



GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Área de Bioquímica y Biología Molecular

TRABAJO DE FIN DE GRADO

*El canal iónico TRPM8 como diana
farmacológica para el tratamiento de la
migraña: búsqueda de nuevos compuestos
moduladores de su actividad*

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CURSO 2023-2024

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

Autora: Sonia Ramírez Botella

Tutora: Asia Fernández Carvajal

Co-tutora: Laura Butrón García

RESUMEN

Los receptores de potencial transitorio (TRP) están considerados una superfamilia de canales iónicos polimodales cuya activación, que puede provenir tanto de estímulos físicos como químicos, permite el flujo de cationes a través de la membrana. En los últimos años han sido ampliamente estudiados ya que son un objetivo prometedor para el tratamiento de numerosas enfermedades, como el cáncer o el dolor crónico. El principal canal termo-TRP responsable de la transducción del frío en las neuronas sensoriales es TRPM8. Debido a su amplia distribución y al elevado número de funciones fisiológicas que lleva a cabo, este canal juega un importante papel en diversas patologías, como es la migraña. Los tratamientos actuales para esta condición no siempre son efectivos y pueden ocasionar efectos secundarios, por lo que el objetivo de este trabajo será utilizar al canal TRPM8 como diana farmacológica de esta patología para la búsqueda de nuevos moduladores que regulen su actividad. Partiendo de una librería de 36 compuestos previamente seleccionados mediante cribado virtual, a través de ensayos cribado de alto rendimiento, dosis-respuesta, citotoxicidad, selectividad y electrofisiología, se fueron seleccionando aquellos que mostraron mejores características. Finalmente se determinó que el compuesto más prometedor fue el 32, ya que fue capaz de bloquear la actividad de TRPM8 con una eficacia en el rango micromolar bajo y no es citotóxico.

ABSTRACT

Transient receptor potential (TRP) channels are considered a superfamily of polymodal ion channels whose activation, which can come from both physical and chemical stimuli, allows the flow of cations across the membrane. In recent years they have been widely studied as they are a promising target for the treatment of numerous diseases, such as cancer or chronic pain. The main thermo-TRP channel responsible for cold transduction in sensory neurons is TRPM8. Due to its wide distribution and the high number of physiological functions it carries out, this channel plays an important role in various pathologies, such as migraine. Current treatments for this condition are not always effective and can cause side effects, so the objective of this work will be to use the TRPM8 channel as a pharmacological target of this pathology to search for new modulators that regulate its activity. Starting from a library of 36 compounds previously chosen by virtual screening, through high throughput screening, dose-response, cytotoxicity, selectivity and electrophysiology assays, those that showed the best characteristics were selected. Finally, it was determined that the most promising compound was the 32, since it was able to block TRPM8 activity with an efficacy in the low micromolar range and it is not cytotoxic.

Palabras clave: termo-TRP; TRPM8; migraña; dosis-respuesta; cribado de alto rendimiento

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Superfamilia de canales iónicos TRP.....	4
1.2 Canales Termo-TRP.....	6
1.3 Familia TRPM.....	6
1.3.1 TRPM8.....	7
1.4 Implicación de TRPM8 en distintas patologías.....	10
1.4.1 Migraña.....	11
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Cultivos Celulares.....	14
3.2 Librería de compuestos.....	15
3.3 Ensayos fluorimétricos.....	15
3.4 Ensayo de especificidad en TRPV1.....	18
3.5 Ensayo de viabilidad celular.....	19
3.6 Ensayos electrofisiológicos, <i>patch clamp</i>	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Ensayos fluorimétricos.....	21
4.1.1 Cribado de compuestos.....	23
4.1.2 Ensayo dosis-respuesta.....	24
4.2 Ensayo de selectividad en TRPV1.....	26
4.3 Ensayo de viabilidad celular.....	28
4.4 Ensayos electrofisiológicos.....	30
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Superfamilia de canales iónicos TRP

Los receptores de potencial transitorio (TRP) constituyen una superfamilia de canales iónicos de membrana permeables a cationes, que son capaces de responder a una gran variedad de estímulos fisiológicos y ambientales. Los canales TRP se encuentran en todos los organismos eucariotas y se sabe que cada célula expresa uno o más miembros de esta familia de canales TRP, cada uno de los cuales tiene características farmacológicas, biofísicas y/o estructurales distintas. (Diver et al., 2022).

Fueron descubiertos y funcionalmente caracterizados por primera vez en 1969, en un mutante de *Drosophila melanogaster* que presentaba una detección defectuosa de la luz. Estos canales catiónicos no selectivos resultaron ser los impulsores de la despolarización de las células fotorreceptoras en respuesta a la luz, según indicaron los estudios genéticos y electrofisiológicos que fueron llevados a cabo. Mientras que el gen *trp* se identificó en la mosca de la fruta a finales de la década de los sesenta, el primer homólogo humano no se encontró hasta 1995. (Diver et al., 2022; Holzer & Izzo, 2014).

Son una de las familias de canales iónicos más amplias y diversas, con más de 30 subtipos en mamíferos. Los canales TRP de los mamíferos se clasifican en siete subfamilias, cuya clasificación se basa en la homología de las secuencias de aminoácidos y sus estructuras topológicas: TRPC (clásicos o canónicos), TRPV (vanilloides), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) y TRPN (NOMPC de *Drosophila*). Recientemente, se identificó en levaduras la octava subfamilia llamada TRPY, donde la "Y" significa levadura (*yeast*). (Li, 2017).

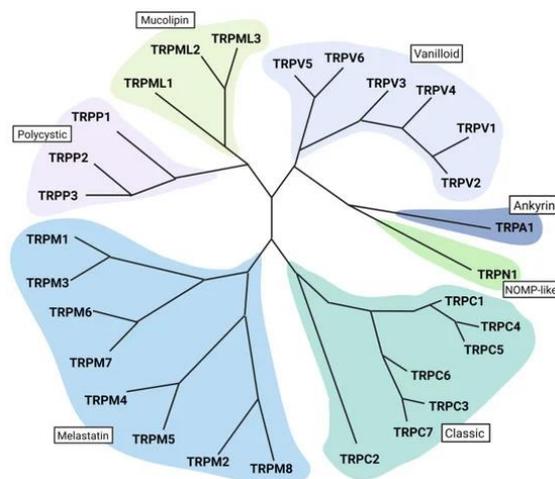


Figura 1. **Árbol genético de la superfamilia de canales TRP**, donde se muestran las 7 subfamilias de canales TRP en mamíferos y los respectivos miembros de cada familia. (Spekker et al., 2023).

A su vez, estas familias se subdividen en dos grupos. El grupo 1, incluye las subfamilias TRPC, TRPV, TRPM, TRPA y TRPN, y tienen la mayor homología con la secuencia del TRP de *Drosophila*. Dicha secuencia abarca seis segmentos transmembrana (S1-S6), incluido el *loop* que forma el poro situado entre los segmentos quinto y sexto y los extremos N y C-terminales. A su vez, en el extremo N-terminal citoplasmático, todos los canales TRP presentan repeticiones de anquirina, a excepción de TRPM8. Los canales TRPC, TRPM y TRPN contienen además un dominio TRP que incluye una región más conservada formada por una secuencia de 6 aminoácidos: la TRP-box. Por otro lado, están los canales del grupo 2, que incluyen las subfamilias TRPP y TRPML, tienen una relación más distante con el TRP de *Drosophila* ya que poseen una baja similitud de secuencia y un *loop* extracelular entre el primer y segundo segmento transmembrana. (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Jia & Yichang, 2017; Venkatachalam & Montell, 2007).

Estos canales TRP participan en numerosas funciones debido a su amplia distribución en diversos órganos. No solo se pueden encontrar en el cerebro, sino también en el corazón, riñón, testículos, pulmones, hígado, bazo, ovarios, intestinos, próstata, placenta, útero y tejidos vasculares. Además, están presentes en numerosos tipos celulares, tanto células neuronales como tejidos no neuronales, así como en células endoteliales vasculares o células del sistema inmunológico. La activación de los canales TRP en las neuronas despolariza la membrana plasmática, lo que promueve la generación de potencial de acción. En las células no excitables, estos canales participan en una variedad de procesos, como la proliferación celular, la señalización y la diferenciación. (Fernández-Carvajal et al., 2020; Froghi et al., 2021).

Son conocidos por su capacidad de regular múltiples señales, jugando así un papel crucial en la percepción sensorial y la fisiología celular. Es por esa variedad de funciones y mecanismos de acción que no sorprende que muchos de estos canales estén asociados con distintas patologías. Algunas de estas patologías, conocidas como canalopatías, son de origen genético y están causadas por defectos en los genes que codifican estos canales. En trastornos respiratorios, los TRPs regulan la respuesta inflamatoria y la percepción sensorial, estando implicados en enfermedades como el asma y la EPOC. También están involucrados en enfermedades neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia o la migraña, ya que juegan un papel importante en la transmisión del dolor. En la diabetes, estos canales están involucrados en la homeostasis de la glucosa y la función de las células beta pancreáticas. También se ha visto que varios canales muestran una expresión alterada en diversos tipos de cánceres y juegan un importante papel en varios procesos relacionados con el cáncer como son la angiogénesis o la proliferación celular. (Koivisto et al., 2022; Marini et al., 2023).

1.2 Canales Termo-TRP

Dentro de los canales TRPs, se encuentran los llamados termo-TRPs, canales cuya apertura es extremadamente sensible a la temperatura, por lo que ante variaciones térmicas generan una corriente despolarizante que produce la despolarización de la membrana celular. Hasta el momento, 11 canales con habilidades termosensibles han sido identificados en mamíferos, pertenecientes a las subfamilias TRPV, TRPC, TRPA y TRPM. Algunos de estos canales implicados en la sensibilidad térmica son por ejemplo TRPV1, TRPV2, TRPM2, TRPM5, TRPM8 y TRPA1 que se expresan en neuronas sensoriales y TRPV3 y TRPV4, que se expresan en los queratinocitos de la piel. Cada uno de ellos se activa dentro de unos rangos de temperatura específicos. Por ejemplo, los cuatro canales de la subfamilia TRPV responden al calor, desde temperaturas intermedias hasta el calor extremo, mientras que los receptores TRPM8 y TRPA1 participan en la percepción del frío y del frío nocivo, respectivamente. (Herrera et al., 2008; Voets, 2014).

Las neuronas somatosensoriales son las responsables de detectar la temperatura externa y convertirla en actividad neural que luego se transmitirá al sistema nervioso central a través de entradas aferentes. Tienen sus terminaciones sensoriales en tejidos altamente sensibles al frío como la piel y la mucosa, y sus cuerpos celulares en el ganglio trigémino (TG) y en los ganglios de las raíces dorsales (DRGs). En los extremos periféricos de estas neuronas juegan un papel importante estos termo-TRPs. Es por ello que con el fin de elucidar sus posibles funciones como termosensores en el sistema somatosensorial, estos canales han sido objeto de numerosas investigaciones. (Kashio & Tominaga, 2022; Voets, 2014).

1.3 Familia TRPM

Dentro de la superfamilia de TRPs, una importante familia son los receptores de potencial transitorio de melastatina. Está formado por 8 miembros que a su vez pueden ser divididos en 4 grupos atendiendo a su homología estructural: TRPM1 y 3, TRPM4 y 5, TRPM6 y 7 y TRPM2 y 8. Estos canales son permeables a Ca^{2+} y no selectivos, a excepción de TRPM4 y 5, que son impermeables a Ca^{2+} . Por su parte, TRPM6 y 7 también son permeables a Mg^{2+} y están implicados en la homeostasis de este ion en mamíferos. Los distintos miembros de esta familia se expresan de manera diferencial en una amplia gama de tejidos, como son las neuronas sensoriales primarias (TRPM3, TRPM8), la próstata (TRPM8), las células β pancreáticas (TRPM2, TRPM3, TRPM5), las células de la retina (TRPM1), los riñones (TRPM6), y el hígado y el corazón (TRPM4). (Fernández-Carvajal et al., 2020).

1.3.1 TRPM8

El canal iónico TRPM8, es un canal sensible al frío y uno de los más estudiados dentro de la subfamilia TRPM, que se expresa en aproximadamente un 15% de las neuronas sensoriales. Inicialmente aislado de células de cáncer de próstata, es un canal iónico polimodal compuesto por 1104 aminoácidos, permeable al Ca^{2+} y no selectivo para otros cationes. Ha sido identificado como el sensor fisiológico del frío ambiental. (David D. McKemy., 2007; Ferrandiz-Huertas et al., 2014).

El canal TRPM8 humano adopta una disposición homotetramérica característica. Cada subunidad presenta un dominio N-terminal, llamado pre-MHR, que va seguido de las cuatro regiones conservadas características de la subfamilia TRPM, conocidas como MHR (*melastatin homology regions*), comprendiendo la mayor parte citoplasmática del canal. Las regiones de homología de melastatina van seguidas de un dominio transmembrana (TMD) que abarca las seis hélices transmembrana características de estos canales iónicos. Por otro lado, el dominio C-terminal (CTD), compuesto por dos hélices, es el que contiene el dominio TRP y el que está implicado en la regulación mediada por temperatura. (Palchevskiy et al., 2023).

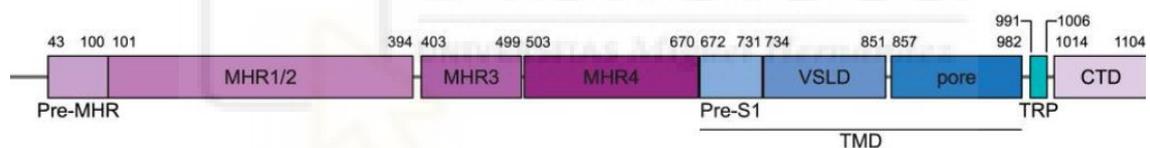


Figura 2. Mapa esquemático de los dominios estructurales del canal TRPM8. (Palchevskiy et al., 2023).

Además, ciertos residuos y enlaces dentro del canal son esenciales para su función y localización en la membrana plasmática. Por ejemplo, el enlace disulfuro entre Cys929 y Cys940 es esencial para su función, o los residuos 40-86 que están involucrados en la correcta localización del tetrámero TRPM8. La amplia distribución de este canal en los distintos tejidos sugiere el importante papel que este desempeña. (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Izquierdo et al., 2021)

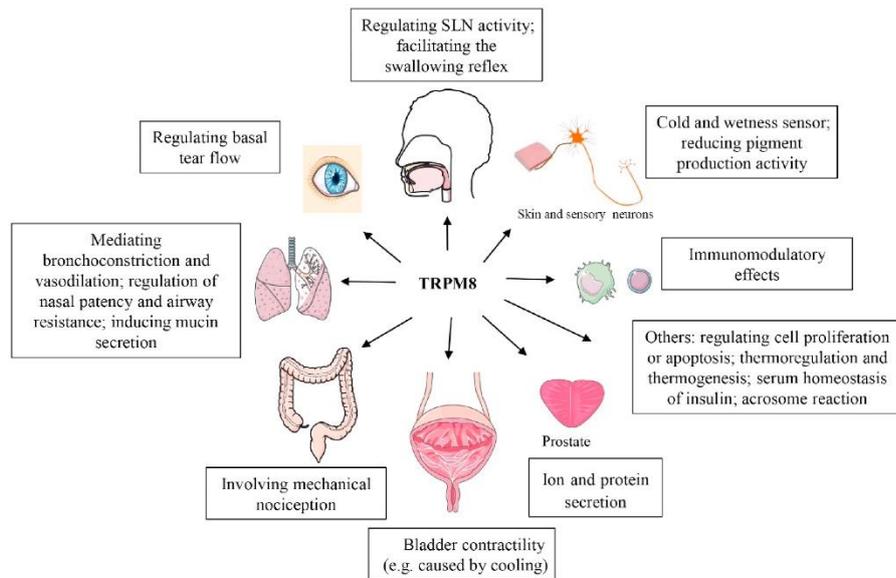


Figura 3. Las funciones fisiológicas de TRPM8 en los distintos órganos y tejidos del organismo. (Liu et al., 2020).

Se sabe que su activación se da generalmente a bajas temperaturas (17°C y 25°C). Sin embargo, se ha visto *in vivo* que el canal responde a temperaturas de la piel, lo que sugiere la presencia de factores endógenos que regulan su función en las neuronas sensoriales primarias. Además de las frías temperaturas, se conocen diversos compuestos, tanto naturales como sintéticos, capaces de activar este canal, como son el mentol, la icilina o el eucaliptol. (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Madrid & Pertusa, 2014).

Existen también varios mensajeros secundarios intracelulares y vías de señalización que pueden modular la actividad del TRPM8. En esta regulación endógena juegan un papel importante los fosfoinosítidos, como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), regulador positivo que interactúa con el dominio TRP y controla la activación mediante frío, voltaje o mentol. La entrada de calcio a través de TRPM8 lleva a la activación de una isoforma de fosfolipasa C dependiente de calcio y a la subsiguiente hidrólisis de PIP2, lo que favorece la desensibilización de TRPM8. Este canal también puede verse regulado por mecanismos de fosforilación, ya que la activación de PLC-β conduce no solo a la reducción de los niveles de PIP2, sino también a la activación de la proteína quinasa C (PKC) dependiente de calcio, que también produce la desensibilización de TRPM8. La activación indirecta de esta enzima produce desfosforilaciones de TRPM8 que conducen a una menor actividad del canal iónico. Por otro lado, la calmodulina dependiente de Ca²⁺ proporciona un mecanismo de desensibilización rápido. Además, recientes hallazgos sugieren una posible regulación multifacética de TRPM8 por receptores acoplados a proteínas G, que incluyen la modulación de la sensibilidad del canal mediante los niveles de PIP2. (Iftinca & Altier, 2020; Premkumar et al., 2005).

Estudios con microscopía electrónica han permitido resolver incógnitas acerca de la estructura y modulación de estos canales. No solo presentan, al igual que el resto de los canales iónicos, una conformación abierta y otra cerrada, sino también un estado inactivo o desensibilizado que ocurre tras una exposición prolongada a un agonista y Ca^{2+} o a una estimulación continua. En el estado cerrado no hay interacción entre los segmentos 4 y 5. Sin embargo, en el estado desensibilizado dicha interacción sí ocurre, formándose durante la transición del estado cerrado al desensibilizado y sugiriendo que juega un papel crucial en el cambio de estado del canal. (Diver et al., 2019; Pérez De Vega et al., 2016).

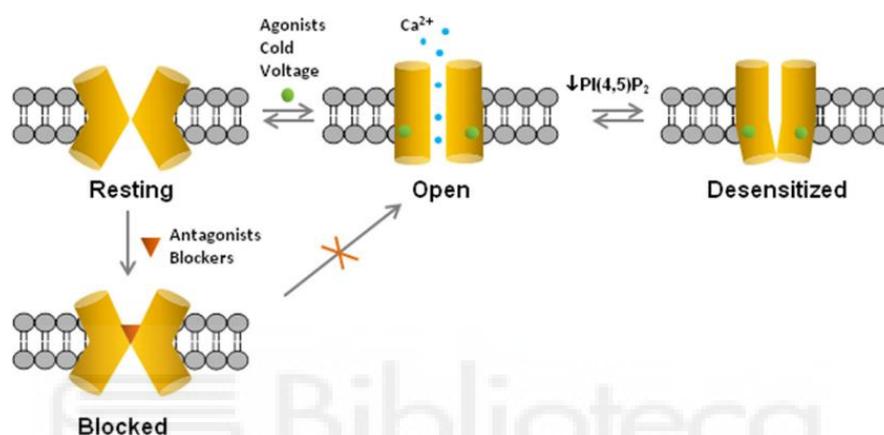


Figura 4. Esquema de los diferentes estados conformacionales del canal TRPM8: en reposo, abierto, cerrado o desensibilizado. (Pérez De Vega et al., 2016).

Como ya ha sido previamente mencionado, el canal es capaz de responder a moléculas moduladoras de su actividad. Responde a agonistas como el mentol, un alcohol terpenoide que se encuentra en las hojas de menta y que activa el canal TRPM8 produciendo una sensación de frescor. También responde ante otros compuestos refrescantes como el eucaliptol o la icilina, más potente que el mentol y capaz de activar a TRPM8 y TRPA1, y a compuestos de origen sintético como el WS12, agonista potente y selectivo de este canal. (Alarcón-Alarcón et al., 2022; David D. McKemy., 2007; Izquierdo et al., 2021).

También cabe mencionar bloqueadores de este canal, ya que tanto agonistas como antagonistas puede tener potencial terapéutico según la patología en la que esté implicado TRPM8. Uno de los bloqueadores de este canal más estudiados es el N-(3-Aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)benzamida hidrocloreuro (AMTB), capaz de inhibir la activación de TRPM8 inducida por mentol. También se conocen otros como la urea derivada de (3-cloro-piridin-2-il)-piperazina (BCTC), que fue inicialmente descrito como modulador de TRPV1, pero que posteriormente se vio que bloqueaba la respuesta de TRPM8 al mentol o la icilina. (Lashinger et al., 2008; Pérez De Vega et al., 2016).

Hasta ahora, tanto los agonistas como los antagonistas identificados están ayudando a comprender mejor el papel de los canales TRPM8 en los procesos fisiopatológicos y tienen potencial de convertirse en tratamientos eficaces. (González-Muñiz et al., 2019).

1.4 Implicación de TRPM8 en distintas patologías

El canal TRPM8 participa en muchos procesos fisiopatológicos, aunque en muchos de estos su función sigue siendo desconocida. Independientemente de su activación o bloqueo, el TRPM8 ha ganado popularidad en los últimos años por su prometedor potencial terapéutico. (Izquierdo et al., 2021; Liu et al., 2020).

TRPM8 juega un papel significativo en las **enfermedades genitourinarias**, especialmente en trastornos de la vejiga. Se ha visto en ensayos *in vivo* que TRPM8 es el único sensor responsable de la contracción de la vejiga inducida por enfriamiento de la piel y es por eso que, en pacientes con vejiga hiperactiva, el clima frío agrava los síntomas. Además, en pacientes con esta patología, la densidad de canales TRPM8 en las fibras nerviosas aferentes de la vejiga es mayor, correlacionándose con la severidad del dolor y la frecuencia de vaciado de la vejiga. (Aizawa & Fujita, 2022; Liu et al., 2020).

Este canal también modula la **respuesta inmune**. Se ha visto que la activación o bloqueo de TRPM8 en macrófagos determina acciones anti- o proinflamatorias mediante la regulación de la interleucina 10 y TNF- α , respectivamente. Además, en un estudio reciente se demostró que la inhibición de este canal influenciaba la diferenciación de monocitos humanos a macrófagos, promoviendo propiedades fagocíticas. Por estos motivos, este canal podría ser de relevancia en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. (Hornsby et al., 2022; Liu et al., 2020).

Se ha visto que este canal también está implicado en diferentes tipos de cáncer como son el cáncer de próstata o el cáncer de mama. Por su parte, en el **cáncer de próstata** la expresión del canal en la membrana plasmática o en la membrana del retículo endoplasmático de las células epiteliales secretoras de la próstata, está asociada al estado de diferenciación de las células. Análisis inmunohistoquímicos en tejidos de adenocarcinoma de próstata y próstata normal muestran que la expresión del TRPM8 se retira de la membrana plasmática a medida que aumenta la gravedad del tumor, lo que sugiere una asociación inversa con la progresión y severidad del cáncer de próstata. Recientes estudios *in vivo* que la sobreexpresión de TRPM8 limitó el crecimiento del tumor y su metástasis. (Grolez et al., 2022).

De la misma manera, a pesar de que los estudios sobre la implicación de TRPM8 en **cáncer de mama** son escasos, análisis inmunohistoquímicos han demostrado que hay sobreexpresión de este canal en tejidos de adenocarcinoma mamario humano. Además, hay evidencias de que el estradiol regula la expresión de TRPM8 en líneas celulares de cáncer de mama. (Chodon et al., 2010; Ochoa et al., 2023).

El frío inicia respuestas autonómicas respiratorias dependientes de TRPM8, incluyendo tos, constricción de las vías respiratorias y secreción mucosa. Tanto las bajas temperaturas como el mentol relajan la mucosa nasal humana, aumentando así el volumen del tejido y la resistencia nasal, siendo este el motivo por el cual el agonista mentol se ha utilizado ampliamente como tratamiento antitusivo. Estas respuestas sugieren que TRPM8 tiene un papel importante en la protección y la regulación de las vías respiratorias, y su disfunción podría estar implicada en **trastornos respiratorios** como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). De hecho, un polimorfismo del gen TRPM8 se ha relacionado positivamente con la hiperreactividad de las vías respiratorias causada por el frío, un síntoma común del asma bronquial. (Gu & Lee, 2021; Liu et al., 2020).

1.4.1 Migraña

Finalmente, se ha visto que TRPM8 está involucrado en trastornos del sistema nervioso central y periférico, por lo que su regulación puede ser ventajosa para el tratamiento del dolor neuropático, particularmente las **migrañas**. La migraña es un trastorno neurológico crónico que se caracteriza por un dolor de cabeza unilateral recurrente, que suele durar entre 4 y 72 horas y puede venir acompañado de muchos otros síntomas como fotofobia, náuseas y vómitos. Aproximadamente el 12% de la población está afectada por esta patología, y es más grave en las mujeres. (Alarcón-Alarcón et al., 2022; Spekker et al., 2023).

Como ya sabemos, TRPM8 se expresa en subpoblaciones de neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico que están relacionadas con la patogénesis de la migraña, como neuronas trigeminales o DRGs. Por otro lado, estudios de asociación de genoma completo (GWAS) recientes, indican que TRPM8 es un gen de susceptibilidad a la migraña, aunque la expresión de este es diferente en todo el mundo. Además, alrededor del 50% de los pacientes con migraña presentan alodinia al frío. Para ver la posible implicación del canal en esta condición, se llevaron a cabo experimentos *in vivo*, en los cuales la administración de icilina provocó alodinia facial y de las patas traseras en ratas, indicando que la activación de TRPM8 provocaba comportamientos similares a los de la migraña. A su vez se vio que estos comportamientos

podían bloquearse con un pretratamiento de un antagonista de TRPM8, lo que confirmó aún más el papel de TRPM8 en el desarrollo de la migraña. Por otro lado, se observó que, si el canal se activaba simultáneamente durante una inflamación, podía actuar como mecanismo analgésico. (Liu et al., 2020; Spekker et al., 2023).

Con el fin de buscar explicación a la mayor prevalencia de esta patología en mujeres, se han llevado a cabo estudios que han demostrado que la testosterona activa este canal en varios sistemas celulares, por lo que recientemente TRPM8 fue descrito como un receptor ionotrópico de testosterona. La principal causa de las diferencias entre hombres y mujeres es la mayor antinocicepción en los hombres. En esta juega un papel importante la testosterona, agonista endógeno de TRPM8 que muestra funciones anti nociceptivas en ratones. De esta manera, esta disparidad entre hombres y mujeres se debe a la actividad del TRPM8 en respuesta a la testosterona endógena, hormona androgénica que está presente en niveles mucho más altos en los hombres que en las mujeres. Por este motivo se concluye que la testosterona induce el dimorfismo sexual a través de su interacción con el TRPM8 en la migraña crónica y posiblemente en otras patologías relacionadas con el dolor. (Alarcón-Alarcón et al., 2022; Asuthkar et al., 2015).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Como ha sido descrito, los canales TRP están implicados en numerosas enfermedades, incluyendo algunas hereditarias. Es por ello que durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios por parte de la comunidad científica que han permitido elucidar aspectos funcionales y estructurales de estos. Moduladores de estos receptores, en concreto TRPV1-4, TRPM8 y TRPA1, han llegado a la fase de desarrollo clínico, pero todavía no han sido aprobados para la práctica clínica. Por su parte, TRPM8 ha sido ampliamente estudiado como un nociceptor sensible al frío y se ha descrito su implicación en numerosas patologías, desde la migraña, hasta el dolor neuropático o el cáncer de próstata. (Fernández-Carvajal et al., 2020; Spekker et al., 2023).

La amplia distribución e implicación fisiológica de este canal hacen que un mal funcionamiento pueda derivar en diversas condiciones patológicas. Diversos estudios han demostrado que tanto el bloqueo del canal mediante antagonistas como la desensibilización a través de agonistas pueden resultar en estrategias válidas para el desarrollo de nuevas terapias. (Acharya et al., 2021; Spekker et al., 2023).

El desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades recientemente asociadas a este canal se centra en la búsqueda de moduladores selectivos para TRPM8, y buscan la reducción de los efectos secundarios de los fármacos actuales y la mejora de su eficacia. Es necesario encontrar antagonistas de TRPM8 con una alta eficacia terapéutica que presenten perfiles de seguridad clínica aceptables. (González-Muñiz et al., 2019).

Ya se conocen numerosos moduladores del canal, capaces de activar o bloquear el canal. No obstante, muchos de estos compuestos no presentan una afinidad lo suficientemente alta o activan o bloquean de forma indirecta a otros canales, limitando su potencial terapéutico. Por ejemplo, la icilina es capaz de activar tanto a TRPM8 como a TRPA1. (Ferrandiz-Huertas et al., 2014; Gentry et al., 2010; González-Muñiz et al., 2019).

Particularmente en la migraña, el tratamiento actual cuenta con una gran variedad de enfoques tanto farmacológicos como no farmacológicos. Entre los medicamentos más comunes se encuentran los triptanes o los antagonistas del receptor CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*). Aunque estos tratamientos pueden ser efectivos y han mostrado un perfil de seguridad notable, no siempre son adecuados debido a sus efectos secundarios. (de Vries et al., 2020; Wattiez et al., 2020).

Por ello, existe una necesidad urgente de desarrollar moduladores selectivos y eficaces para la migraña. Los moduladores selectivos de TRPM8 representan una vía prometedora, ya que podrían ofrecer beneficios terapéuticos específicos sin los efectos secundarios asociados con los tratamientos actuales, proporcionando un tratamiento más seguro. (Dussor & Cao, 2016).

En definitiva, el canal TRPM8 es una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la migraña y otras patologías relacionadas con el dolor y la inflamación. La búsqueda de moduladores selectivos de TRPM8 puede abrir nuevas vías para tratamientos más efectivos y seguros que mejoren la calidad de vida de los pacientes. Por ello, los objetivos de este Trabajo de Fin de Grado serían:

- Emplear la base teórica adquirida durante el grado en un entorno práctico dentro de un laboratorio de investigación científica.
- Llevar a cabo un cribado de alto rendimiento mediante técnicas fluorimétricas para la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de TRPM8 que puedan tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades como la migraña

- Determinar las características farmacológicas de los compuestos mediante la realización de ensayos dosis-respuesta, selectividad y citotoxicidad.
- Verificar la actividad de los compuestos seleccionados mediante técnicas de electrofisiológicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos Celulares

Para los ensayos de cribado de compuestos y de viabilidad celular, el modelo experimental empleado fue la línea celular HEK-CR1. Son células embrionarias de riñón humano que han sido transfectadas con un plásmido que expresa de manera estable el canal TRPM8 de rata. Estas células fueron cultivadas en monocapa utilizando el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Thermo Fisher) al 10%, solución de penicilina estreptomicina al 1% y 0.45 mg/mL de Geneticina 418 y se mantuvieron en condiciones controladas a 37°C y 5% de CO₂. El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 175 cm², tratándolas con Tripsina-EDTA al 0.25% una vez alcanzaban un 80 - 100% de confluencia para dar un nuevo pase o sembrar placas para la realización de distintos ensayos.

Para los ensayos de cribado, selectividad y viabilidad se utilizan microplacas de 96 pocillos que han sido previamente tratadas con una dilución de 100 µL de Poly-L-Lysina en 10 mL de PBS 1X para permitir que las células se adhieran a la placa. En los ensayos de cribado y de selectividad, las células se siembran a una densidad de 50.000 células por pocillo y se cultivan durante 24 horas. Para los ensayos de viabilidad celular se sigue el mismo tratamiento de las microplacas, pero las células se siembran a una densidad de 30.000 células por pocillo en medio durante 48 horas.

En los experimentos de electrofisiología (*patch-clamp*), se utilizaron placas de 24 pocillos, pretratadas de la misma manera que se ha descrito previamente. Las células se sembraron a una concentración de 20.000 células por pocillo y se incubaron durante 48 horas antes de realizar el ensayo.

Por otro lado, en los ensayos de selectividad se utilizaron células HEK-TRPV1 que expresan establemente el canal TRPV1 humano. Estas células se cultivaron en medio DMEM F12, suplementado con 10% de FBS, 1% de P/S, 1% de Geneticina y 1% de aminoácidos no esenciales

(NEM-AA), manteniéndose a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Las condiciones de siembra de esta línea celular son las mismas que para HEK-CR1.

3.2 Librería de compuestos

Para los ensayos de actividad de TRPM8 se utiliza como agonista el mentol. La preparación del compuesto se realizó a partir de un stock de mentol a 500 mM utilizando como diluyente tampón de ensayo acuoso (*Assay Buffer*). Se prepara a concentraciones de 1 mM de manera que al inyectar 10 µL por pocillo, la concentración final sea de 100 µM.

Como antagonista de referencia se utiliza el AMTB, cuya preparación se realizó a partir de una disolución stock de AMTB a 10 mM. Se disuelve en DMSO y se prepara a concentraciones de 1 mM, de manera que al añadir 1 µL por pocillo, la concentración final en este sea de 10 µM.

En el presente trabajo se han evaluado 36 compuestos seleccionados a partir de una librería química de más de 4 millones de compuestos. La selección de estos compuestos se realizó mediante un proceso de *docking* molecular. Este enfoque computacional permitió identificar los compuestos con mayor potencial para interactuar con nuestro objetivo biológico de interés. Para el cribado de los compuestos se utilizaron inicialmente dos concentraciones: 50 y 5 µM. Posteriormente se utilizaron 6 concentraciones (100, 30, 10, 1, 0.1 y 0.01 µM) para cada compuesto seleccionado a partir del cribado con el fin de definir sus curvas dosis respuesta y caracterizar sus potencias.

Estos compuestos son solubles en disolventes orgánicos, como el DMSO. Se debe tener en cuenta que este disolvente puede presentar efectos citotóxicos a concentraciones superiores al 1%, por lo que en el ensayo no superaremos nunca dicha concentración.

3.3 Ensayos fluorimétricos

Para el cribado de compuestos y los ensayos dosis-respuesta se llevaron a cabo medidas funcionales mediante ensayos fluorimétricos basados en sondas sensibles a Ca²⁺ que permiten monitorizar la actividad de los canales TRP. Se utilizó la sonda Fluo4-NW que actúa de indicador fluorescente de Ca²⁺ y nos permite medir la actividad de TRPM8, al ser este permeable al calcio. El mecanismo de acción de la sonda Fluo-4 es detectar pequeños cambios en la concentración de Ca²⁺, permitiendo la medición del Ca²⁺ intracelular. Para ello, esta sonda se carga en las células

que están expresando el canal de interés y que en este caso son sensibles al Ca^{2+} . En presencia de un agonista, los canales se abrirán con el consecuente incremento de calcio citosólico y por tanto un aumento en la fluorescencia emitida por la sonda Fluo4-NW. Por el contrario, la adición de un antagonista impedirá la entrada de Ca^{2+} al citosol mediante el cierre del canal, imposibilitando el incremento de señal fluorescente.

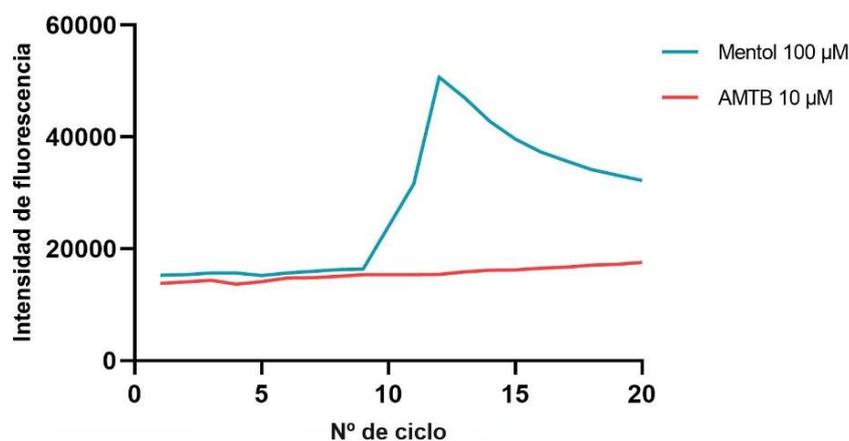


Figura 5. Esquema representativo de la activación e inhibición del canal TRPM8 en células HEK-CR1. Se representa la subida de fluorescencia por la adición de mentol en el ciclo 10, y el bloqueo por la presencia del inhibidor añadido en el ciclo 4, de manera que no se produce el aumento en la intensidad de fluorescencia al añadirse en el ciclo 10 el agonista.

De esta manera, los ensayos fluorimétricos, mediante la detección de cambios en la fluorescencia provocados por la unión de calcio a la sonda, nos permiten el estudio de la actividad del canal y por tanto determinar la acción que ejercen determinados compuestos sobre él.

Como se ha explicado en el apartado de cultivos celulares, las células HEK-CR1 se siembran en placas de 96 pocillos negras con fondo transparente con una densidad de 50.000 células por pocillo. Pasadas 24 horas y con una confluencia cercana al 100% se procede a llevar a cabo el ensayo. Primeramente, se retira el medio de cultivo y se añaden 100 µL de sonda Fluo-4AM. Esta sonda es sensible a la luz y la temperatura, por lo que el protocolo se realiza en condiciones de oscuridad. Posteriormente se deja incubar la placa durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y pasado este tiempo, las células se dejan durante otros 30 minutos en el lector de placas CLARIOstar OMEGA, el cual se encuentra a una temperatura de 30°C en su interior. Es entonces cuando se realizan las medidas de fluorescencia en el lector de placas, que realiza 20 ciclos de lectura y mide la fluorescencia media de todo el pocillo.

Durante los tres primeros ciclos se realizan medidas de la fluorescencia basal. En el ciclo 4 la placa se extrae del lector y se añaden manualmente los compuestos a ensayar, así como los

controles. Como control negativo se añade 1 µl de AMTB a una concentración final en pocillo de 10 µM. En el caso del control positivo, se añade 1 µl de DMSO, ya que este es el vehículo tanto de los compuestos a ensayar como del AMTB. En el ciclo 10 el equipo inyectará de forma automática 10 µl de mentol en todos los pocillos de la placa, teniendo como concentración final 100 µM. La placa se lleva de vuelta al lector, se deja reposar 2 minutos para que la temperatura de las células se estabilice y se retoma la medida. En el ciclo 10 el equipo detiene la medición e inyecta automáticamente el agonista mentol a una concentración de 100 µM por pocillo.

Si los compuestos son antagonistas del canal, no se verá un incremento de fluorescencia tras su adición en el ciclo 4 ni tras la inyección del mentol en ciclo 10, ya que estarán bloqueando el canal e impidiendo el paso de Ca²⁺ al interior celular y la subida de fluorescencia consecuente. Por el contrario, los compuestos que muestren un carácter agonista producirán un aumento en la fluorescencia tras ser añadidos en el ciclo 4, lo que significará que están produciendo la activación del canal.

Se ensayaron los 36 compuestos a concentraciones de 50 y 5 µM y se evaluó la actividad del canal TRPM8 en presencia de estos para ver si eran capaces de modular su actividad. Posteriormente, se seleccionaron los 5 compuestos que mostraron mayor eficacia para realizar un ensayo dosis-respuesta con el fin de caracterizar su potencia, en el que se ensayaron 6 concentraciones de cada compuesto. Para dar validez a los experimentos, previo al cribado y a los ensayos dosis-respuesta, se realizaron medidas fluorimétricas de los controles positivo (mentol) y negativo (AMTB) a concentraciones alrededor de su EC₅₀ e IC₅₀, respectivamente.

Para validación de los resultados se utilizó el factor Z, un parámetro estadístico que mide el tamaño del efecto estadístico y es crucial para evaluar la fiabilidad y reproducibilidad de los experimentos. Su valor máximo es 1, y solo se admitieron aquellos ensayos que presentaron valores del factor Z entre 0.5 y 1. Se calculó con la siguiente fórmula, donde el μ_{max} representa los valores medios de la intensidad de fluorescencia de los controles positivos y μ_{min} de los negativos; y la SD representa la desviación estándar de los controles positivos (*max*) y negativos (*min*):

$$Factor\ Z = 1 - \frac{3 \cdot (SD_{max} + SD_{min})}{(\mu_{max} - \mu_{min})}$$

La modulación de los canales TRP se evaluó según el carácter agonista o antagonista de los compuestos. Para los compuestos agonistas, se comparó el incremento de la fluorescencia tras

su aplicación en el ciclo 3 con el aumento de fluorescencia generado por el control positivo (mentol 100 μM) en el ciclo 11. En el caso de los compuestos antagonistas, se contrastó el aumento de fluorescencia producido por el agonista de referencia en presencia de los compuestos en el ciclo 11 con el incremento de fluorescencia del control positivo en el mismo ciclo. Así, dependiendo del carácter agonista o antagonista de los compuestos, se calcularon respectivamente los porcentajes de activación o inhibición del canal, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Activación} = \left(\frac{F_4 - F_3}{FC_{11} - FC_{10}} \right) \cdot 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{F_{11} - F_{10}}{FC_{11} - FC_{10}} \right) \cdot 100$$

La “F” representa la fluorescencia en los pocillos con compuesto; La “FC” representa la fluorescencia de los pocillos de control positivo; y los números hacen referencia al ciclo en el que se llevaron a cabo las medidas, siendo el ciclo 3 antes de añadir los compuestos y el ciclo 4 tras su adición; y el ciclo 10 antes de la inyección del control positivo y el ciclo 11 tras su inyección.

Finalmente utilizó el programa informático GraphPad Prism 8.0.2 para el análisis estadístico de los datos, la generación de figuras y curvas dosis-respuesta y el cálculo de los valores de potencia (IC50) a través del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación de Hill.

3.4 Ensayo de selectividad en TRPV1

Para determinar la selectividad por el canal TRPM8, se llevó a cabo un ensayo de lectura de fluorescencia con los mismos pasos descritos previamente, pero en este caso se usaron células HEK-TRPV1. Se utilizó como control negativo el rojo rutenio (RR) a 10 μM y como control positivo, capsaicina 10 μM (CPS), agonista reconocido de TRPV1. Se probaron únicamente los cinco compuestos que fueron seleccionados tras los ensayos dosis-respuesta a cinco concentraciones cada uno: 100, 30, 10, 1 y 0.1 μM . En el ciclo 10, el equipo inyecta capsaicina 10 μM .

Además, para aquellos compuestos en los que se observó un aumento de fluorescencia en el ciclo 4, es decir, tras la adición de los mismos, se realizó un ensayo adicional en el que se evaluó si este aumento se debía a un efecto agonista sobre TRPV1. Para ello, se utilizó el mismo

protocolo que en experimentos anteriores, con la diferencia de que esta vez añadimos rojo rutenio de forma previa al inicio del ensayo.

El análisis inicial de los datos para evaluar el comportamiento de los compuestos se realizó de manera similar a la descrita para el modelo celular de TRPM8 en el apartado 3.3.

3.5 Ensayo de viabilidad celular

Se realizó un ensayo colorimétrico de viabilidad celular, conocido como ensayo de MTT, para determinar la citotoxicidad de los compuestos seleccionados.

Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que puede ser medible por un espectrofotómetro.

A diferencia de las placas de 96 pocillos negras utilizadas para los ensayos anteriores de medida de fluorescencia, para este ensayo se utilizan placas transparentes, y se siembran las células HEK-CR1 a una densidad celular de 30.000 células por pocillo. Las células se incuban a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia a la placa y se preparan los compuestos a ensayar diluidos en DMSO a una concentración no tóxica (1%). En nuestro caso se prepararon 5 compuestos a 4 concentraciones cada uno: 200, 100, 50 y 10 µM. Pasado este tiempo se retiró el medio de cultivo, se añadieron 100 µL de compuesto por pocillo y las células se volvieron a incubar en las mismas condiciones durante 24 horas más para permitir que los compuestos actuasen sobre todas las células. Tras esta incubación se añadieron 5 µL de MTT en oscuridad, a partir de un stock de 5 mg/mL diluido en tampón PBS y se incubaron durante 4 horas a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán. Entonces se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µL de DMSO puro por pocillo, homogenizando bien hasta que los cristales de formazán se disuelvan. Finalmente se llevan al lector de placas CLARIOstar Omega, donde se lleva a cabo la lectura de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 570 nm con un filtro de referencia de 620 nm y con una agitación de 1 minuto previa antes de la medida para asegurar que los cristales quedan disueltos.

Tomando como control positivo de crecimiento celular los pocillos sin ningún tratamiento (medio de cultivo); y como control negativo de mortalidad cercana al 100% los pocillos en los que se añade tampón de ensayo enriquecido como dodecilsulfato sódico (SDS) a concentración de 0.1 mg/mL, se calcula el porcentaje de viabilidad celular para cada compuesto y para cada una de las concentraciones ensayadas mediante la siguiente fórmula:

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

3.6 Ensayos electrofisiológicos, *patch clamp*

Para verificar la actividad antagonista de los compuestos seleccionados se prepararon experimentos de *patch-clamp* utilizando la modalidad *whole-cell voltage-clamp*. Para ello se sembró la línea celular HEK-CR1 en placas de 24 pocillos a una concentración de 20.000 células/pocillo con cristales de 12 mm. Tras 48h de incubación se realizó el ensayo con la configuración especificada, la cual registra las corrientes de todos los canales iónicos de la célula manteniendo un voltaje de -60 mV constante.

La solución interna utilizada en los experimentos contenía (en mM) 150 NaCl, 5 EGTA, 3 MgCl₂ and 10 HEPES ajustada a un pH de 7,2 con KOH; y la solución externa empleada contenía (en mM) 150 NaCl, 6 CsCl, 1,5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-glucosa y 10 HEPES, ajustada a un pH de 7,4 con NaOH.

El experimento de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* comienza con la formación un sello de alta resistencia entre la membrana celular y una micropipeta de vidrio, la cual se encuentra llena de solución interna. La micropipeta se acerca a la superficie celular y se aplica una ligera succión, provocando la invaginación de la membrana y la formación del sello, logrando una resistencia de 1 GΩ. Luego, se aplica una pequeña succión adicional para romper la porción invaginada de la membrana, permitiendo que la solución interna entre en contacto con el citoplasma. Una vez establecida la conexión, el potencial de membrana se fijó a -60 mV para registrar la corriente de todos los canales activables.

En condiciones control, se aplicaron dos pulsos de mentol a 100 μM, denominados P1 y P2, con un intervalo de 120 segundos para evaluar la desensibilización del canal TRPM8. Para probar el compuesto, se aplicó a una concentración de 50 μM, 30 segundos antes y durante el segundo

pulso de mentol. Los resultados se expresaron como porcentaje de activación de TRPM8 tras la adición de los compuestos, calculando la relación P2/P1 de las condiciones testadas y normalizándola con la relación P2/P1 del control.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos fluorimétricos

Para poder evaluar correctamente la efectividad de los compuestos a ensayar en la activación o inhibición del canal, es fundamental establecer controles adecuados que permitan interpretar los resultados de los experimentos. En estos experimentos, el mentol será utilizado como control positivo y el AMTB como control negativo. El mentol activa el canal provocando un aumento de fluorescencia detectada por el equipo, mientras que el AMTB inhibe el canal, lo que se traduce en una ausencia o disminución de la fluorescencia.

Es por ello que antes de realizar las mediciones de fluorescencia en las placas experimentales en las que se evaluara la efectividad de los compuestos, se llevan a cabo mediciones de placas "controles" para evaluar la respuesta al mentol y al AMTB, aplicando diferentes concentraciones de estos. Ambos compuestos se prueban a 16 concentraciones, desde 1 mM hasta 0.3 μ M para el mentol y desde 100 μ M hasta 5 pM para el AMTB.

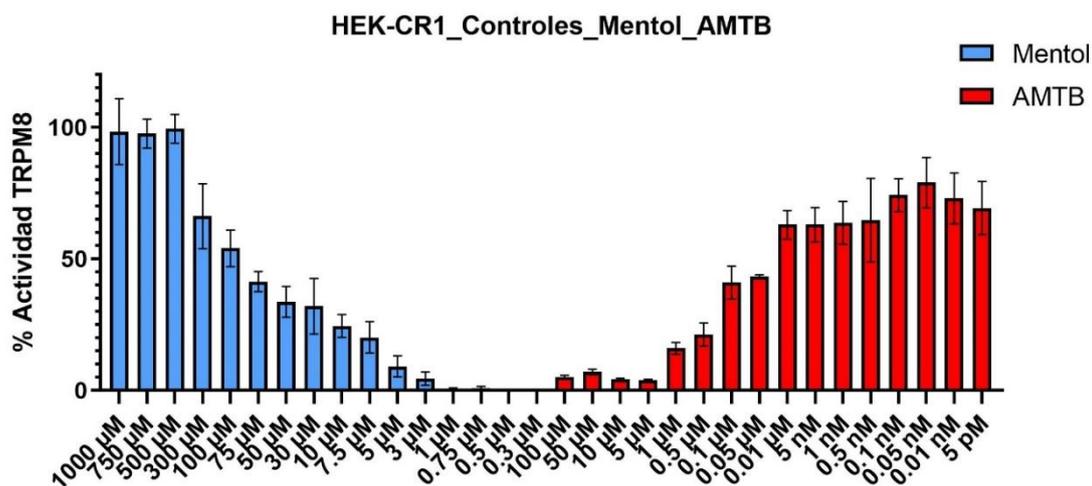


Figura 6. Representación de la activación del canal TRPM8 en presencia de Mentol y AMTB. Se evalúa el efecto del agonista de referencia (mentol) y del antagonista de referencia (AMTB). $n=3$, $N=2$, $Z>0,5$.

Para el mentol se observa una disminución progresiva en la activación del canal a medida que se reducen las concentraciones. Las concentraciones más altas de mentol produjeron una activación significativa del canal, mientras que esta activación disminuyó con la reducción de la concentración del mentol, confirmando su papel como un agonista del canal. En el caso del AMTB se observa el comportamiento inverso. A concentraciones más altas, mayor inhibición del canal se observa, y a medida que disminuyen las concentraciones de AMTB, se observa un aumento en la activación del canal, corroborando su función como antagonista.

Se puede ver en la *Figura 7* las curvas dosis-respuestas de los controles positivo y negativo, que nos permiten obtener la EC_{50} y la IC_{50} respectivamente.

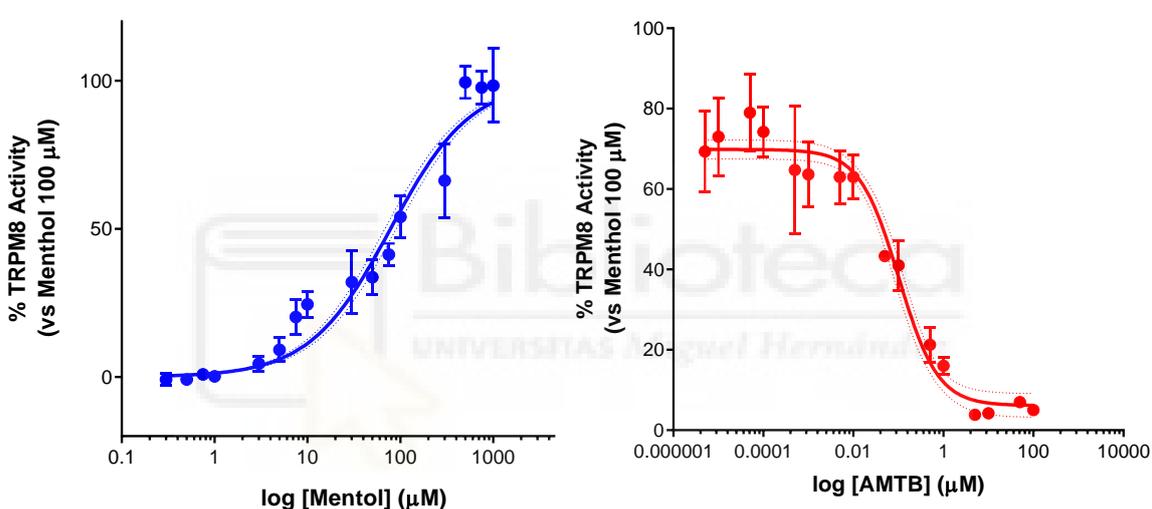


Figura 7. Curvas dosis-respuesta mentol y AMTB. Se representan los valores de % de actividad del canal TRPM8 normalizados para el control positivo de mentol 100 µM, frente al logaritmo de la concentración de los distintos compuestos. Cada punto representa el % de actividad media ± SD. Las líneas continuas representan las sigmoides ajustadas por la ecuación de Hill, y las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza (95%).

Para el mentol, la EC_{50} , concentración a la que se observa la mitad de la activación máxima, es de $78,4 \pm 1,1$ µM. Para el AMTB, la IC_{50} , concentración a la que se observa una inhibición del 50%, es de $0,1 \pm 1,1$ µM. Debido a que en nuestros ensayos buscaremos la activación o inhibición máxima del canal, se usará como control positivo el mentol a concentración 100 µM y como control negativo el AMTB a concentración 10 µM.

4.1.1 Cribado de compuestos

Se realizó un cribado de alto rendimiento de una colección de 36 compuestos con el fin de identificar nuevas moléculas que tuviesen efecto sobre la actividad del canal TRPM8 en células HEK-CR1, utilizando técnicas fluorimétricas, tal y como se detalla en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. La actividad del canal se determinó a concentraciones de 50 y 5 μM . Todos los compuestos mostraron un carácter antagonista sobre TRPM8 en presencia de mentol, y se seleccionaron aquellos que fueron más eficaces, comparando su comportamiento con la acción del agonista AMTB de referencia.

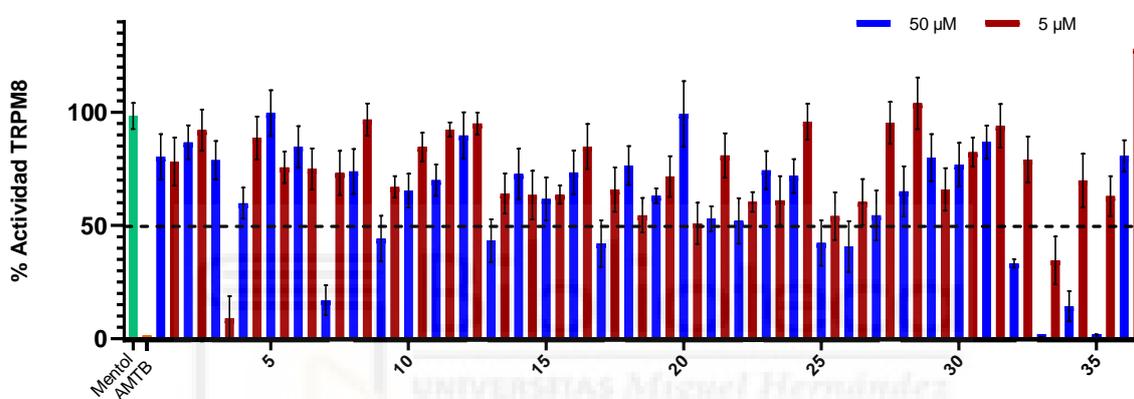


Figura 8. **Cribado de alto rendimiento de la colección de 36 compuestos.** En verde el control positivo (mentol 100 μM) y en naranja el control negativo (AMTB 10 μM). Se representa la media de los resultados del % de actividad del canal TRPM8 \pm SD. $n=3$, $N=3$, $Z>0,5$. La línea discontinua muestra el 50% de activación de TRPM8.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la técnica de cribado se seleccionaron los compuestos que mostraron una mayor actividad bloqueante del canal. Para la concentración de 50 μM , los compuestos 33 y 35 fueron los que resultaron más eficaces en el bloqueo del canal. Sin embargo, para su selección también se tuvo en cuenta la actividad bloqueante de los compuestos a la menor concentración (5 μM). En este caso, el compuesto 33 presentó la mayor actividad inhibitoria.

Finalmente, estos resultados nos permitieron determinar el posible potencial terapéutico de los compuestos como bloqueadores del canal y se escogieron por su eficacia de bloqueo los compuestos 25, 32, 33, 34, 35 para sucesivos estudios de dosis-respuesta que nos permitan obtener su potencia.

4.1.2 Ensayo dosis-respuesta

Tras el cribado inicial y con el fin de caracterizar su potencia, se llevó a cabo un ensayo dosis respuesta de los 5 compuestos seleccionados. Para ello se miden los compuestos a 6 concentraciones (100, 30, 10, 1, 0.1 y 0.01 μM), permitiendo así generar curvas dosis- respuesta que nos permitan obtener la potencia. Debido al carácter antagonista de los compuestos se determinó la concentración inhibidora media máxima (IC_{50}), que nos dará la concentración de antagonista necesaria para reducir la actividad del canal a la mitad.

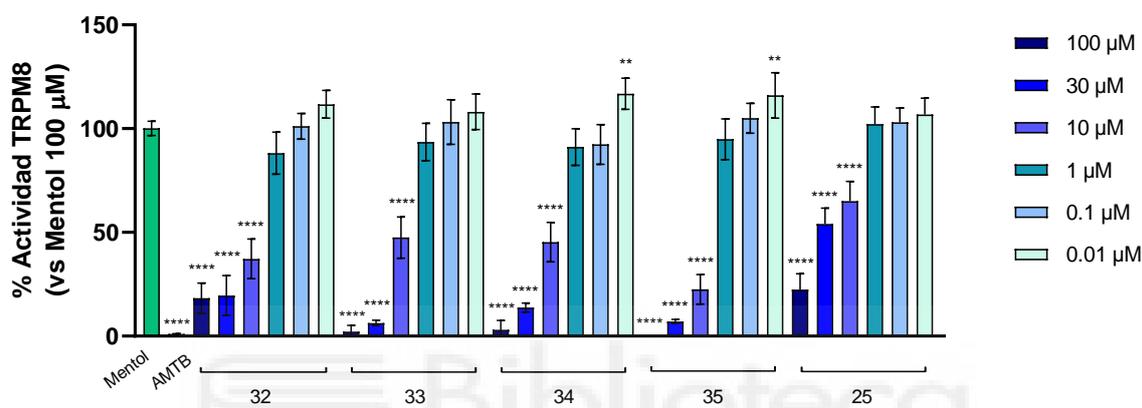


Figura 9. **Cribado dosis-respuesta de compuestos moduladores de TRPM8.** Representación de los valores de actividad del canal TRPM8 normalizados frente al control positivo 100 μM . Se ensayan 6 concentraciones para cada compuesto y se representa la media de los valores \pm SD. Se muestran los compuestos 32, 33, 34, 35 y 25 seleccionados del cribado. Análisis estadístico Ordinary One-Way ANOVA. Los datos significativamente estadísticos están marcados con **** si p-value es $<0,0001$ y con ** si p-value es $<0,01$. $n=3$, $N=3$, $Z > 0,5$.

Con los resultados obtenidos mediante las técnicas fluorimétricas, podemos ver que, los compuestos 25, 32, 33, 34 y 35 fueron capaces de bloquear el canal, reduciendo significativamente su actividad, y se puede apreciar una modulación del canal inversamente proporcional a la concentración del compuesto utilizada.

A continuación, se muestran en la Figura 10 las curvas dosis-respuesta generadas para estos 5 compuestos y sus respectivas IC_{50} en la Tabla 1.

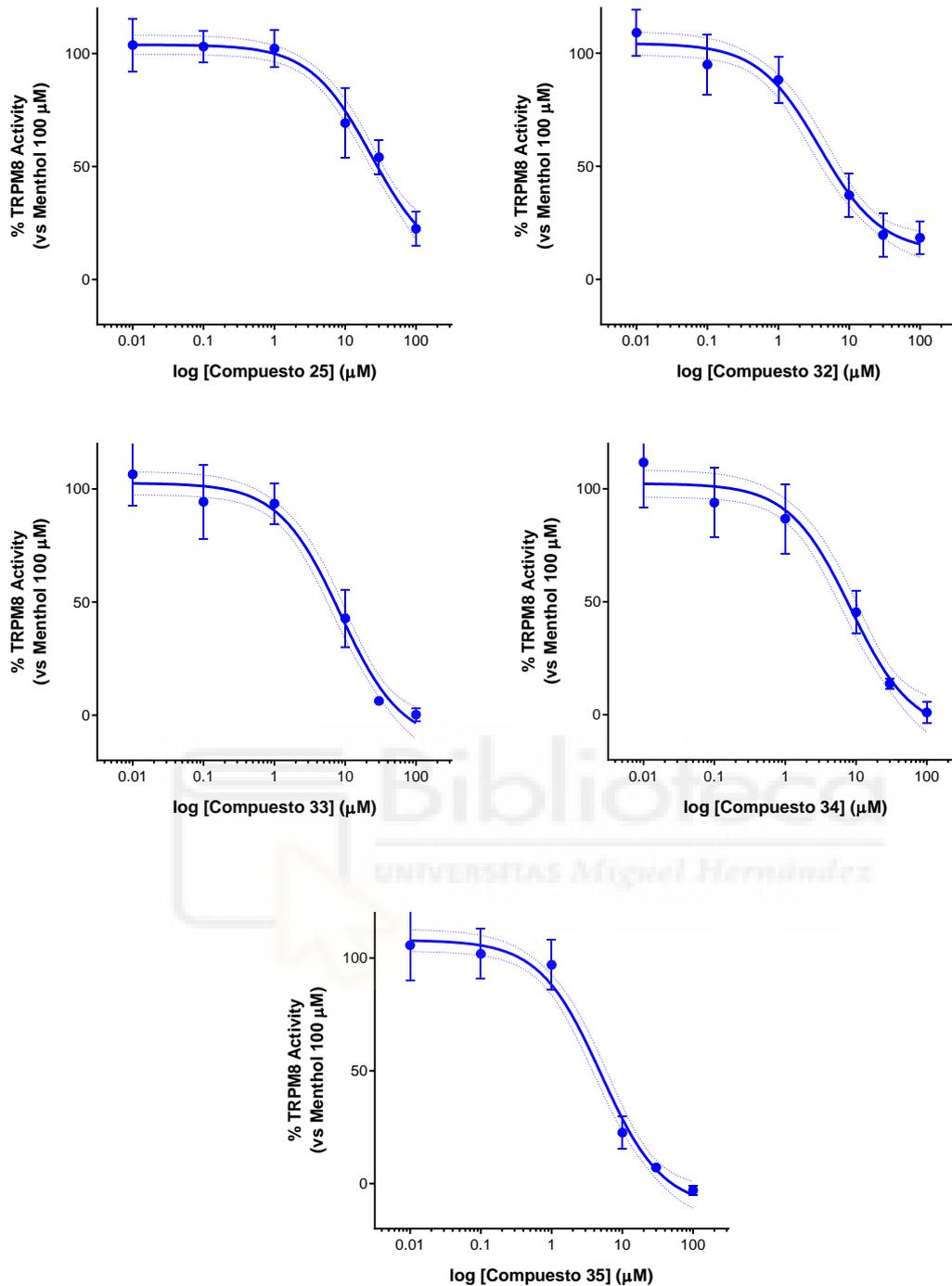


Figura 10. **Curvas dosis-respuesta de los compuestos para la caracterización de su potencia (IC_{50}).** Se muestran las curvas de los compuestos 25, 32, 33, 34 y 35, representando los valores de % de actividad del canal TRPM8 normalizados para el control positivo de mentol 100 μ M, frente al logaritmo de la concentración de los distintos compuestos. Cada punto representa el % de actividad media \pm SD. Las líneas continuas representan las sigmoides ajustadas por la ecuación de Hill, y las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza (95%). $n=3$, $N=3$, $Z > 0,5$.

Compuesto	Potencia (IC ₅₀) ± SD
25	23,5 ± 1,2 μM
32	3,8 ± 1,2 μM
33	8,5 ± 1,2 μM
34	8,4 ± 1,3 μM
35	4,9 ± 1,2 μM

Tabla 1. **Determinación de la potencia de los compuestos en TRPM8.** Se muestran los valores de la IC₅₀ junto con las desviaciones estándar (SD).

Los valores de IC₅₀ nos permiten comparar los compuestos en función de su potencia, siendo los más potentes aquellos que muestren una IC₅₀ más baja. Los dos compuestos con menor IC₅₀ fueron el 32 (3,8 ± 1,2 μM) y el 35 (4,9 ± 1,2 μM). Por el contrario, el compuesto que resultó menos efectivo fue el 25, con una IC₅₀ de 23,5 ± 1,2 μM.

4.2 Ensayo de selectividad en TRPV1

Para determinar la selectividad de los cinco compuestos seleccionados tras los ensayos dosis-respuesta sobre los canales TRPM8, se realizaron ensayos de selectividad descritos en el apartado 3.4 en células HEK-TRPV1. Los compuestos se probaron a cinco concentraciones (100, 30, 10, 1 y 0.1 μM) y se evaluó la actividad del canal en presencia de estos compuestos frente al agonista de TRPV1 (capsaicina, 10 μM), comparándolos con el antagonista de referencia para TRPV1 (rojo rutenio, 10 μM). Los compuestos se analizaron mediante técnicas fluorescentes, siguiendo el mismo procedimiento descrito en los apartados anteriores.

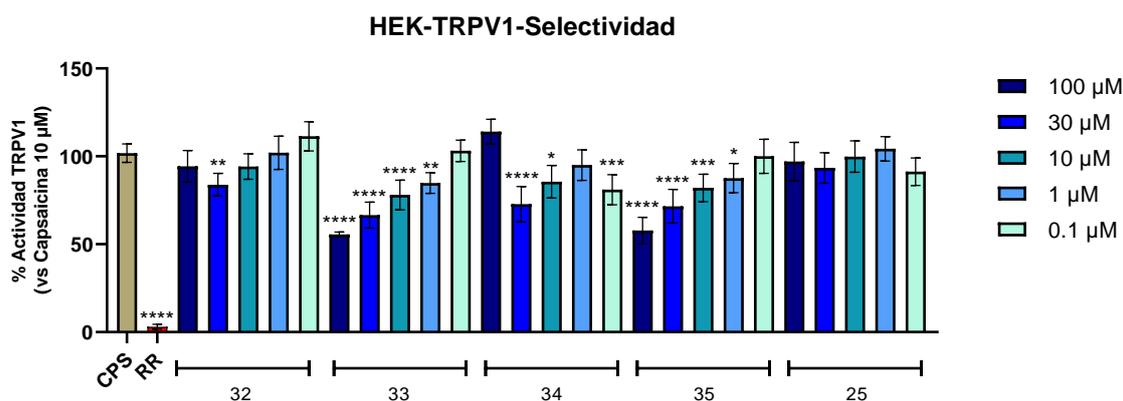


Figura 11. **Selectividad de los compuestos en TRPV1.** Representación de la media ± SD de los resultados de los ensayos fluorimétricos en células HEK-TRPV1 de los 5 compuestos seleccionados a 5 concentraciones. A la izquierda los controles (CPS 10 μM, RR 10 μM). Análisis estadístico Ordinary One-Way ANOVA. Los datos significativamente estadísticos están marcados con **** si p-value es < 0,0001, con *** si p-value es < 0,001, con ** si p-value es < 0,01 y con * si p-value es < 0,1. n=3, N=2

Al igual que en los análisis para TRPM8, para ver si los compuestos podían ser antagonistas del canal TRPV1, se analizó en el ciclo 10, calculando el % de inhibición para ver si había una disminución en la intensidad de fluorescencia ocasionada por los compuestos. En la *Figura 11*, los compuestos 33 y 35 parecían ser antagonistas de TRPV1, ya que se observa una disminución de la actividad del canal en presencia de concentraciones altas de estos compuestos.

Sin embargo, si nos fijamos en las gráficas de intensidad de fluorescencia, ocurre un aumento de fluorescencia al aplicar los compuestos tras el ciclo 3, tal y como se puede ver en la *Figura 12*. Por lo tanto, la aparente inhibición que se observa en los compuestos 33 y 35 (*Figura 11*), es debida a un aumento de la fluorescencia tras la adición de estos, lo que podría indicar un efecto agonista sobre TRPV1. Este aumento deja un nivel de fluorescencia por encima del basal durante todo el registro, haciendo que la respuesta a capsaicina sea más pequeña y dando como resultado una falsa inhibición.

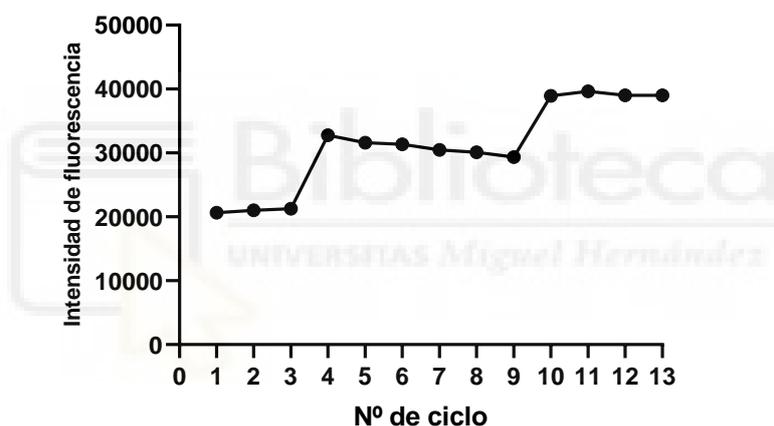


Figura 12. Representación de la subida de fluorescencia en el ciclo 4. Se representa de la media de los valores de intensidad de fluorescencia del compuesto 35 a 100 μ M en células HEK-TRPV1.

Tras esta observación, se comprueba que los compuestos podrían ser en realidad agonistas de TRPV1. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un nuevo ensayo fluorimétrico en la línea celular HEK-TRPV1, pero en esta ocasión se probaron los compuestos 33 y 35 a una concentración de 30 μ M en presencia del antagonista de referencia (RR) para comprobar si la activación estaba ocurriendo vía TRPV1. (*Figura 13*)

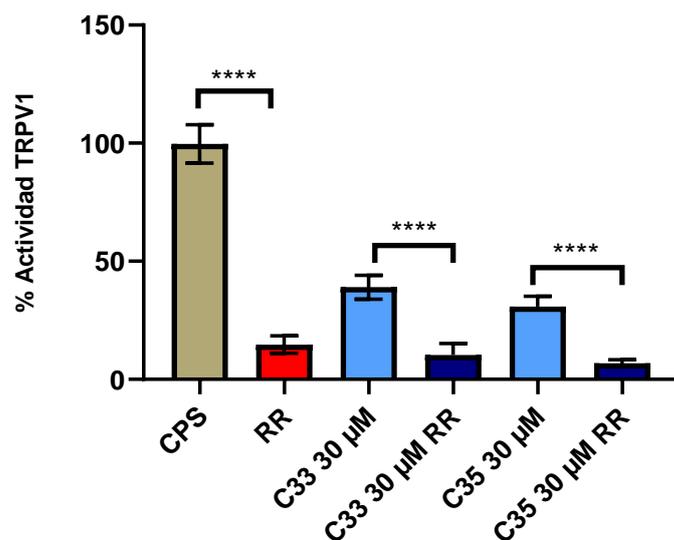


Figura 13. *Selectividad de los compuestos en TRPV1 a concentración 30 μM en presencia de RR. A la izquierda los controles positivos (CPS 10 μM) y negativos (RR 10 μM). Análisis estadístico Unpaired t-test. Valores significativamente estadísticos con un p-value <0,0001 representados mediante ****. n=3, N=2.*

Al aplicar únicamente los compuestos, se observa un aumento en la actividad del canal, pero en presencia de RR esta activación se ve inhibida. Esto nos lleva a concluir que la activación observada en el ciclo 4 es debida a la activación del canal por acción de los compuestos y que por tanto estos son agonistas de TRPV1.

Los compuestos 33 y 35 se han identificado como antagonistas del canal TRPM8 y agonistas de TRPV1. Este hallazgo no es completamente novedoso, ya que estudios recientes han mencionado compuestos capaces de inhibir un canal y activar otro dentro de la familia de los canales TRPs. Por ejemplo, recientemente se identificaron componentes herbales que actúan como agonistas de TRPA1 y antagonistas de TRPM8, lo que respalda la versatilidad de ciertos compuestos en la modulación de canales iónicos. (Sanechika et al., 2021).

4.3 Ensayo de viabilidad celular

Tal y como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos, se evaluó la toxicidad de los compuestos seleccionados en la línea celular HEK-CR1 mediante el ensayo del MTT. La evaluación de la toxicidad de estos compuestos es esencial para su consideración como posibles fármacos.

Se probaron cuatro concentraciones para cada uno de los compuestos, a partir de sus respectivas IC₅₀: 200, 100, 50 y 10 μM.

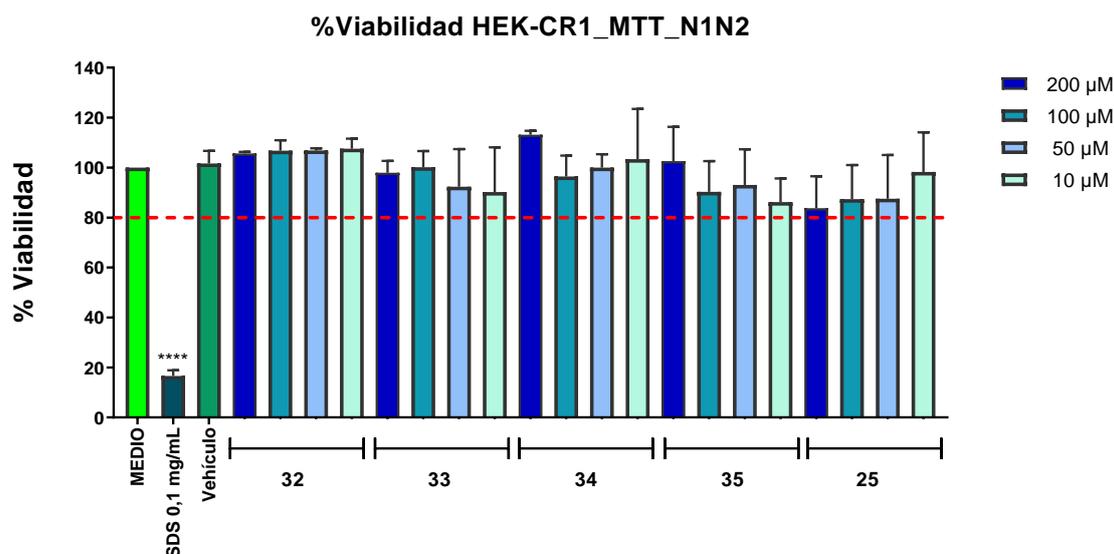


Figura 14. **Porcentaje de viabilidad de las células HEK-CR1 en presencia de los compuestos a 4 concentraciones.** A la izquierda del gráfico se representan el control positivo (medio de cultivo), el control negativo (SDS 0,1 mg/mL) y el control vehículo (DMSO). Se representa la media de los valores obtenidos para cada concentración \pm SD. Análisis estadístico Ordinary One-Way ANOVA. La significancia estadística de los datos está representada como **** (p -value $< 0,0001$). $n=3$, $N=2$.

Los resultados están normalizados en base al control positivo, que contiene el medio de cultivo celular, y como control negativo se ha aplicado el detergente SDS, con una viabilidad celular cercana al 15%. Se puede observar que tanto para el control positivo, como para el control vehículo, la viabilidad celular es cercana al 100%. Esto nos indica que el DMSO, empleado en la disolución de los compuestos en este estudio, no presenta toxicidad hacia las células a las concentraciones utilizadas, por lo que cualquier disminución en la viabilidad celular observada a las diferentes concentraciones de los compuestos ensayados podrá atribuirse a la toxicidad intrínseca de estos, y no al efecto del vehículo. Estos resultados confirman la validez del ensayo al asegurar que el vehículo no interfiere la evaluación de la toxicidad de los compuestos.

Los resultados indican que los compuestos no mostraron citotoxicidad en el sistema celular a ninguna de las concentraciones ensayadas, ya que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80%, umbral generalmente aceptado para considerar un tratamiento no citotóxico. (López-García et al., 2014).

Por lo tanto, se llega a la conclusión de que los compuestos no son tóxicos para las concentraciones especificadas dentro del rango de eficacia.

4.4 Ensayos electrofisiológicos

Los ensayos de electrofisiología se han llevado a cabo, pero no se han obtenido los resultados esperados, debido a una ausencia de respuesta por parte de las células, posiblemente causada por estar trabajando con un pase demasiado alto o por problemas en el tratamiento de los cristales. Estos ensayos no se habían podido realizar con anterioridad, ya que se necesitaban los resultados de los ensayos de cribado, selectividad y citotoxicidad para seleccionar los mejores candidatos.

Para solucionar estos inconvenientes, estamos siguiendo diferentes estrategias: por un lado, se está descongelando un nuevo pase de células para intentar recuperar su funcionalidad; por otro lado, se están probando diferentes protocolos de adhesión celular, modificando la concentración de polilisina, dado que sabemos que puede ser tóxica para las células.



5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Podemos concluir que, dado que TRPM8 participa en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, una búsqueda de moduladores de este canal como la llevada a cabo en el presente trabajo es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos. Teniendo esto en cuenta, de nuestra búsqueda de nuevos moduladores del canal TRPM8 se extraen las siguientes conclusiones:

- A partir de la colección inicial, se seleccionaron cinco compuestos que mostraron un comportamiento antagonista frente al canal TRPM8, logrando reducir significativamente su actividad con una potencia en el rango micromolar bajo, lo que indica su potencial terapéutico.
- Los compuestos con las mejores propiedades farmacológicas fueron el compuesto 32 y el compuesto 35, con una IC_{50} de $3,8 \pm 1,2 \mu M$ y $4,9 \pm 1,2 \mu M$, respectivamente.
- Ninguno de los compuestos seleccionados presentó toxicidad a las concentraciones evaluadas en los ensayos de viabilidad celular.
- Los ensayos de selectividad en presencia de rojo rutenio revelaron que los compuestos 33 y 35 no eran moduladores específicos de TRPM8, ya que mostraron actividad agonista para el canal TRPV1.
- El compuesto 32 es el más prometedor debido a su alta eficacia como inhibidor a bajas concentraciones, su falta de toxicidad y su especificidad por TRPM8.

Como perspectivas futuras, consideramos necesario comprobar la selectividad de los compuestos seleccionados en sistemas celulares que expresen otros canales termo-TRP, como puede ser TRPA1, que también es activado por temperaturas frías.

Adicionalmente, para comprender en mayor profundidad el comportamiento antagonista de los compuestos sería conveniente continuar con los ensayos de electrofisiología en futuras investigaciones. Mediante la técnica de fijación de membrana (*patch-clamp*), se caracterizará el compuesto 32, por ser el más efectivo. Esto nos permitirá determinar con mayor sensibilidad y resolución la cinética de apertura y cierre del canal TRPM8, así como analizar detalladamente la interacción entre los compuestos y los dominios de este canal.

Finalmente, una vez caracterizados los compuestos con mejores propiedades farmacológicas *in vitro*, sería esencial llevar a cabo ensayos en modelos animales. Dado que los compuestos evaluados son bloqueadores del canal, se debería evaluar el efecto farmacológico de estos en modelos animales que presenten patologías en las que TRPM8 esté sobreexpresado, así como

en modelos de cáncer de próstata o de mama para evaluar el posible efecto citotóxico o citostático de los compuestos.



BIBLIOGRAFÍA

1. Acharya, T. K., Tiwari, A., Majhi, R. K., & Goswami, C. (2021). TRPM8 channel augments T-cell activation and proliferation. *Cell Biology International*, 45(1). <https://doi.org/10.1002/cbin.11483>
2. Aizawa, N., & Fujita, T. (2022). The TRPM8 channel as a potential therapeutic target for bladder hypersensitive disorders. *Journal of Smooth Muscle Research*, 58. <https://doi.org/10.1540/JSMR.58.11>
3. Alarcón-Alarcón, D., Cabañero, D., de Andrés-López, J., Nikolaeva-Koleva, M., Giorgi, S., Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2022). TRPM8 contributes to sex dimorphism by promoting recovery of normal sensitivity in a mouse model of chronic migraine. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33835-3>
4. Asuthkar, S., Demirkhanyan, L., Sun, X., Elustondo, P. A., Krishnan, V., Baskaran, P., Velpula, K. K., Thyagarajan, B., Pavlov, E. V., & Zakharian, E. (2015). The TRPM8 Protein Is a Testosterone Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5). <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.610873>
5. Chodon, D., Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Telliez, M. S., Sevestre, H., & Oquadid-Ahidouch, H. (2010). Estrogen regulation of TRPM8 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-212>
6. David D. McKemy. (2007). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*.
7. de Vries, T., Villalón, C. M., & MaassenVanDenBrink, A. (2020). Pharmacological treatment of migraine: CGRP and 5-HT beyond the triptans. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 211). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107528>
8. Diver, M. M., Cheng, Y., & Julius, D. (2019). Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization. *Science*, 365(6460). <https://doi.org/10.1126/science.aax6672>
9. Diver, M. M., Lin King, J. V., Julius, D., & Cheng, Y. (2022). Sensory TRP Channels in Three Dimensions. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 91). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-105738>
10. Dussor, G., & Cao, Y. Q. (2016). TRPM8 and Migraine. In *Headache* (Vol. 56, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/head.12948>
11. Fernández-Carvajal, A., González-Muñiz, R., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2020). Investigational drugs in early phase clinical trials targeting thermotransient receptor potential (thermoTRP) channels. In *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 29, Issue 11). <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1825680>

12. Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of Thermo TRP channels. In *Membranes* (Vol. 4, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>
13. Froghi, S., Grant, C. R., Tandon, R., Quaglia, A., Davidson, B., & Fuller, B. (2021). New Insights on the Role of TRP Channels in Calcium Signalling and Immunomodulation: Review of Pathways and Implications for Clinical Practice. In *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* (Vol. 60, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08824-3>
14. Gentry, C., Stoakley, N., Andersson, D. A., & Bevan, S. (2010). The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Molecular Pain*, 6. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-4>
15. González-Muñiz, R., Bonache, M. A., Martín-Escura, C., & Gómez-Monterrey, I. (2019). Recent progress in TRPM8 modulation: an update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112618>
16. Grolez, G. P., Chinigò, G., Barras, A., Hammadi, M., Noyer, L., Kondratska, K., Bulk, E., Oullier, T., Marionneau-Lambot, S., Mée, M. Le, Rétif, S., Lerondel, S., Bongiovanni, A., Genova, T., Roger, S., Boukherroub, R., Schwab, A., Pla, A. F., & Gkika, D. (2022). TRPM8 as an Anti-Tumoral Target in Prostate Cancer Growth and Metastasis Dissemination. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126672>
17. Gu, Q., & Lee, L. Y. (2021). TRP channels in airway sensory nerves. *Neuroscience Letters*, 748. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135719>
18. Herrera, E., Galindo, R., Díaz, I. J., & Vargas, L. (2008). *Los canales TRP y su participación en la termotransducción.*
19. Holzer, P., & Izzo, A. A. (2014). The pharmacology of TRP channels. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 171, Issue 10). <https://doi.org/10.1111/bph.12723>
20. Hornsby, E., King, H. W., Peiris, M., Buccafusca, R., Lee, W. Y. J., Wing, E. S., Blackshaw, L. A., Lindsay, J. O., & Stagg, A. J. (2022). The cation channel TRPM8 influences the differentiation and function of human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 112(3). <https://doi.org/10.1002/JLB.1HI0421-181R>
21. Iftinca, M., & Altier, C. (2020). The cool things to know about TRPM8! In *Channels* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1841419>
22. Izquierdo, C., Martín-Martínez, M., Gómez-Monterrey, I., & González-Muñiz, R. (2021). Trpm8 channels: Advances in structural studies and pharmacological modulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168502>

23. Jia, Y. T. ;, & Yichang. (2017). Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases. *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases*, 976.
24. Kashio, M., & Tominaga, M. (2022). TRP channels in thermosensation. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 75). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102591>
25. Koivisto, A. P., Belvisi, M. G., Gaudet, R., & Szallasi, A. (2022). Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>
26. Lashinger, E. S. R., Steinginga, M. S., Hieble, J. P., Leon, L. A., Gardner, S. D., Nagilla, R., Davenport, E. A., Hoffman, B. E., Laping, N. J., & Su, X. (2008). AMTB, a TRPM8 channel blocker: Evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 295(3). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90269.2008>
27. Li, H. (2017). TRP channel classification. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 976). https://doi.org/10.1007/978-94-024-1088-4_1
28. Liu, Y., Mikrani, R., He, Y., Faran Ashraf Baig, M. M., Abbas, M., Naveed, M., Tang, M., Zhang, Q., Li, C., & Zhou, X. (2020). TRPM8 channels: A review of distribution and clinical role. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 882). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173312>
29. López-García, J., Lehocný, M., Humpolíček, P., & Sába, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/jfb5020043>
30. Madrid, R., & Pertusa, M. (2014). Intimacies and Physiological Role of the Polymodal Cold-Sensitive Ion Channel TRPM8. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 74, Issue 1, pp. 293–324). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00011-7>
31. Marini, M., Titiz, M., Souza Monteiro de Araújo, D., Geppetti, P., Nassini, R., & De Logu, F. (2023). TRP Channels in Cancer: Signaling Mechanisms and Translational Approaches. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/biom13101557>
32. Ochoa, S. V., Casas, Z., Albarracín, S. L., Sutachan, J. J., & Torres, Y. P. (2023). Therapeutic potential of TRPM8 channels in cancer treatment. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 14). <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1098448>
33. Palchevskiy, S., Czarnocki-Cieciura, M., Vistoli, G., Gervasoni, S., Nowak, E., Beccari, A. R., Nowotny, M., & Talarico, C. (2023). Structure of human TRPM8 channel. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05425-6>

34. Pérez De Vega, M. J., Gómez-Monterrey, I., Ferrer-Montiel, A., & González-Muñiz, R. (2016). Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 59, Issue 22). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00305>
35. Premkumar, L. S., Raisinghani, M., Pingle, S. C., Long, C., & Pimentel, F. (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *Journal of Neuroscience*, 25(49). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3006-05.2005>
36. Sanechika, S., Shimobori, C., & Ohbuchi, K. (2021). Identification of herbal components as TRPA1 agonists and TRPM8 antagonists. In *Journal of Natural Medicines* (Vol. 75, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01515-z>
37. Spekker, E., Körtési, T., & Vécsei, L. (2023). TRP Channels: Recent Development in Translational Research and Potential Therapeutic Targets in Migraine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010700>
38. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 76, pp. 387–417). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
39. Voets, T. (2014). TRP channels and thermosensation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_1
40. Wattiez, A. S., Sowers, L. P., & Russo, A. F. (2020). Calcitonin gene-related peptide (CGRP): role in migraine pathophysiology and therapeutic targeting. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 24, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1724285>