-bencilo<sup>57</sup>.

El inicio para los antagonistas de TRPM8 derivados de urea fue el descubrimiento del 2-cloro-piridin-2-il-piperazina (BCTC)<sup>58</sup>. Este compuesto se diseñó originalmente para TRPV1, pero como presentó actividad moduladora en TRPM8, fue el punto de partida para más estudio y desarrollo de otros derivados. La farmacéutica Bayer patentó varios antagonistas del canal, con potencia en el rango subnanomolar, con estructura central de urea<sup>59</sup>.

Posteriormente, la farmacéutica Amgen Inc. patentó a la tetrahidroisoquinolina y varios análogos de azas como antagonistas de TRPM8<sup>60</sup> con alta potencia y estabilidad metabólica en modelos celulares y animales<sup>61</sup>. Otro grupo farmacéutico, Glenmark Pharmaceuticals descubrió

un conjunto de fenilureas de espiro, cromo 2,4-piperidina, con comportamiento antagonista para el canal<sup>62</sup>.

Otra colección de antagonistas de TRPM8 desarrollada por Bayer Healthcare AG fue una serie de 177 derivados de amidas terciarias, que incluyó al AMTB<sup>63</sup>. Posteriormente, Pfizer y sus colaboradores describieron derivados de salicilamida con propiedades mejoradas, como el derivado de quinolin-2-carboxamida, PF-05105679<sup>64</sup>. Este compuesto pasó todos los ensayos preclínicos y llegó a ensayos de fase I en humanos, donde generó varios efectos secundarios, como sensación de calor intolerable en los pacientes, lo que impidió su progresión en la clínica.

Otros compuestos que llegaron hasta ensayos clínicos de fase I fueron los derivados de mentilamina, con alta selectividad en TRPM8<sup>65</sup>. Una serie de compuestos derivados de azacromano fueron patentados por Amgen Inc, uno de estos compuestos, el AMG333 inició ensayos clínicos en individuos con migraña, pero fueron terminados por razones que no se revelaron<sup>63</sup>.

En ese sentido, a pesar de todos los compuestos desarrollados en los últimos años, los moduladores efectivos y específicos de TRPM8 aún son una necesidad clínica insatisfecha. Lo que ha potenciado el estudio de más compuestos potencialmente bloqueadores del canal, como los derivados de triptaminas N-sustituidas. Dado que la estructura de la triptamina está reconocida en múltiples sustancias con actividad farmacológica, inicialmente se hicieron estudios con compuestos disponibles comercialmente que presentan esta estructura, para encontrar las configuraciones determinantes en la regulación de la actividad de TRPM8.

Un estudio analizó once compuestos relacionados con triptaminas, entre los cuales estuvo la 5-hidroxitriptamina<sup>66</sup>. Este compuesto presentó un potente antagonismo en TRPM8, debido a la presencia del anillo fenil en su estructura y sus sustituyentes alrededor del anillo indol. Desde el punto de vista químico, existen varias similitudes estructurales entre la 5-benciloxitriptamina y el AMTB: ambos poseen un núcleo aromático o heteroaromático, con sustituyentes de un éter bencílico y una cadena lateral de amina, se cree que estas características generan el comportamiento bloqueante de los compuestos<sup>66</sup>.

La farmacéutica Renovis Inc también describió varios derivados de triptamina sustituidos en la posición 5 como antagonistas de TRPM8<sup>66</sup>. Sin embargo, el compuesto más potente de esta familia presentó poca selectividad, debido a que también era un ligando de los receptores de la serotonina 5-HT (5-hidroxitriptamina)<sup>67</sup>.

A partir de estos estudios, algunos alcaloides indol también fueron identificados como antagonistas específicos de TRPM8. Como es el caso de la voacangina, (éster metílico del ácido 18-carboxílico 2-metoxiibogamina), que se encuentra naturalmente en la corteza de la raíz del árbol de *Voacanga africana* y en otras plantas como *Tabernanthe iboga*. Es un derivado triptamínico que desplaza competitivamente al mentol, inhibiendo el canal TRPM8<sup>68</sup>. Un estudio de relación estructura-actividad (SAR) de estos alcaloides, encontró un antagonista potente del canal con alta selectividad para TRPM8, posiblemente debido a la presencia de la estructura de éster del compuesto y el grupo metoxi en el C-10<sup>69</sup>.

Posteriormente se determinó que la potencia de los ligandos de TRPM8 puede ser modulada por la variación de los sustituyentes en el nitrógeno de la estructura de la aminoisoxazola. Además, mediante experimentos de docking molecular se han encontrado varios derivados de isoxasol que estabilizan de manera fuerte el sitio de unión de agonistas y antagonistas de TRPM8, favoreciendo su configuración activa<sup>70</sup>.

En base a estas observaciones, Bertamino y sus colaboradores seleccionaron la estructura de triptamina para el desarrollo de una nueva biblioteca de compuestos antagonistas de TRPM8 con triptaminas N-sustituidas. Los derivados de estas series, comparados con los moduladores basados en triptamina nombrados previamente, presentaron modificaciones en diferentes posiciones y estructuras menos complejas en relación con los alcaloides ibogainos. El estudio de estos compuestos permitió definir los requerimientos estructurales de agonismo y antagonismo necesarios para la modulación del canal y su modelado molecular contribuyó a la identificación de un sitio de unión tentativo para los moduladores basados en triptaminas<sup>63</sup>.

En estudios posteriores, Bertamino y sus colaboradores identificaron además un derivado de indol, N, N-dibenzil-2-(1H-indol-3-yl) etanamina con alta potencia ( $IC_{50}$  de  $367 \pm 24$  nM) y selectividad para bloquear TRPM8. A partir de ese compuesto se diseñaron nuevos derivados de indol que mantuvieron la estructura de triptamina. El mejor compuesto de ese estudio fue un derivado con triptófano, que mostró potencia de bloqueo en el rango nanomolar, en estudios *in vitro* e *in vivo* y otra serie de derivados fue desarrollada<sup>71</sup>.

Con el fin de incrementar el potencial farmacológico de agonistas y antagonistas del canal TRPM8, la búsqueda de opciones que aumenten la eficacia y disminuyan los efectos secundarios no se ha detenido. Por todo ello, el objetivo general del presente trabajo es caracterizar una serie de compuestos derivados de triptaminas y sintetizados químicamente, como moduladores del canal TRPM8.

Y los objetivos específicos son:

- Realizar un cribado de los compuestos usando técnicas fluorescentes.
- Determinar las propiedades farmacológicas de los mejores compuestos mediante ensayos de potencia y citotoxicidad.
- Establecer la especificidad de los mejores compuestos en modelos celulares de TRPM8, TRPV1 y TRPA1.





### **3. Procedimiento experimental**

---

#### **3.1 Sistemas celulares**

El modelo experimental usado para los ensayos de cribado fue la línea celular HEK 293 TRPM8 (células embrionarias de riñón humano), que están trasfectadas con un plásmido para expresar de forma estable el canal TRPM8 de rata. Estas células fueron cultivadas en monocapa con medio Dulbeccos` s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS), 1 % de Penicilina-Estreptomicina (P/S) y 1 % de Geneticina. Las células se cultivaron en atmósfera controlada de 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para la determinación de especificidad se usaron células HEK 293 TRPV1 que expresan de forma estable el canal TRPV1 humano. Las células fueron cultivadas en medio DMEM F12 suplementado con 10 % de FBS, 1 % de P/S, 1 % de Geneticina y 1 % de NEM-AA (Aminoácidos no esenciales) y fueron cultivadas a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> en atmósfera controlada.

Por otro lado, se usaron células HEK 293 LTV cultivadas en DMEM Glutamax suplementado con 10% de FBS, 1 % de P/S y 1 % NEM NEAA y fueron cultivadas a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Estas células fueron trasfectadas con el plásmido C41 de TRPA1 humano para que expresen de forma transitoria el canal TRPA1.

Para el mantenimiento celular se usaron flask de cultivo celular de 25 mL, y se realizaron pases cuando la confluencia estaba en 80-90 %. Para lo cual se retiró el medio y se disoció las células con Tripsina EDTA 0.25 %. En los diferentes ensayos se usaron placas de 96 pocillos tratadas previamente con Poly-L-Lisine durante 60 minutos. La concentración celular sembrada por pocillo fue de 30.000 células por cada 100 µL de volumen final para todos los ensayos.

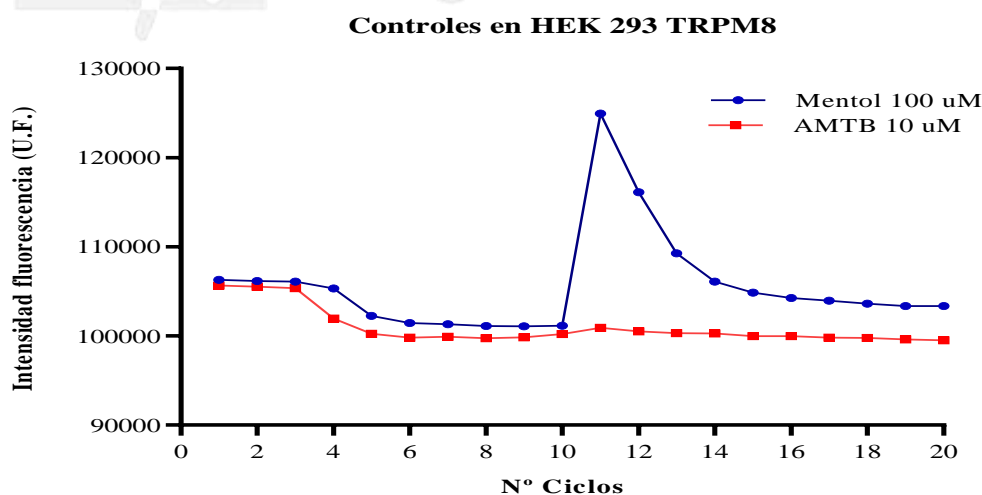
#### **3.2 Cribado y medición de actividad mediante técnicas fluorimétricas**

La técnica de cribado usada se basa en la detección de fluorescencia de las células medida con la sonda sensible a calcio, Fluo 4NW de Thermo Fisher. La entrada de iones de calcio y el incremento de su concentración se emplea como indicador de la activación del canal. Se usó un detergente suave de baja toxicidad denominado probenecid, para facilitar la entrada de la sonda hacia la célula e inhibir a los transportadores de aniones inorgánicos, que participan en la excreción de productos metabólicos endógenos, facilitando la retención del indicador dentro de las células.

Para el cribado inicial, los compuestos se aplicaron en tres concentraciones desde 0.5  $\mu\text{M}$  hasta 50  $\mu\text{M}$ , mientras que, para los ensayos de potencia posteriores, los mejores compuestos se testaron a siete concentraciones desde 50  $\mu\text{M}$  hasta 5  $\text{pM}$ .

Para la lectura en placas, se cultivaron 30.000 células/pocillo durante 3 días a condiciones controladas y con cada pocillo confluyente, se retiró el medio para minimizar las interacciones de algunos factores de crecimiento, rojo fenol o desechos, y se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de sonda por pocillo. Como la sonda es estable en pH neutro, se garantiza que no se altera la señal debido a variaciones en el pH que interfieran en la señal medida. Se incubó por 60 minutos y se llevó a medición en un lector de placas POLARStar Omega a una longitud de excitación de 485 nm y emisión de 520 nm. Se tomaron mediciones durante 20 ciclos.

Los primeros ciclos de lectura se usaron para obtener mediciones de la actividad basal de los canales, mientras que, luego del tercer ciclo se añadieron los compuestos a ensayar a tres concentraciones finales de 0.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  diluidos en DMSO, AMTB 10  $\mu\text{M}$  como control negativo y DMSO como control de vehículo. Para asignar a cada compuesto un comportamiento agonista o antagonista del canal, se representó gráficamente la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos. Antes del ciclo 11, el equipo POLARstar inyectó Mentol 100  $\mu\text{M}$  como control positivo (Fig. 5).



**Figura 5.** Figura representativa de un agonista (mentol 100 $\mu\text{M}$ ) y un antagonista (AMTB 10 $\mu\text{M}$ ) en HEK 293 TRPM8. El agonista es inyectado en el ciclo 10 y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la apertura del canal se refleja en un incremento de la fluorescencia. Por otro lado, el bloqueador impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a pesar de la presencia del agonista del canal, lo que mantiene constante la fluorescencia.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Excel. Si los compuestos son agonistas se produce un incremento de la fluorescencia debido a la activación del canal cuando los compuestos se añaden en el ciclo 3, mientras que los antagonistas, impiden el incremento en la señal de fluorescencia cuando se añade el agonista en el ciclo 10.

Se determinó el factor Z para la validación del ensayo, admitiendo solamente valores entre 0.5 y 1. El factor está definido por la expresión:

$$z = 1 - \frac{3 * (\sigma_+ + \sigma_-)}{|\mu_+ - \mu_-|}$$

Los valores de  $\mu$  y  $\sigma$  indican la media de fluorescencias entre el ciclo 10 y 11 y la desviación estándar de las diferencias de controles positivos y negativos respectivamente.

### 3.3 Ensayos de Potencia

Para la determinación de la potencia se generaron curvas de dosis respuesta mediante el análisis de los compuestos a siete concentraciones, desde 50  $\mu$ M hasta 5 pM (50  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 0.5  $\mu$ M; 0.05  $\mu$ M; 5 nM; 0.05 nM y 5 pM) y se usó la misma técnica fluorescente descrita previamente. Se determinaron los valores de concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) por medio de la representación gráfica del porcentaje de activación frente a la concentración, usando el programa GraphPad Prism 8.0 con un ajuste a la ecuación de Hill:

$$y = \frac{B_{max} + (B_{max} - B_{min})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$$

Donde  $B_{max}$  es el bloqueo máximo y  $B_{min}$  es el bloqueo mínimo.

### 3.4 Ensayo de viabilidad celular MTT

Para evaluar la citotoxicidad de los mejores compuestos se realizaron experimentos basados en la detección de la actividad mitocondrial mediante el ensayo colorimétrico del MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). La viabilidad celular está relacionada directamente con la actividad mitocondrial, debido a que las enzimas oxidoreductasas dependientes de NADPH reducen el colorante de tetrazolio a su forma insoluble tetrazán, de color violeta. Por lo que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que es cuantificable mediante un espectrofotómetro.

Para el ensayo se usaron células HEK 293 TRPM8 sembradas a una densidad de 30.000 células por pocillo. Luego de 24 horas de incubación a condiciones controladas, se añadieron los compuestos a ensayar a cuatro concentraciones, desde 100 hasta 1  $\mu\text{M}$  (100; 50; 10 y 1  $\mu\text{M}$ ) disueltos en DMSO y se incubaron por 24 horas más. Tras este tiempo, se añadió 5  $\mu\text{L}$  de solución MTT a una concentración de 5 mg/ml disuelto en solución tampón PBS y se incubó durante 4 horas, permitiendo la generación de los cristales de formazán.

Luego, se retiró el medio y se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO por pocillo, manteniéndose la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos, para que los cristales se disuelvan. Finalmente se realizó la lectura de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

El porcentaje de Viabilidad se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{DO \text{ cel. tratadas}}{DO \text{ cel. control}} * 100$$

Como controles se usó: medio DMEM suplementado para el control positivo, DMSO como control de vehículo y 1  $\mu\text{L}$  de detergente RIPA como control del nivel máximo de muerte celular.

### **3.5 Ensayos de especificidad**

En los ensayos de especificidad se usaron células HEK 293 TRPV1 bajo las mismas condiciones y con los pasos sucesivos de siembra y lectura en placa con la técnica fluorescente descrita previamente. Se tomaron mediciones durante 20 ciclos en el lector de placas POLARstar, donde los primeros se usaron para medir la actividad basal del canal TRPV1. Luego del tercer ciclo se añadió RR (Rojo Rutenio) 0.1 mM como control negativo, DMSO como control de vehículo y los compuestos a cribar a tres concentraciones finales de 0.5  $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Finalizado el ciclo 10, el equipo inyectó Capsaicina 10  $\mu\text{M}$ . La determinación del comportamiento agonista o antagonista de los compuestos se realizó mediante un análisis similar al descrito para el modelo celular de TRPM8 en el programa Excel.

### 3.6 Transfección

Para analizar el comportamiento de los mejores compuestos en TRPA1 se realizó una transfección con el plásmido C41 que expresa TRPA1 humano. Inicialmente se amplificó el plásmido transfectado previamente en células de *Escherichia coli*. Las bacterias se descongelaron y cultivaron en placas de agar LB (caldo de cultivo de Luria Bertani) con 100  $\mu$ L de ampicilina como antibiótico de resistencia. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se realizó un pre inculo en 5 mL de caldo de cultivo LB durante 6 horas y finalmente un cultivo overnight en 300 ml de LB a 37 °C y 200 rpm de agitación constante.

Para la obtención del ADN plasmídico se empleó E.Z.N.A Plasmid Midi Kit, con los pasos sucesivos de lisis, unión, lavado y elución según las recomendaciones del fabricante. Mientras que para la transfección se usó el kit Lipofectamina 3000 de Invitrogen, Carisbad, CA, USA.

Se sembraron placas de 96 pocillo con 500  $\mu$ L de suspensión celular de HEK LTV y se dejaron crecer durante 24 horas. Para la transfección en un tubo eppendorf se colocaron 375  $\mu$ L de medio DMEM suplementado y 11.25  $\mu$ L de lipofectamina. Mientras que en otro tubo: 750  $\mu$ L de medio DMEM suplementado, 15  $\mu$ g de ADN plasmídico y 30  $\mu$ L de p3000. Se mezcló el contenido de los dos tubos y se llevó al flask de cultivo. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego a 37°C durante 48 horas. Las células fueron tripsinizadas y sembradas a 100.000 células/pocillo y se repitió el análisis descrito previamente en el apartado de cribado.

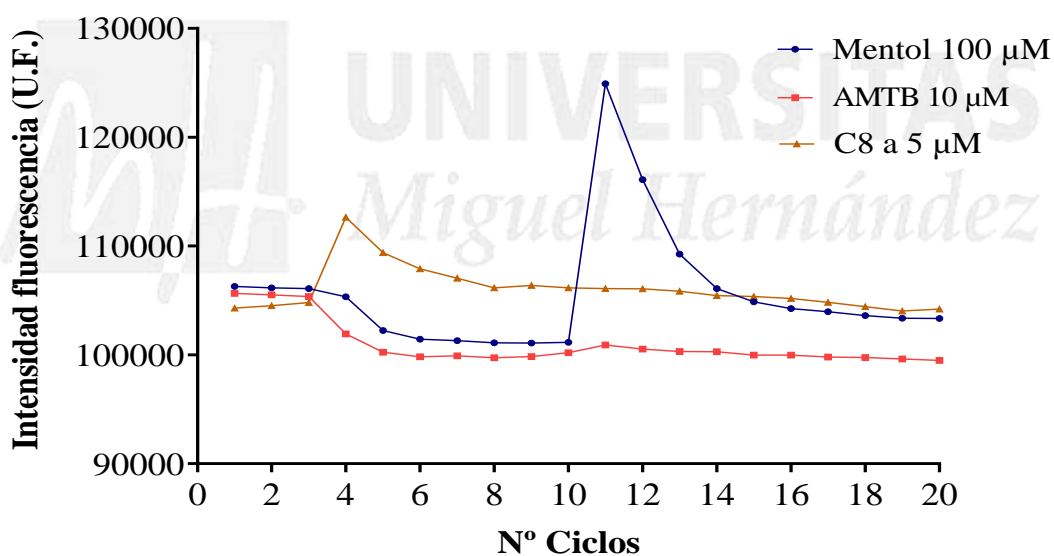
## 4. Resultados

### 4.1 Cribado de compuestos

Los ocho compuestos ensayados provienen de una familia de derivados de triptamina desarrollados por Bertamino y colaboradores en 2018<sup>71</sup>, los cuales fueron testados para medir su efecto en células HEK 293 TRPM8 mediante las técnicas fluorescentes descritas en el apartado 3.2.

Inicialmente se identificó el comportamiento de cada compuesto mediante la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia observada en función de cada ciclo. Se analizó la respuesta provocada por cada compuesto al añadirlos (tras el tercer ciclo) y cuando se inyectó el agonista del canal (tras el décimo ciclo).

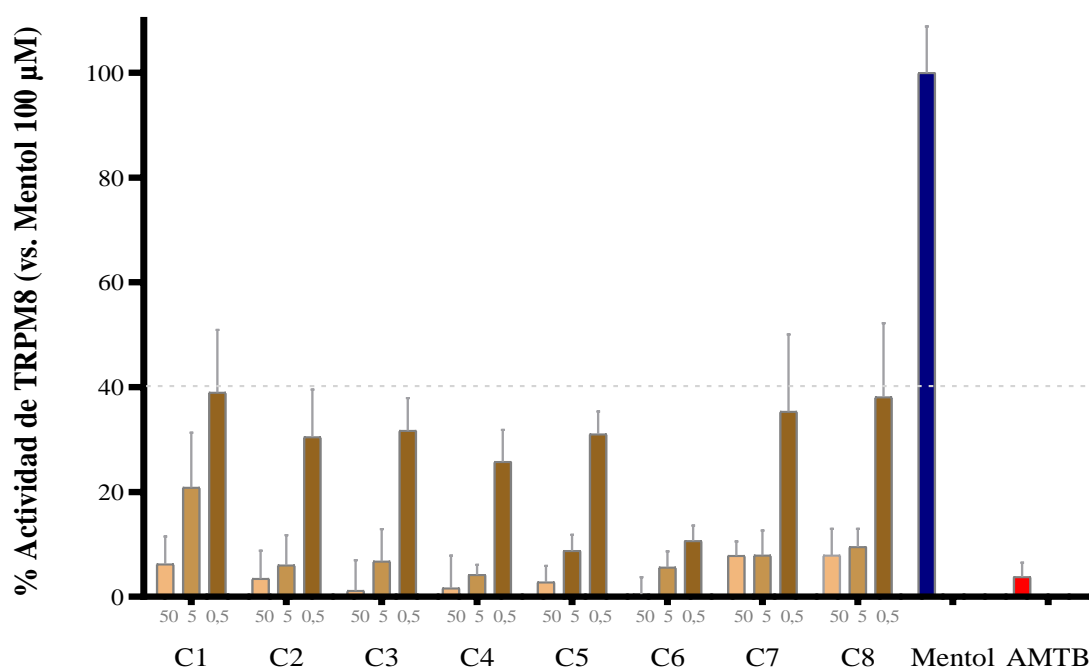
**Acción de C8 en HEK 293 TRPM8**



**Figura 6.** *Ensayo representativo de la acción de C8 sobre el canal TRPM8 a 5 µM.* El agonista (mentol) incrementa la actividad del canal cuando se añade tras el ciclo 10 (azul). Se presenta la actividad de TRPM8 en presencia de AMTB (rojo) y de C8 (marrón) cuando se añadieron tras el ciclo 3. C8 bloqueó la entrada de calcio en el canal la activación por mentol.

El efecto bloqueante de todos los compuestos fue analizado a partir de los datos generados mediante las técnicas fluorescentes. Se determinó la actividad del canal a las tres concentraciones de 50 µM, 5 µM y 0.5 µM para seleccionar los compuestos más eficaces. Los ensayos de actividad se realizaron por triplicado en cada caso.

### Cribado de los 8 compuestos en HEK 293 TRPM8



**Figura 7. Resultados del cribado de los 8 compuestos en el modelo de TRPM8.** Se representa el porcentaje de actividad del canal en respuesta a los compuestos aplicados a 50, 5 y 0.5  $\mu\text{M}$  y normalizados al 100% de la actividad del mentol 10  $\mu\text{M}$ . Se presenta también el control de bloqueo, AMTB 10  $\mu\text{M}$  y una línea de puntos en el 40% de actividad del canal para visualizar la disminución de actividad provocada por los compuestos. Se muestran los valores de media  $\pm$  SD en todos los casos.

Todos los compuestos bloquearon la actividad del canal, hasta un 40% a las tres concentraciones, en comparación con la activación mediada por el mentol. Los compuestos con mayor actividad bloqueante a 50  $\mu\text{M}$  fueron C2, C3, C4, C5 y C6, con porcentajes por debajo del 5%. Mientras que todos los compuestos a 5  $\mu\text{M}$  disminuyeron la actividad del canal hasta un 10%, a excepción de C1. Cabe destacar que C6 mostró la mayor actividad bloqueante inclusive a la menor concentración.

## 4.2 Dosis Respuesta

La caracterización de los compuestos se realizó mediante ensayos de dosis respuesta. Las curvas de actividad en función de las diferentes concentraciones se determinaron usando el ajuste de la ecuación de Hill y la metodología descrita en el apartado 3.3. Se estableció la potencia de cada compuesto mediante el cálculo de la  $IC_{50}$ , como una medida de la concentración necesaria para inhibir la función biológica de TRPM8 en un 50%.

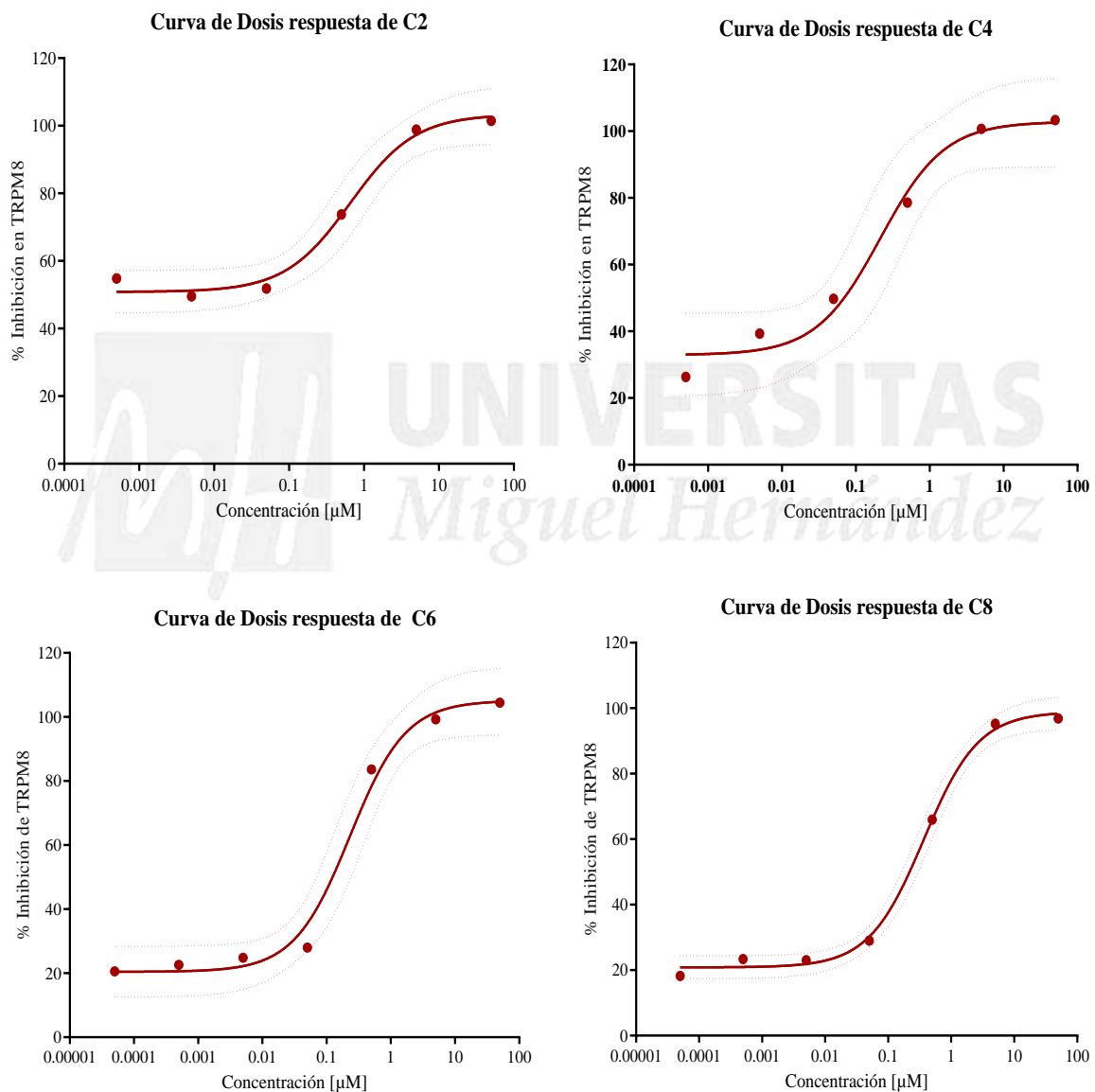


Figura 8. Representación de las curvas de dosis respuesta obtenidas para C2, C4, C6 y C8.



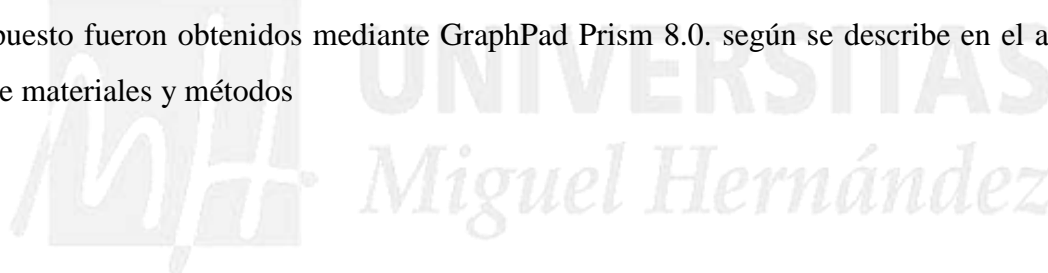
Los valores de IC<sub>50</sub> para cada compuesto, calculados a partir de la construcción de las curvas dosis respuesta, se detallan en la siguiente tabla:

*Tabla 1. Valores de IC<sub>50</sub> de los 8 compuestos*

Compuestos	IC <sub>50</sub> [μM]
1	1.6 ± 1.8
2	0.7 ± 1.3
3	0.4 ± 2.7
4	0.1 ± 1.8
5	0.4 ± 1.5
6	0.2 ± 1.6
7	0.3 ± 1.2
8	0.4 ± 1.1

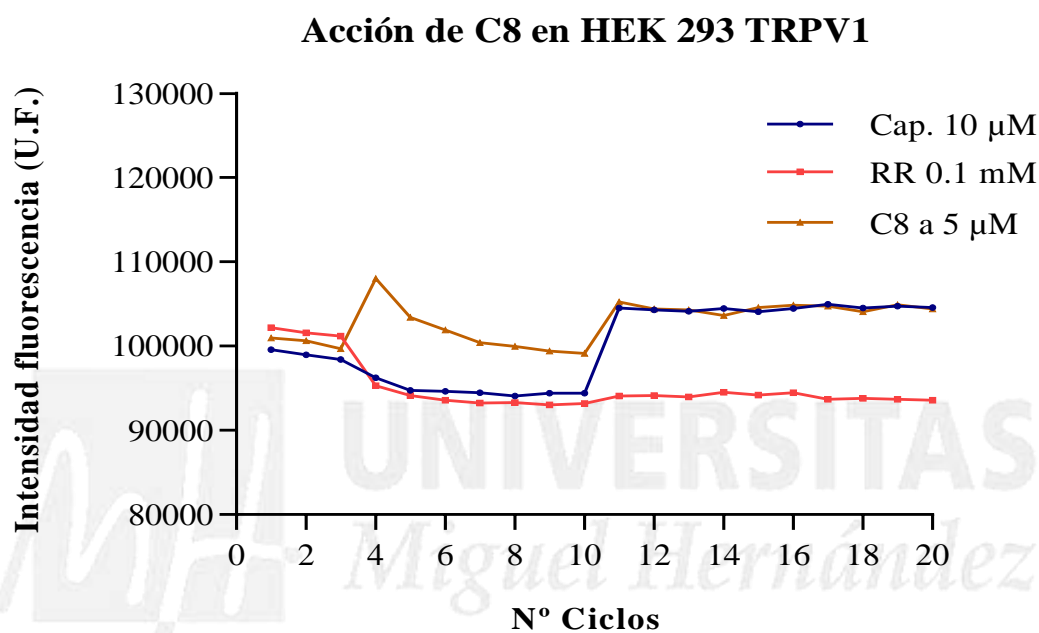
Se muestran los valores de media ± SD en todos los casos

Tanto las representaciones gráficas de la dosis respuesta, como los datos de IC<sub>50</sub> para cada compuesto fueron obtenidos mediante GraphPad Prism 8.0. según se describe en el apartado 3.3 de materiales y métodos



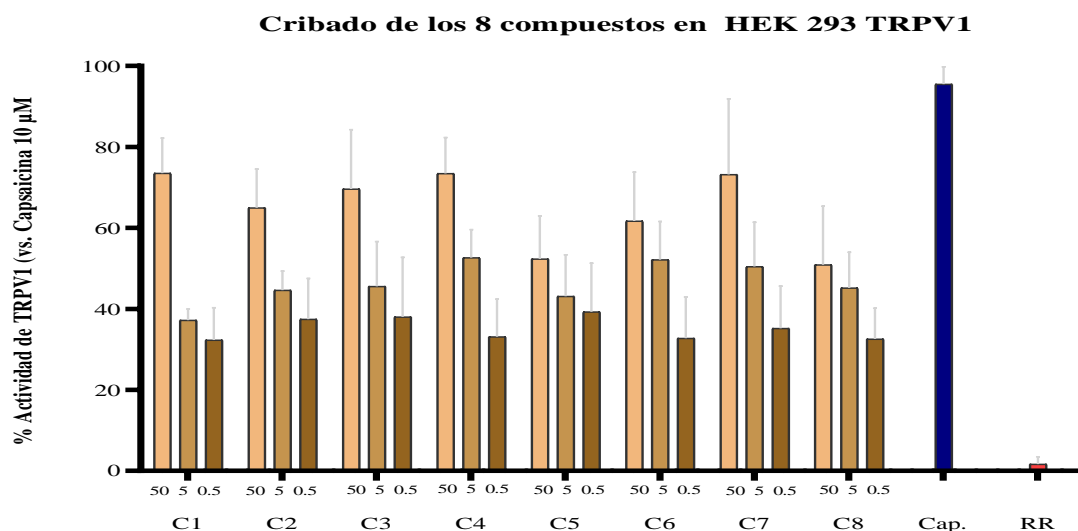
### 4.3 Especificidad

Para establecer la acción selectiva de los ocho compuestos en los canales TRPM8, se realizaron los ensayos de especificidad descritos en el apartado 3.4. El comportamiento de los compuestos en TRPV1 se determinó mediante la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia en función de cada ciclo. Se analizó la respuesta que provocaron los compuestos tras su adición luego del tercer ciclo, y cuando se inyectó el agonista del canal.



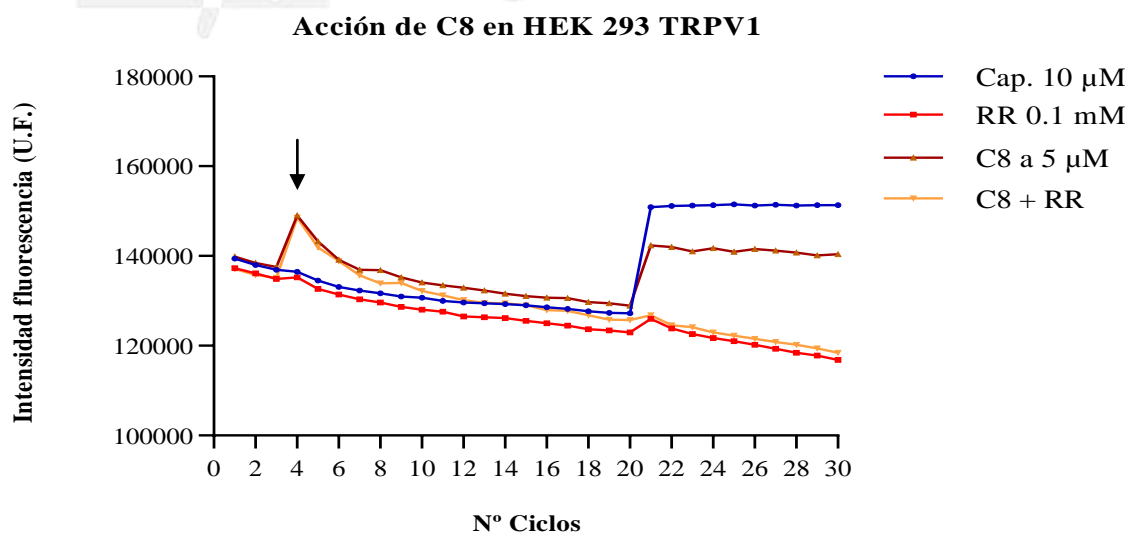
**Figura 9. Ensayo representativo de TRPV1 en respuesta a C8 a 5 µM.** El agonista (capsaicina) incrementa la actividad del canal cuando se añade tras el ciclo 10 (azul). Se presenta la actividad de TRPV1 en presencia de RR (rojo) y de C8 (marrón) que se añadieron tras el tercer ciclo. C8 a 5 µM parece activar el canal tras el ciclo 3.

Los compuestos se analizaron a partir de los datos generados mediante las técnicas fluorescentes. Todos los compuestos inicialmente presentaron un posible comportamiento agonista de TRPV1 a las tres concentraciones testadas, ya que incrementaron la fluorescencia cuando se añadieron tras el tercer ciclo. Los ensayos de actividad se realizaron por triplicado en cada caso.



**Figura 10. Resultados de la caracterización de los 8 compuestos en HEK 293 TRPV1.** Se representa el porcentaje de actividad del canal en respuesta a los compuestos aplicados a tres concentraciones de 50, 5 y 0.5 μM en cada caso y normalizados al 100% de la actividad de la capsaicina 10 μM. Se muestran los valores de media ± SD en todos los casos.

Para determinar si la activación observada corresponde a una actividad agonista, se realizaron ensayos de especificidad con los compuestos en presencia y ausencia del antagonista rojo rutenio desde el ciclo 1 e incrementando el número de ciclos entre la adición de los compuestos y la inyección del agonista (inyección de capsaicina tras el ciclo 20, y 30 ciclos en total).



**Figura 11. Ensayo representativo del efecto de C8 a 5 μM en el canal TRPV1.** El agonista (capsaicina) incrementa la actividad del canal cuando se añade tras el ciclo 10 (azul). El antagonista RR bloquea la activación del canal (rojo). C8 en ausencia del antagonista parece activar al canal (marrón), sin embargo, esta activación se mantiene en presencia de RR (naranja).

Los resultados indican que los compuestos incrementan la fluorescencia al añadirse tras el ciclo 3 inclusive en presencia de RR, por lo que este efecto no es específico para el canal TRPV1.

#### **4.4 Ensayos de especificidad en TRPA1**

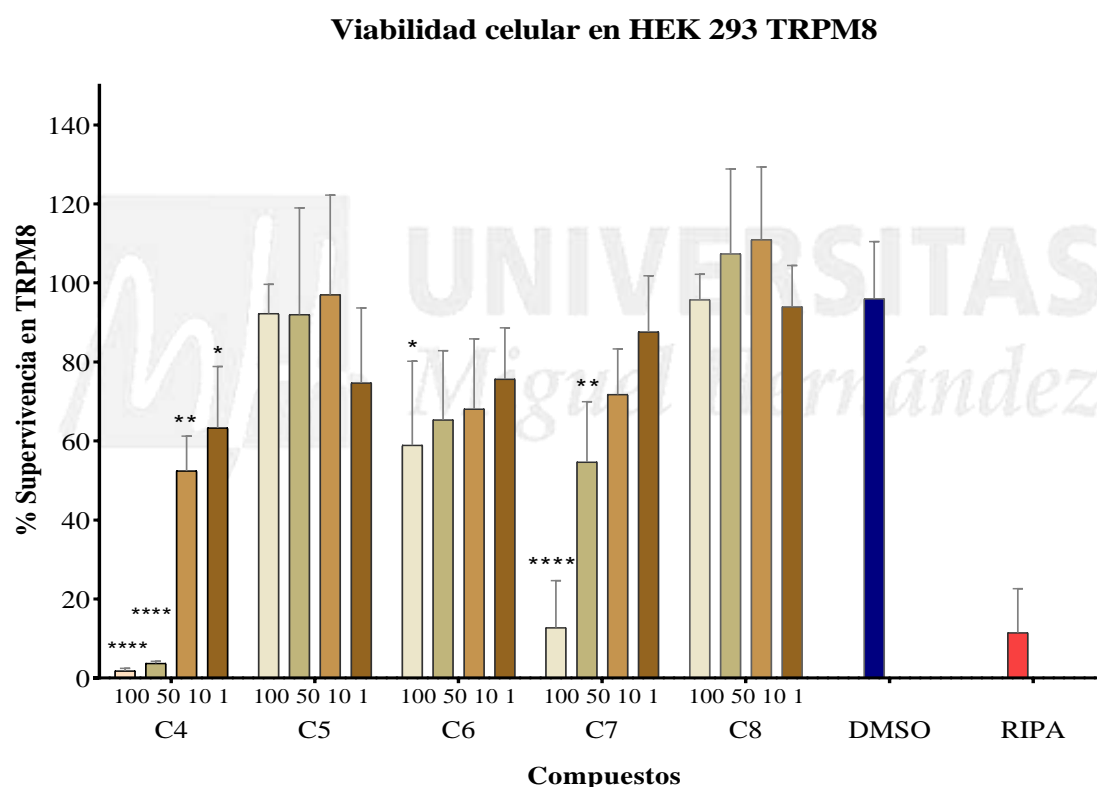
Para la determinación de la especificidad de los compuestos en el canal TRPA1 inicialmente se siguió el protocolo de transfección descrito en el apartado 3.6. Se realizó la preparación del ADN mediante la amplificación y la obtención del ADN plasmídico. La concentración de ADN obtenida fue de 298 ng/ $\mu$ L (relación 260/280 de 1.89 y 260/230 de 2.28).

Sin embargo, debido a la situación de pandemia actual por el SARS CoV-2, no se pudieron realizar los ensayos de transfección en las células, ni las técnicas fluorescentes correspondientes.



## 4.5 Ensayos de Viabilidad celular

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.5. Se analizó el comportamiento de cada compuesto a cuatro concentraciones diferentes, según los efectos observados en las curvas de dosis respuesta. Los resultados se normalizaron en base al control con medio DMEM suplementado, tomando en consideración la influencia del vehículo en el que están disueltos los compuestos (DMSO). Como control negativo se usó detergente RIPA que produce lisis celular.



*Figura 12. Resultados de los ensayos de citotoxicidad para C4, C5, C6, C7 y C8. Los compuestos se testaron a cuatro concentraciones, en función del IC<sub>50</sub>. Se muestran los valores de media ± SD en todos los casos. Los datos estadísticamente significativos están marcados con (\*\*\*\*) si P-valor<0.001, (\*\*) si P-valor<0.01 (\*) si P-valor<0.1.*

Para el análisis estadístico de los datos de viabilidad se usó el programa GraphPad Prism 8.0 empleando el análisis de comparación múltiple de Dunnett, según la respuesta generada por el DMSO y cada compuesto. Las diferencias significativas se presentan en función del P-valor: si el P-valor < 0.1\*\* y si P-valor < 0.001\*\*\*\*.

Los resultados muestran que C4 es el compuesto que genera menos supervivencia, ya que presenta diferencias significativas en la viabilidad celular a todas las concentraciones en comparación con el DMSO. C7 muestra diferencias significativas en la viabilidad a las concentraciones de 100 y 50  $\mu$ M mientras que C6 solamente a la concentración más alta. Los compuestos C5 y C8 no presentaron diferencias significativas en la supervivencia en comparación con el DMSO.



## 5. Discusión

---

Para el desarrollo de este estudio se han planteado varios ensayos mediante el uso de líneas celulares y diferentes experimentos de tipo fluorimétrico. Todos los resultados se han analizado con el fin de determinar los mejores compuestos mediante el contraste de resultados generados de cada técnica.

El uso de sistemas celulares *in vitro* es una herramienta importante para el cribado, como una aproximación hacia la elección de los compuestos con los mejores efectos biológicos, sin tener que recurrir a la experimentación animal directamente. Este modelo simula el ambiente celular, obviando las complejidades topográficas y bioquímicas propias del entorno. En concreto, las células HEK 293 son una aproximación óptima para el estudio de canales iónicos por su alta eficiencia de transfección y producción de proteínas fieles a las originales<sup>72</sup>.

Se usan células renales HEK 293 transformadas con adenovirus 5 (Ad5) debido a que muestran propiedades asociadas a un “linaje neuronal”, las mismas que estaban inactivas desde que las células se diferenciaron y se activan en presencia de Ad5. Estas células expresan 61 ARNm específicos de neuronas y presentan inmunoreactividad frente a las subunidades principales de neurofilamentos (NF) NF-M, que son propios de células neuronales<sup>73</sup>. Por lo que, HEK 293 tiene gran similitud como modelo de la diferenciación temprana de neuronas, y son un buen punto de partida para el estudio de diversos receptores.

Acerca de las técnicas fluorimétricas usadas, son fundamentales debido a que permiten ensayos de cribado de alto rendimiento. Estas técnicas monitorean la actividad del canal de forma indirecta, mediante la detección de los cambios de fluorescencia provocada por los colorantes, según la permeación iónica a través de los canales<sup>74</sup>, lo que permite una simulación de la activación y bloqueo de TRPM8. Además, generan alta reproducibilidad y se adaptan a protocolos estandarizados y automatizados.

De igual forma, todos los ensayos reportados mostraron desviaciones aceptables, con valores de Z superiores a 0.5. No obstante, las técnicas fluorimétricas requieren el uso de controles internos durante cada ensayo y la normalización de resultados para disminuir la variabilidad de datos, que de otro modo es inevitable, relativamente alta y es atribuible a las diferencias debido a cada etapa del ciclo celular y a los diferentes eventos moleculares propios de las células<sup>75</sup>.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de cribado permitieron la caracterización y determinación del potencial farmacológico de los compuestos estudiados. Los ocho compuestos derivados de triptamina, mostraron una actividad significativa como bloqueadores del canal TRPM8 a todas las concentraciones testadas, con relación al mentol 100  $\mu$ M (Fig. 7). Todos los compuestos modularon la actividad del canal en una relación inversamente proporcional a la concentración de compuesto, ya que a mayor concentración se presentó menor actividad del canal, y por lo tanto mayor bloqueo, en cada caso.

Previamente se ha demostrado que algunos antagonistas de TRPM8 presentan estructuras con configuraciones en común, como derivados de bencenos, de aminas y de amidas. En base a estas estructuras han surgido diversos compuestos que han mostrado actividad moduladora de TRPM8, tales como derivados de piperazina-2-carboxamida (BCTC), de benzamida (AMTB), de benzamidazola, de isoquinolina y de indol.

Siguiendo esa línea, una serie de derivados a partir de la estructura de triptamina, se ha desarrollado en la búsqueda de antagonistas específicos y efectivos de TRPM8. Se conoce que la triptamina tiene un papel en el sistema nervioso central, y algunos compuestos naturales y sintéticos que contienen triptamina han generado efectos antidepresivos y analgésicos<sup>76</sup>, pero también efectos psicodélicos y estimulantes. De ello radica la importancia de los análisis de modelado, síntesis y cribado de compuestos, que permitan encontrar los sustituyentes adecuados que generen los efectos deseados. Los compuestos provienen de un derivado de triptamina con sustituyente de metil ciclohexilo que ha mostrado una potente actividad antagonista<sup>71</sup>.

De los resultados de los ensayos de dosis respuesta se generan aproximaciones sobre la actividad biológica y la fuerza que genera cada compuesto. Las sigmoides obtenidas muestran que cuanto más potente sea el compuesto, la curva es más pronunciada, como es el caso de C6 y C8 en comparación con C2 y C4. (Fig. 8). Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos muestran una potencia en el rango micromolar para todos los compuestos (Tabla 1). Los compuestos más potentes son aquellos que generan la respuesta esperada a bajas concentraciones. Cabe destacar que la mayor potencia de un compuesto no se relaciona necesariamente con efectos secundarios<sup>77</sup>.



Todos los compuestos mostraron alta potencia para bloquear la actividad del canal TRPM8. El compuesto C1 presentó el valor de  $IC_{50}$  más alto ( $IC_{50}$  de  $1.6 \mu M$ ) mientras que el valor más bajo fue el de C4 ( $IC_{50}$  de  $0.1 \pm 1.8 \mu M$ ) seguido por C6 ( $IC_{50}$  de  $0.2 \pm 1.6 \mu M$ ). Los resultados obtenidos muestran potencias mucho más altas que las reportadas para antagonistas conocidos, como el BCTC ( $IC_{50}$  de  $3.5 \pm 1.2 \mu M$ ) y el AMTB ( $IC_{50}$  de  $6.5 \pm 1.4 \mu M$ )<sup>19</sup>.

Los compuestos C4 y C6 presentaron la mayor potencia de bloqueo del canal, siendo C4 ligeramente más potente que C6. Por otro lado, los compuestos C3, C5, C7 y C8 se presentaron también como buenos bloqueadores, con una potencia mayor a la reportada para el compuesto del que se derivó la serie originalmente, el derivado de triptamina con sustituyente de metil ciclohexilo ( $IC_{50}$  de  $0.6 \pm 0.5 \mu M$ ). Solamente C1 y C2 presentan menor potencia frente al compuesto original, aunque esta potencia fue significativamente mayor que la de los antagonistas conocidos, BCTC y AMTB.

Como TRPM8 comparte el 20% de homología de secuencia con TRPV1, gran parte de los antagonistas de TRPV1 se han probado en TRPM8 también y viceversa, ya que estos moduladores generalmente presentan acción inespecífica para los canales. Los ensayos de especificidad revelaron el potencial efecto agonista de los compuestos sobre el canal TRPV1 (Fig. 10). Sin embargo, se pudo comprobar que la actividad observada se mantuvo en presencia del antagonista rojo rutenio (Fig. 11), lo que sugiere que los compuestos no actúan de forma específica sobre TRPV1 y posiblemente el efecto observado se debe a interferencias y/o alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular.

Debido a la situación actual de pandemia por el SARS CoV-2, no se pudieron realizar los ensayos correspondientes de la acción de los compuestos sobre el canal TRPA1. Sin embargo, con la evidencia disponible de los ensayos realizados en el modelo de TRPV1, se considera que los compuestos son específicos de TRPM8 frente a TRPV1 y se cree conveniente la realización de estudios posteriores sobre el modelo de TRPA1.

Por otro lado, se realizaron ensayos de viabilidad celular en las células HEK 293 TRPM8 con los compuestos que presentaron las mejores características de potencia y especificidad: C4, C5, C6, C7 y C8 (Fig. 12). El análisis estadístico realizado permitió determinar las diferencias significativas de la toxicidad de cada compuesto, en función de la acción generada por el DMSO, vehículo usado para disolver los compuestos.

C4 resultó ser el compuesto más significativamente tóxico, inclusive a la menor concentración (1  $\mu\text{M}$ ), por lo que quedó descartado. Los compuestos C6 y C7 presentaron diferencias significativas en toxicidad, pero a las mayores concentraciones (de 100 y 50  $\mu\text{M}$ ) respectivamente. Mientras que los compuestos que mostraron la menor toxicidad fueron C5 y C8, siendo C8 ligeramente menos tóxico que C5.

A pesar de que C4, C6 y C7 fueron los compuestos más potentes según las curvas de dosis respuesta, los ensayos de viabilidad celular demostraron que fueron los más significativamente tóxicos, sobre todo a la mayor concentración. Este aspecto es de gran relevancia para la elección de los compuestos con el mejor perfil farmacológico y el diseño de bibliotecas futuras.

Para establecer una caracterización más completa de los compuestos es recomendable continuar el estudio empleando técnicas electrofisiológicas que permitan profundizar en las características biofísicas de los canales frente al estímulo generado por los compuestos de interés. Con la finalidad de continuar a estudios preclínicos en modelos animales y en ensayos clínicos posteriores en humanos.



## 6. Conclusiones y perspectivas futuras

---

En base a todos los resultados mencionados anteriormente, se puede concluir que la implicación del canal TRPM8 en diversos procesos patológicos y fisiológicos es un tema de estudio creciente para la búsqueda de moduladores del canal, y su investigación es una herramienta relevante para el desarrollo de nuevos fármacos efectivos y específicos.

- En el presente estudio se identificaron ocho compuestos derivados de triptamina como antagonistas potentes de TRPM8, ya que redujeron casi en su totalidad la actividad del canal a la mayor concentración testada, en comparación con el antagonista conocido AMTB.
- Los compuestos con mejores propiedades farmacológicas como antagonistas de TRPM8 fueron C5 y C8, ya que presentaron alta potencia: con un valor de  $IC_{50} = 0.4 \pm 1.5 \mu M$  para C5 y un valor de  $IC_{50} = 0.4 \pm 1.1 \mu M$  para C8, redujeron la actividad del canal hasta un 8.81 % y 9.53% respectivamente y mostraron baja toxicidad.
- El compuesto C4 presentó la mayor potencia ( $IC_{50}$  de  $0.1 \pm 1.8 \mu M$ ) y la toxicidad más significativa, lo que es un aspecto relevante para el diseño y la síntesis de los derivados de triptamina futuros, con el fin de potenciar el efecto modulador y disminuir los eventos adversos desde el diseño y cribado *in silico*.
- Todos los compuestos presentaron una acción específica para TRPM8 frente a TRPV1, con lo que se minimizan los posibles efectos secundarios en estudios posteriores. Este aspecto es relevante para la continuación en el desarrollo de estrategias terapéuticas de alta especificidad, afinidad y eficacia que potencien la acción farmacológica.

Como continuación de este estudio se debería analizar la especificidad y selectividad de los compuestos con mejores propiedades farmacológicas en diferentes sistemas celulares que expresen TRPA1 y otros canales TRP. Además de un análisis en modelos celulares con canales iónicos que regulen el paso de iones diferentes al calcio, tales como canales de sodio ( $Na^+$ ), potasio ( $K^+$ ) y cloro ( $Cl^-$ ).

Adicionalmente, es recomendable continuar con la investigación usando ensayos de electrofisiología, mediante la técnica de fijación de membranas (Patch clamp). Con la finalidad de confirmar el antagonismo generado por los compuestos seleccionados con una mayor

sensibilidad, obtener mayor resolución de eventos moleculares y analizar mejor la interacción entre los compuestos y los dominios de TRPM8.

Finalmente, sería de notable importancia la determinación del efecto farmacológico de los compuestos mediante cultivos primarios neuronales de ganglio trigémino de ratones y ensayos *in vivo* de distintos tipos de dolor:

- Modelos preclínicos de hipersensibilidad al frío en animales (alodinia y analgesia), debido al dolor neuropático inducido por quimioterapia con paclitaxel, cisplatino y oxaliplatino que se modula con la aplicación de inhibidores del canal. O el modelo de hiperalgesia térmica mediante inyección intraplantar y de placa caliente en ratones, y observar el efecto tras la aplicación de los antagonistas del canal.
- Modelos de comportamiento mediado por TRPM8 en ratones, como los ensayos de WDS (Wet-Dog Shakes Assay), donde los animales generan sacudidas y saltos cuantificables, tras la aplicación de activadores del canal, pero el efecto se revertiría con la aplicación de antagonistas.
- Modelos del síndrome de vejiga hiperactiva y vejiga dolorosa generados por la exposición a activadores de TRPM8 en ratas, cuya respuesta nociceptiva disminuiría tras la aplicación de antagonistas.
- Modelos de la variación de la presión arterial inducida por el frío en ratas, que se genera tras la activación de TRPM8 mediante la exposición a temperaturas menores a 15°C, y se atenuaría por el efecto de los bloqueadores.
- A su vez, la especificidad de los compuestos podría comprobarse mediante el modelo de hipersensibilidad inducida por CFA (Adyuvante completo de Freund) en ratas, donde primero se genera la inflamación de una extremidad del animal, que luego se reduciría tras la aplicación del antagonista. Además, este modelo es un medio para observar si el efecto generado es analgésico o es un efecto secundario sedante o motor, cuando se evalúa la actividad en campo abierto de los animales antes y después de la aplicación del modulador del canal.
- Asimismo, se podrían incluir modelos de cáncer de próstata, mama, colon y piel, que analicen el posible efecto quimioterapéutico de los compuestos comparados con otras moléculas disponibles en la actualidad.

## 7. Bibliografía

---

1. Wes, P. D. *et al.* TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9652–9656 (1995).
2. Li, H. TRP channel classification. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **976**, 1–8 (Springer New York LLC, 2017).
3. Caterina, M. J. & Pang, Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals* **9(4)**, 77 (2016).
4. Moran, M. M. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **58**, 309–330 (2018).
5. Vasquez, G., Wedel, B., Aziz, O., Trebak, M. & Putney, J. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys.* **1742**, 21–36 (2004).
6. Frolov, R. & Weckstroom, M. Harnessing the Flow of Excitation: TRP, Voltage-Gated Na<sup>+</sup>, and Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels in Contemporary Medicine. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **103**, 25–95 (2015).
7. Moran, M. M. & Szallasi, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *British Journal of Pharmacology* **175**, 2185–2203 (2018).
8. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
9. Caterina, M. J. & Julius, D. Sense and specificity: A molecular identity for nociceptors. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 525–530 (1999).
10. Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T. & Szallasi, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 601–620 (2011).
11. Vay, L., Gu, C. & McNaughton, P. A. The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* **165**, 787–801 (2012).
12. Duncan, L. M. *et al.* Down-regulation of the novel gene Melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* **58**, 1515–1520 (1998).

13. Montell, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **22**, 272 (2005).
14. Nilius, B. & Flockerzi, V. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-54215-2
15. Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 619–647 (2006).
16. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 387–417 (2007).
17. Ghesquier, A. H.-, Aurelien-Haustrate, Prevarskaya, N. & Lehen`kyi, V. TRPM Family Channels in Cancer. *Pharmaceuticals* **11(2)**, 58 (2018).
18. Diver, M. M., Cheng, Y. & Julius, D. Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization. *Science (80-. )*. **365**, 1434–1440 (2019).
19. Malkia, A., Morenilla-Palao, C. & Viana, F. The Emerging Pharmacology of TRPM8 Channels: Hidden Therapeutic Potential Underneath a Cold Surface. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 54–67 (2010).
20. Li, M., Yu, Y. & Yang, J. Structural biology of TRP channels. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **704**, 1–23 (NIH Public Access, 2011).
21. Woolfson, D. N. The design of coiled-coil structures and assemblies. *Adv. Protein Chem.* **70**, 79–112 (2005).
22. Bandell, M. *et al.* High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* **9(4)**, 493–500 (2006).
23. Matta, J. A. & Ahern, G. P. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J. Physiol.* **585**, 469–482 (2007).
24. Voets, T. *et al.* The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748–754 (2004).
25. Pérez De Vega, M. J., Gómez-Monterrey, I., Ferrer-Montiel, A. & González-Muñiz, R. Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 10006–10029 (2016).

26. Lashinger, E. S. R. *et al.* AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F803-10 (2008).
27. Mälkiä, A. *et al.* Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J. Physiol.* **581**, 155–174 (2007).
28. Muller, C., Morales, P. & Reggio, P. H. Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**, (2019).
29. Rohács, T., Lopes, C. M. B., Michailidis, I. & Logothetis, D. E. PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* **8**, 626–34 (2005).
30. Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X. & Gu, J. G. TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP<sub>2</sub>: distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* **106**, 3056–3066 (2011).
31. Phelps, C. B. & Gaudet, R. The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *J. Biol. Chem.* **282**, 36474–36480 (2007).
32. Hilgemann, D. W., Feng, S. & Nasuhoglu, C. The complex and intriguing lives of PIP<sub>2</sub> with ion channels and transporters. *Sci. STKE* **2001**, re19 (2001).
33. Suh, B.-C. & Hille, B. PIP<sub>2</sub> Is a Necessary Cofactor for Ion Channel Function: How and Why? . *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 175–195 (2008).
34. Daniels, R. L., Takashima, Y. & McKemy, D. D. Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 Is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **284**, 1570–1582 (2009).
35. Andersson, D. A., Nash, M. & Bevan, S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J. Neurosci.* **27**, 3347–3355 (2007).
36. Vanden Abeele, F. *et al.* Ca<sup>2+</sup>-independent Phospholipase A<sub>2</sub>-dependent Gating of. *J. Biol. Chem.* **281**, 40174–82 (2006).

37. Cao, C. *et al.* Polyester modification of the mammalian trpm8 channel protein: Implications for structure and function. *Cell Rep.* **4**, 302–315 (2013).
38. Shapovalov, G. *et al.* Opiates modulate thermosensation by internalizing cold receptor TRPM8. *Cell Rep.* **4**, 504–515 (2013).
39. Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H. & Viana, F. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 9215–9224 (2009).
40. Gavva, N. R. *et al.* Reduced TRPM8 expression underpins reduced migraine risk and attenuated cold pain sensation in humans. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
41. Zuo, X., Ling, J. X., Xu, G. Y. & Gu, J. G. Operant behavioral responses to orofacial cold stimuli in rats with chronic constrictive trigeminal nerve injury: Effects of menthol and capsaizepine. *Mol. Pain* **9**, (2013).
42. Ramachandran, R. *et al.* TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7476–7481 (2013).
43. Colvin, L. A., Johnson, P. R. E., Mitchell, R., Fleetwood-Walker, S. M. & Fallon, M. From bench to bedside: A case of rapid reversal of bortezomib-induced neuropathic pain by the TRPM8 activator, menthol. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 4519–4520 (2008).
44. Willis, D. N., Liu, B., Ha, M. A., Jordt, S.-E. & Morris, J. B. Menthol attenuates respiratory irritation responses to multiple cigarette smoke irritants. *FASEB J.* **25**, 4434–4444 (2011).
45. Bai, V. *et al.* Androgen regulated TRPM8 expression: a potential mRNA marker for metastatic prostate cancer detection in body fluids. *Int J Oncol* **36(2)**, 443–50 (2010).
46. Reimúndez, A. *et al.* Deletion of the cold thermoreceptor TRPM8 increases heat loss and food intake leading to reduced body temperature and obesity in mice. *J. Neurosci.* **38**, 3643–3656 (2018).
47. Moraes, M. N. *et al.* Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 2415–2427 (2017).
48. Andersson, K.-E. Potential Future Pharmacological Treatment of Bladder Dysfunction. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **119**, 75–85 (2016).



49. Williams, N. M. *et al.* Genome-Wide Association Study of Pain in Parkinson's Disease Implicates *TRPM8* as a Risk Factor. *Mov. Disord.* mds.28001 (2020). doi:10.1002/mds.28001
50. T, B. S. *et al.* SULFONAMIDES AS TRPM8 MODULATORS. (2009).
51. Colburn, R., Dax, S., Flores, C. & Matthews, J. Cold menthol receptor-1 antagonists. (2012).
52. Parks, D. J. *et al.* Design and optimization of benzimidazole-containing transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) antagonists. *J. Med. Chem.* **54**, 233–247 (2011).
53. Zhu, B. *et al.* Arylglycine derivatives as potent transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) antagonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 2234–2237 (2013).
54. Inoue, T., Ohmi, M., Kawamura, K., Ando, K. & Shishido, Y. Sulfamoyl benzoic acid derivatives as TRPM8 antagonists. (2010).
55. Ohmi, M. *et al.* Identification of a novel 2-pyridyl-benzensulfonamide derivative, RQ-00203078, as a selective and orally active TRPM8 antagonist. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 5364–5368 (2014).
56. Kato, T., Sakamoto, T., Kubo, A. & Sawamoto, D. Sulfonamide compounds. (2014).
57. Irlapati, N. *et al.* Fused oxazole and thiazole derivatives as TRPM8 modulators. (2010).
58. Behrendt, H. J., Germann, T., Gillen, C., 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. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 737–745 (2004).
59. Lampe, T. *et al.* Substituted benzyloxyphenylmethylurea derivatives, processes for preparing them, pharmaceutical compositions containing them, and their use as CMR-1 (cold menthol receptor 1) antagonists. (2007).
60. M, N. *et al.* TRP-M8 receptor ligands and their use in treatments. (2009).
61. Tamayo, N. A. *et al.* Fused piperidines as a novel class of potent and orally available transient receptor potential melastatin type 8 (TRPM8) antagonists. *J. Med. Chem.* **55**, 1593–1611 (2012).
62. Chaudhari, S. *et al.* Spirocyclic piperidine derivatives as TRP8 modulators. (2010).

63. Bertamino, A. *et al.* Tryptamine-Based Derivatives as Transient Receptor Potential Melastatin Type 8 (TRPM8) Channel Modulators. *J. Med. Chem.* **59**, 2179–2191 (2016).
64. Andrews, M. D. *et al.* Discovery of a selective TRPM8 antagonist with clinical efficacy in cold-related pain. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 419–424 (2015).
65. Ortar, G. *et al.* (-)-Menthylamine derivatives as potent and selective antagonists of transient receptor potential melastatin type-8 (TRPM8) channels. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 2729–2732 (2010).
66. Defalco, J., Steiger, D., Dourado, M., Emerling, D. & Dunton, M. A. J. 5-Benzyloxytryptamine as an antagonist of TRPM8. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 7076–7079 (2010).
67. Boess, F. G. *et al.* Functional and radioligand binding characterization of rat 5-HT<sub>6</sub> receptors stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* **36**, 713–720 (1997).
68. Terada, Y. *et al.* Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by voacangine, an alkaloid present in *Voacanga africana*, an african tree. *J. Nat. Prod.* **77**, 285–297 (2014).
69. Terada, Y. *et al.* Identification of indole alkaloid structural units important for stimulus-selective TRPM8 inhibition: SAR study of naturally occurring iboga derivatives. *J. Nat. Prod.* **77**, 1831–1838 (2014).
70. Ostacolo, C. *et al.* Isoxazole derivatives as potent transient receptor potential melastatin type 8 (TRPM8) agonists. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 659–669 (2013).
71. Bertamino, A. *et al.* Identification of a Potent Tryptophan-Based TRPM8 Antagonist with in Vivo Analgesic Activity. *J. Med. Chem.* **61**, 6140–6152 (2018).
72. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
73. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**, 869–871 (2002).
74. Cordero-Sánchez, C., Mudarra-Fraguas, I. & Fernández-Carvajal, A. Fluorescence-Based Functional Assays for Ca<sup>2+</sup>-Permeable ThermoTRP Channels. in *TRP Channels*.

- Methods and Protocols* (eds. Ferrer-Montiel, A. & Hucho, T.) 105–117 (Springer Protocols, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9446-5\_8,
75. Babnigg, G., Heller, B. & Villereal, M. L. Cell-to-cell variation in store-operated calcium entry in HEK-293 cells and its impact on the interpretation of data from stable clones expressing exogenous calcium channels. *Cell Calcium* **27**, 61–73 (2000).
76. Plosker, G. L. & McTavish, D. Sumatriptan. A Reappraisal of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Acute Treatment of Migraine and Cluster Headache. *Drugs* **47**, 622–651 (1994).
77. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. & Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacological Reviews* **55**, 597–606 (2003).

