

BÚSQUEDA DE COMPUESTOS MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DEL TERMORRECEPTOR TRPM8



TRABAJO FINAL DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2016/2017

DIRECTORA: ASIA FERNÁNDEZ CARVAJAL



NEUS PAREDES GALLARDO

74384008F
BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Resumen

Se conocen evidencias que relacionan los receptores de potencial transitorio (TRP) con la sensibilidad a estímulos de diversa naturaleza, como físicos, químicos o mecánicos y con procesos patológicos, principalmente dolor e inflamación. Este estudio se centra en el canal TRPM8, conocido termorregulador implicado en diversos procesos patológicos, con lo que su modulación, podría suponer un punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos. El presente estudio abordará la búsqueda de moduladores de TRPM8 a partir de una quimioteca de 30 derivados de β -lactamas mediante técnicas de cribado de alto rendimiento y la caracterización de las propiedades farmacológicas de los compuestos más activos mediante estudios de potencia, viabilidad celular y ensayos in-sílico.

Abstract

There are some evidences that correlate the transitory receptor potential (TRP) channel family with the sensitivity to different stimuli, such as physical, chemical or mechanical ones. These receptors have been correlated to pathological processes too, like pain or inflammation mainly. This study is focused in the TRPM8 member, a well known thermoregulator involved in different pathological processes, which modulation could suppose a starting point to the development of new drugs. The objective of the project is to find channel modulators using a chemical library composed by 30 β -lactame derivates by performing a high throughput screening and to characterize the pharmacological properties of the compounds, studying its potency, cellular viability and performing in-silico experiments.

Palabras clave: TRPs, canales iónicos, antagonistas, cribado de alto rendimiento (HTS), β -lactamas, analgesia.

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Superfamilia TRP	4
1.2. TRPM8	6
1.2.1. Estructura molecular y mecanismos de compuerta	6
1.2.2. Regulación de TRPM8	9
1.2.3. Implicación en condiciones patológicas	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Cultivos celulares	14
3.2. Librería de compuestos	14
3.3. Cribado de alto rendimiento y medidas de actividad mediante técnicas fluorimétricas.....	16
3.4. Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	18
3.5. Ensayos in-silico.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Cribado de derivados de β -lactamas.....	20
4.2. Ensayos de dosis-respuesta	21
4.3. Ensayos de viabilidad celular (MTT)	23
4.4. Análisis de relación estructura-actividad.....	25
4.5. Docking	26
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Superfamilia TRP

La superfamilia de Receptores de Potencial Transitorio (TRP), está compuesta por 30 miembros clasificados en 8 subfamilias (TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP, TRPV y TRPY)(1). Son canales catiónicos que permiten el flujo de Ca^{+2} y Na^{+} cuyas permeabilidades y selectividades varían sustancialmente dependiendo de la isoforma de la que se trate. (2)

Los canales TRP presentan una estructura tetramérica, y cada subunidad está compuesta por seis segmentos transmembrana (S1-6). El poro del canal está formado por el ensamblaje de cada uno de los cuatro dominios transmembrana S5, S6 y el lazo de aminoácidos situado entre ambos (conocido como P-loop). Los extremos carboxilo (C) y amino (N) terminales se localizan en la región intracelular y su longitud y composición aminoacídica varían ampliamente entre unos y otros. Estas regiones citoplasmáticas contienen algunos motivos y dominios altamente implicados en el ensamblaje del canal, la activación, y la regulación de interacciones proteína-proteína y/o proteína-ligando (3)(**Figura 1**).

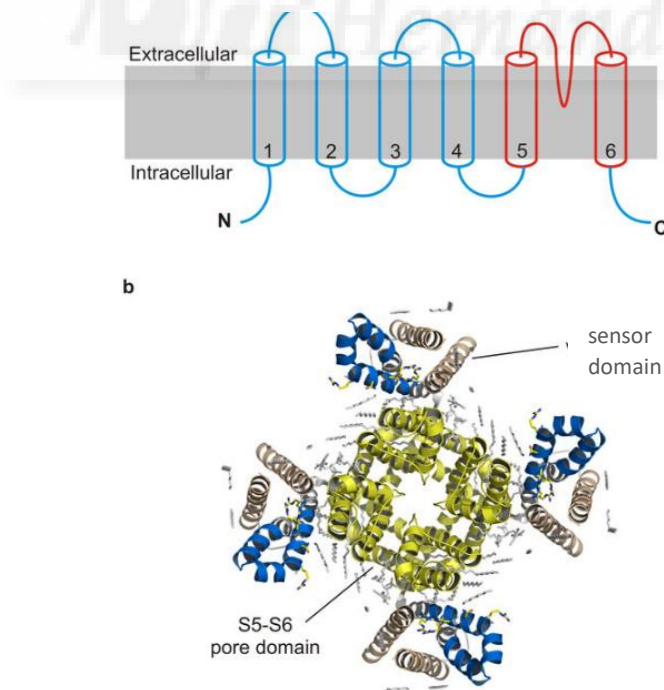


Figura 1. Representación esquemática de la topología de las subunidades del canal y en la parte inferior la estructura cristalográfica del ensamblaje de las cuatro subunidades (4)

Existen evidencias que indican que los canales TRP juegan un papel crucial en la transducción sensorial térmica, en la que el sistema somatosensorial detecta cambios en la temperatura ambiental cuando un estímulo (ya sea calor o frío) excita las fibras sensoriales que parten de la raíz dorsal o el ganglio trigémino, que inervan regiones del tronco y cabeza, respectivamente. En estas neuronas primarias aferentes se encuentran los canales, que inician la ruta que permite la conversión de estímulos térmicos en señales electroquímicas, conocidas como potenciales de acción, encargados de transmitir la información sensorial a los centros integrativos en la médula espinal y el cerebro (5, 1)(Figura 2). Adicionalmente, actúan como receptores e integradores de estímulos muy diversos, como químicos y mecánicos. Además, muchos de estos canales son receptores para ligandos que provocan distintas sensaciones como el frío asociado al mentol, y están implicados en procesos patológicos como el dolor o la inflamación, entre otros (6).

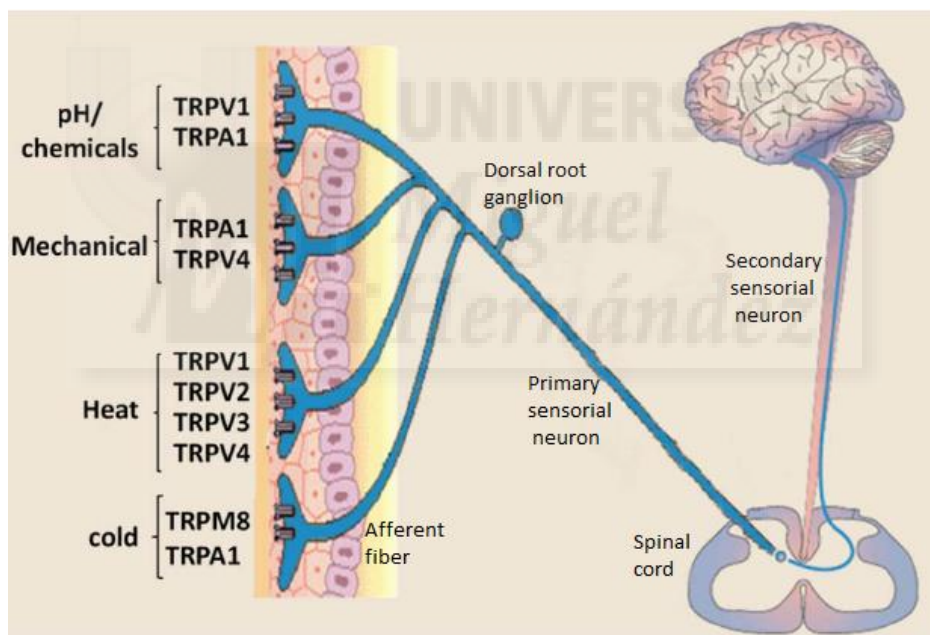


Figura 2. Vía somatosensorial. Los canales TRP se expresan en neuronas sensoriales primarias aferentes. Cuando hay un estímulo ambiental, el canal correspondiente de cada estímulo se abre en respuesta a éste, iniciando la ruta permitiendo la entrada de iones calcio. Esto provoca un potencial de acción que se transmite hasta el cerebro mediante las neuronas sensoriales y la cuerda espinal. Cuando el mensaje llega al córtex somatosensorial en el cerebro, se percibe la sensación específica (frío, calor, dolor...).

La aparición de alteraciones en estos canales ya sea por mutaciones, por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios da lugar a estados patológicos en humanos, como déficits sensoriales, ciertos cánceres, asma, e incluso algunos trastornos neurodegenerativos, gastrointestinales, y cardiovasculares. Por todo ello, estos canales suponen una potencial diana para el desarrollo de fármacos (1).

1.2. TRPM8

Este canal es un termorregulador conocido por actuar como sensor primario del frío en humanos. Su distribución tisular es muy amplia, encontrándose presente en subconjuntos de neuronas que inervan la piel y las mucosas, el tracto urogenital masculino, las células epiteliales pulmonares y miocitos arteriales, aunque su papel específico todavía no está completamente descrito en muchos casos **(1)**.

Se expresan en alrededor del 5% de las neuronas somatosensoriales, incluyendo la mayoría de las de diámetro pequeño, las fibras C y un grupo pequeño de fibras A δ del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y el ganglio trigémino (TG). Por otro lado, hay evidencias de la expresión de estos canales en células de los ganglios geniculado y nodoso del sistema nervioso periférico **(1)**.

Es un canal catiónico no selectivo permeable a Ca⁺², que presenta mecanismos polimodales de apertura. Se activa principalmente por estímulos como el frío inocuo (10-28°C), compuestos como el mentol o la icilina, o compuestos sintéticos entre otros. Está implicado en la termorregulación y en la sensación desagradable de frío **(1)**. La mayoría de estudios se han centrado en el dolor, pero la expresión del canal en varios tejidos abre la posibilidad de que TRPM8 esté implicado en diversas condiciones patológicas y fisiológicas **(7)**.

1.2.1. Estructura molecular y mecanismos de compuerta

Los detalles estructurales acerca de esta proteína actualmente son muy limitados, y no existen datos de estructura de alta resolución, de modo que por homología de secuencia con otros canales de la familia TRP, se deduce que, estructuralmente, el canal está compuesto por 4 subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene 6 dominios transmembrana (S1-S6) que rodean el poro central. De ellos, S5 y S6 forman la compuerta del canal y actúan como filtro selectivo, mientras que S1-S4 constituyen el dominio de detección de los diversos estímulos. **(1, 9)**.

El linker entre S2-S3 parece estar implicado en la interacción con icilina, mientras que los residuos de S2 y S4 son importantes para la apertura del canal inducida por mentol, voltaje y temperatura a los que se suman S4 y el linker entre S4-S5, que también son los responsables de la sensibilidad al voltaje y S6, que está implicado en la selectividad a cationes. **(1)**

El dominio C-terminal es necesario para la maduración, oligomerización, y el transporte del canal a la membrana plasmática, y contiene elementos funcionales implicados en la activación dependiente de temperatura (10). El dominio TRP, al igual que el sitio de unión para Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) se localiza en el extremo C-terminal. Este dominio TRP es importante para el funcionamiento del canal, ya que traduce la unión de ligando en la apertura de este. También se ha demostrado que la región inicial de N-terminal es importante para la correcta biogénesis y función. Tanto el dominio N como el C terminal se encuentran situados en la parte intracelular de la membrana (1, 10).

El canal presenta una glicosilación en el residuo Asn934, que no es crítica para el ensamblaje de la proteína ni para su función, pero modula la actividad del canal y su asociación a dominios lipídicos. Flanqueando el sitio de glicosilación, dos cisteínas forman un puente disulfuro intramolecular esencial para la función del canal. (10)

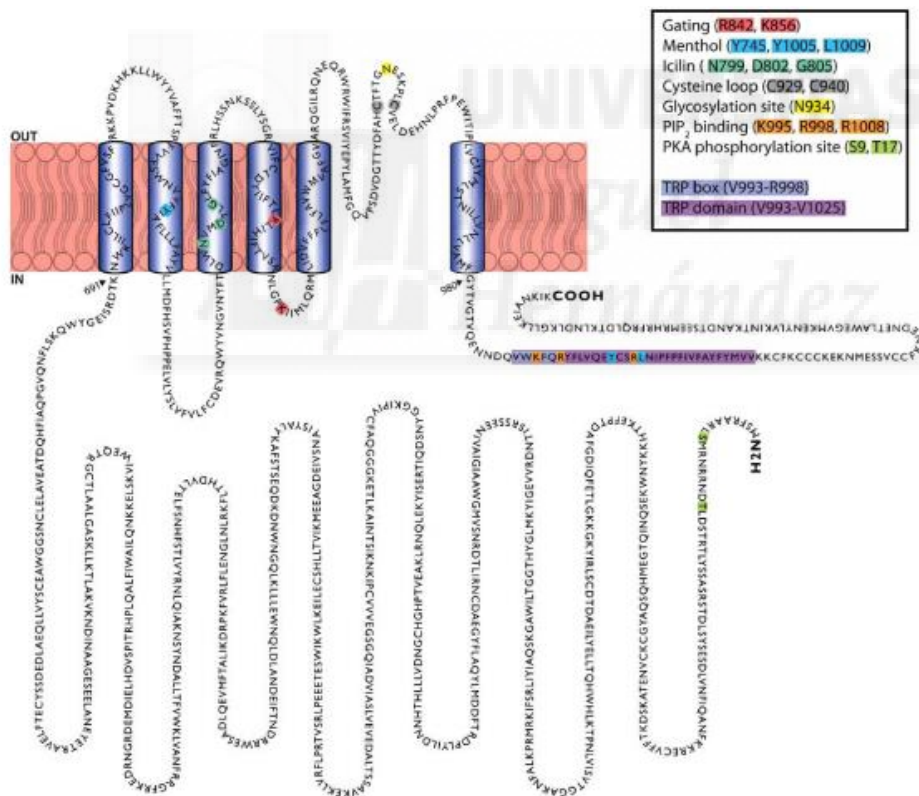


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de TRPM8 que muestra los residuos relevantes para la modulación del canal. Los residuos individuales implicados en aspectos funcionales particulares se muestran subrayados con un código de color (10)

Como la mayoría de canales TRP, TRPM8 muestra activación polimodal, y como ya se ha citado anteriormente, se modula por diversos estímulos, como físicos, químicos o voltaje. **(10)**. Cuando se activa, el canal TRPM8 es permeable a sodio, potasio, cesio y calcio. Su preferencia para dejar pasar cationes en lugar de aniones, viene dado por la región S6. A su vez, el mentol modula la probabilidad de apertura y la conductancia iónica y desplaza la sensibilidad al voltaje hacia voltajes fisiológicos, y desplaza la temperatura umbral para la apertura hacia temperaturas más elevadas **(3, 8, 9)**.

Se han descrito varios activadores de TRPM8 a parte del mentol, como la icilina, el eucaliptol y los derivados del mentol entre otros. Por otro lado, se han identificado varios bloqueadores o antagonistas del canal. Algunos de estos bloqueadores son el BCTC, la capsacepina, los fitocannabinoides y los ácidos grasos poliinsaturados entre otros. La acidez del medio extracelular también parece inhibir la función del canal **(8)**.

La apertura y cierre del canal se ha explicado mediante un modelo cinético de ocho estados, en el que el canal experimenta cambios conformacionales mediados por los estímulos citados anteriormente, permitiendo el paso de iones a su través. **(8)**. Las investigaciones acerca del mecanismo de apertura mediada por voltaje sugieren que la apertura por voltaje y por temperatura están estrechamente relacionadas **(23, 24)**. No obstante, existen evidencias de que los mecanismos de compuerta dependientes de temperatura, compuestos químicos o voltaje son procesos independientes, para los que se han identificado distintos dominios responsables de cada uno de estos procesos, sugiriendo que cada uno actúa alostéricamente para la apertura de TRPM8 **(8, 11)**.

Por otro lado, estos canales no presentan solamente dos estados discretos (abierto/cerrado) sino que también presentan el estado inactivado o desensibilizado, que se da tras la exposición a agonistas durante largos periodos o estímulos continuos, que llevan a un cierre del poro y por tanto a la incapacidad de transportar iones. En el caso de los canales TRP, el evento que inicia esta desensibilización parece ser la entrada de calcio **(12)**. Este hecho nos lleva a pensar que tanto agonistas como antagonistas se pueden emplear para las mismas indicaciones terapéuticas. **(1)**

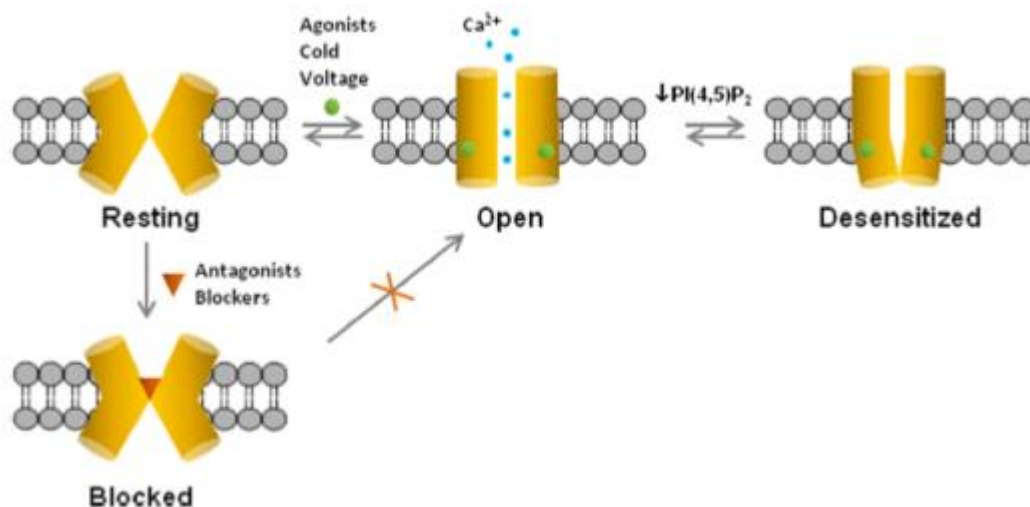


Figura 4. Esquema simplificado de los canales TRPM8 en los diferentes estados (reposo, abierto, desensibilizado y bloqueado) (1).

1.2.2. Regulación de TRPM8

Tradicionalmente, se ha abordado la modulación de canales iónicos, incluido TRPM8 considerando que son proteínas aisladas insertadas en la membrana celular, de hecho, se ha observado que TRPM8 mantiene la sensibilidad a frío y mentol incluso cuando se aísla del ambiente celular, por ejemplo, incluyéndolo en bicapas lipídicas (13). Este hecho indica que el frío y los activadores químicos actúan directamente sobre el canal, no obstante, cada vez es más evidente que los canales iónicos son miembros de redes proteicas que influyen su actividad. Además, se ha observado que la actividad de los canales está altamente regulada por su entorno celular, actuando en este proceso diversas moléculas como lípidos, proteínas o metabolitos (1, 13).

El mecanismo más estudiado de regulación de TRPM8 es el mediado por fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), que regula tanto la activación como la desensibilización del canal. El fosfatidilinositol 4,5-biofosfato es un componente lipídico minoritario de la membrana plasmática. Se ha demostrado que PI(4,5)P₂ activa los canales TRPM8 mediante interacciones con el dominio TRP. La hidrólisis de este compuesto por las fosfolipasas tipo C (PLC) anulan la función del canal, mientras que la síntesis del compuesto original reestablece su función. (13).

A su vez, el mentol y las temperaturas bajas aumentan la afinidad aparente de TRPM8 por PI(4,5)P₂, desplazando la curva dosis respuesta a la derecha en ambos casos. La dependencia a voltaje de TRPM8 se modula de una forma similar por frío, mentol y PI(4,5)P₂, lo que sugiere que los diferentes factores regulan la actividad del canal de una manera compleja, variando la sensibilidad al resto de factores. Para describir completamente este comportamiento es necesario un modelo alostérico que tenga en cuenta las interacciones entre estos factores. **(13)**.

Al igual que en la mayoría de modalidades sensoriales, para TRPM8 también se observa adaptación y desensibilización, es decir, descenso de la actividad a pesar de la presencia continua de estímulos. En concreto, se ha observado descenso de actividad después de la activación por mentol o bajas temperaturas en presencia de Ca⁺² extracelular. Se propone que el flujo de Ca⁺² activa a las isoformas de PLC sensibles a este ion, que hidroliza a PI(4,5)P₂ y esta reducción de lípidos limita la actividad del canal. La coexpresión de la fosfatidilinositol-4-fosfato kinasa de tipo I, que cataliza la formación de PI(4,5)P₂, atenuó significativamente la desensibilización **(14)**.

La actividad de TRPM8 se modula a su vez por la localización del canal en los microdominios de la membrana, pero se necesitan más estudios para determinar este proceso ya que los resultados obtenidos hasta el momento no permiten obtener una conclusión clara **(1)**.

Finalmente, los metabolitos del ácido linoleico actúan como antagonistas no selectivos de TRPM8, que también modulan TRPV1 y TRPA1. **(1)**.

Además de la regulación endógena mediada por lípidos, existen evidencias que indican que la función de TRPM8 puede estar regulada por isoformas cortas provenientes de la regulación post-transcripcional del transcrito de la proteína. Estas isoformas más cortas del canal interaccionan con el C terminal de los TRPM8 completos ejerciendo un efecto inhibitorio del canal. Se cree que esta inhibición puede ser causada por la maquinaria regulatoria sensible a temperatura **(1, 15)**.

1.2.3. Implicación en condiciones patológicas

Existen evidencias de la implicación de este canal en diversas patologías, como la migraña o el cáncer, en procesos inflamatorios o en sensación de dolor entre otros.

La implicación de TRPM8 en migraña es un aspecto del campo del dolor que sigue sin estar claro. La migraña es un desorden neurobiológico muy común que causa dolor de cabeza asociado con náuseas, vómitos, y síntomas de foto y fonofobia, y la causa de todo esto es la excitabilidad aumentada del sistema nervioso central. Se considera una de las enfermedades más incapacitantes a nivel mundial **(16)**. Evidencias indirectas, como la expresión y función de los canales TRP en las fibras aferentes del córtex y trigémino, sugieren un mecanismo para el inicio de la migraña por activación, entre otros, de los canales TRP de los nociceptores meníngeos después de una inflamación local. Se ha identificado una variante genética de TRPM8 (2q37.1, rs10166942) que se asocia con un aumento de la susceptibilidad a la migraña común, y se cree que también puede tener implicación en otros procesos dolorosos como la alodinia cutánea, presente en la mayoría de pacientes con migraña. **(1)**.

La sobreexpresión de TRPM8 se ha relacionado con un gran número de cánceres, como el melanoma, el adenocarcinoma de mama, el cáncer colorrectal, cáncer de pulmones, el cáncer de vejiga, o el de próstata. Además, hay evidencias de su implicación en diferentes estadios del desarrollo, proliferación, migración e invasión tumoral **(1)**. Por ello, se ha propuesto esta proteína como marcador pronóstico o diagnóstico tumoral **(17)**. Se ha observado empleando modelos de cáncer de próstata que la inhibición de TRPM8 empleando bloqueadores específicos del canal, como el AMTB, puede reducir la fracción proliferativa de las células tumorales testadas, mientras que eso no ocurre en las células no-tumorales **(18)**.

Los estados de dolor crónico tanto de origen inflamatorio como neuropático dan lugar a estados de hipersensibilidad central, desarrollada como consecuencia de cambios neuroquímicos resultantes del incremento de la excitabilidad de los nociceptores. Este incremento se da como resultado de cambios en la expresión de canales iónicos, receptores, y sustancias implicadas en los procesos de transducción **(19)**. Estos cambios se pueden manifestar como respuestas exageradas a estímulos dañinos (hiperalgesia) y la percepción de estímulos inocuos como nocivos (alodinia). Se ha observado la implicación de los canales TRP en este proceso, por lo que su modulación se puede considerar como un enfoque destacado para el tratamiento del dolor crónico **(1)**. Concretamente se ha observado sobreexpresión del canal TRPM8 en varios modelos de dolor neuropático, y en modelos animales parecen confirmar la implicación de dicho canal en estos procesos de dolor .

En relación con la implicación de TRPM8 en dolor, se ha observado relación funcional del canal con el dolor inducido por oxaliplatino y por daño neuropático, situación en la que el canal se encuentra sobreexpresado y se da un aumento en la sensibilidad a mentol e icilina. Este hecho se da en los pacientes a los que se les aplican tratamientos de quimioterapia que contienen oxaliplatino, que frecuentemente desarrollan hiperalgesia al frío hasta el punto de que en algunos casos se hace necesaria la interrupción del tratamiento. Estas evidencias preclínicas que proponen TRPM8 como diana analgésica se han traducido en un beneficio para los pacientes con cáncer asociado a daños neuropáticos, particularmente en pacientes terminales, ya que recientemente se han observado los beneficios de la aplicación de mentol tópicamente para el tratamiento de neuropatías inducidas por quimioterapia y el síndrome de dolor post mastectomía. El primer resultado clínico mostró que el 82% de los pacientes evaluables presentaron una mejoría en lo que al dolor respecta después de 4-6 semanas de tratamiento. Esto supone la posibilidad de alargar el tiempo de tratamiento de estos pacientes (1).

In vivo, los ratones knockout para TRPM8 presentan deficiencias para detectar temperaturas de frío inocuo, y muestran un fenotipo parcialmente deficiente en la respuesta a sensaciones de frío agudo inocuo e hipersensibilidad a frío provocada por una lesión. No obstante, el daño inducido por bajas temperaturas se mantiene intacto en estos animales (1).

La activación de TRPM8 mediante agonistas como el mentol o la icilina producen un descenso de las respuestas nociceptivas en varios modelos animales, y además, se produce un potente efecto anti-inflamatorio en dos modelos de colitis inducida químicamente, efecto que no se observa en los ratones nulos para TRPM8 (1).

Por otro lado, los antagonistas de TRPM8 también pueden aliviar algunos estados dolorosos. Por ejemplo, en casos de dolor crónico no es conveniente aplicar agonistas del canal ya que pueden agravar la hipersensibilidad al frío de modo que el desarrollo de drogas antagonistas del canal, pueden suponer un beneficio para los pacientes bloqueando esos síntomas. Se ha visto que la administración del agonista mentol indujo respuestas dolorosas en ratones modelo de colitis, que se redujeron con un pretratamiento con un bloqueador específico del canal TRPM8. Por otro lado, Winchester et al. han demostrado que el uso de antagonistas selectivos de TRPM8 induce analgesia en modelos experimentales de dolor por frío en humanos, con una eficacia equivalente al opioide semisintético oxicodona, sin producir cambios en la temperatura corporal (8, 19).

Recientemente, diferentes estudios mostraron que la ablación de TRPM8 en ratones adultos provocan mayores déficits en el comportamiento respecto al frío comparado con los animales knockout para TRPM8. Estos resultados sugieren la presencia de mecanismos de transducción independientes de TRPM8 en las neuronas, provocando así sensibilidad al frío en ausencia de estos canales. Además de los modelos de respuestas agudas, se atenuó el dolor asociado con la inflamación y a lesiones nerviosas significativamente en los ratones knockout para TRPM8 o con el mismo canal bloqueado. Todos estos datos confirman los resultados obtenidos en estudios anteriores acerca de la implicación de TRPM8 en analgesia, y además muestran por primera vez ausencia de analgesia en ratones knockout para TRPM8 y demuestran que este alivio del dolor requiere la señalización de TRPM8 a través las fibras nerviosas aferentes. Otro dato importante es que los ratones deficientes para TRPM8 conservan sensibilidad normal a daño por calor y estímulos mecánicos, lo que demuestra la especificidad de los fenotipos observados para la sensación de frío y la separación funcional de estas modalidades nociceptivas. (1).

También se observa un aumento de expresión del canal en las neuronas de la vejiga en pacientes con sobreactividad idiopática del detrusor. Estos pacientes muestran a su vez contracciones involuntarias de vejiga constantes y reducción del umbral de volumen en respuesta a la aplicación de agua fría en la vejiga, un efecto ausente en adultos (1, 20).

Todas las evidencias citadas que relacionan el canal TRPM8 con procesos de inflamación, de sensación de dolor o con diversas patologías, tanto en modelos animales como en humanos, nos llevan a pensar que la modulación de estos canales tanto por antagonistas como por agonistas puede conducir al desarrollo de sustancias capaces de aliviar los síntomas asociados al dolor.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es realizar una búsqueda de moduladores del canal TRPM8, como punto de partida para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de las patologías asociadas a este canal.

Para ello, nos fijamos los siguientes objetivos específicos:

- Descubrir nuevos moduladores de la actividad de TRPM8 mediante técnicas de cribado de alto rendimiento.
- Caracterizar las propiedades farmacológicas de los compuestos seleccionados realizando ensayos de dosis-respuesta y toxicidad.
- Establecer el sitio de unión más probable de los compuestos seleccionados con el canal TRPM8 identificando los residuos implicados mediante estudios de docking in-silico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

El modelo experimental empleado para los ensayos de cribado y actividad fue la línea celular HEK- CR1. Se trata de células embrionarias de riñón humano transfectadas con un plásmido conteniendo la secuencia de TRPM de rata para que expresen de forma estable el canal TRPM8. Estas células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de Geneticina, y 1% de solución de Penicilina/Streptomycin (P/S).

Para los ensayos de toxicidad se emplearon células HEK. Se trata de células embrionarias de riñón humano y se cultivan en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de solución de Penicilina/Streptomycin (P/S).

El mantenimiento celular de ambas cepas se llevó a cabo en flask de 25 mL, dándoles pase una vez a la semana cuando alcanzaban confluencia del 100%. Se mantuvieron en un incubador con la humedad controlada (5% CO₂) a una temperatura constante de 37°C.

3.2. Librería de compuestos

Los compuestos empleados en el estudio pertenecen a una librería combinatoria de síntesis química desarrollada a partir de un esqueleto β-lactámico. Se mantuvo una estructura común que comprende el anillo heterocíclico característico de las β-lactamas, la cadena N-alquilo, y los dos grupos éster y amina como estructura general de la molécula base, y se sustituyeron los radicales por diferentes grupos químicos (**Figura 7 y 8**). Esta librería comprende un total de 30 compuestos.

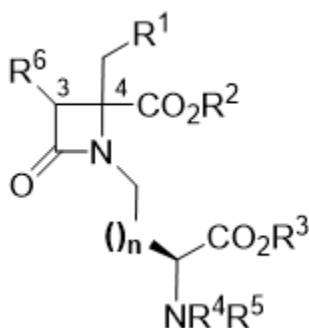


Figura 5. Estructura común de la quimioteca ensayada. R_n representa los distintos sustituyentes, que varían en función del compuesto de la librería

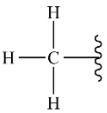

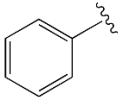
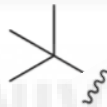
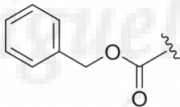
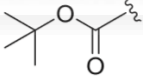
Sustituyente	Estructura
Me	
Bn	
Ph	
tBu	
Z	
Boc	

Figura 6. Tabla en la que se muestran las estructuras de los distintos radicales empleados como sustituyentes.

3.3. Cribado de alto rendimiento y medidas de actividad mediante técnicas fluorimétricas

Las técnicas de cribado de alto rendimiento y de caracterización de potencia empleadas en este trabajo se basan en la detección de fluorescencia de las células tras incubarlo con una sonda sensible a calcio. Cuando el canal se abre, permite la entrada de calcio al interior celular, con lo que se da un aumento la concentración intracelular de este ión, que al unirse a la sonda produce un aumento en la emisión de fluorescencia, que se detecta mediante el lector de fluorescencia (POLARstar Omega).

Los compuestos a cribar se aplicaron a concentraciones de 50 y 5 μM para realizar la primera selección, posteriormente, se utilizaron distintas concentraciones, desde el rango de 0.01 nM hasta 100 μM , de los compuestos seleccionados para el cálculo de la concentración necesaria para producir un 50 % de bloqueo (IC50).

Para ambos tipos de ensayo se cultivaron las células CR1 en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo y se dejaron incubando 48 horas a 37°C con atmósfera controlada (5% CO₂).

Para la lectura de la placa, se eliminó el medio celular y se añadieron 100 μL de sonda Fluo-4 a cada pocillo, dejándose incubar 30 minutos a 37°C y posteriormente 40 minutos a 30°C. Transcurrido ese tiempo, se introdujo la placa al lector de fluorescencia programado con un protocolo de 20 ciclos, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. En los primeros 3 ciclos se midió la emisión de fluorescencia basal, y cuando éstos finalizaron, se añadieron los compuestos a ensayar disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO), y como control negativo, AMTB a una concentración de 10 μM . En el ciclo 10, se inyecta de forma automática el control positivo (mentol 100 μM) en todos los pocillos.

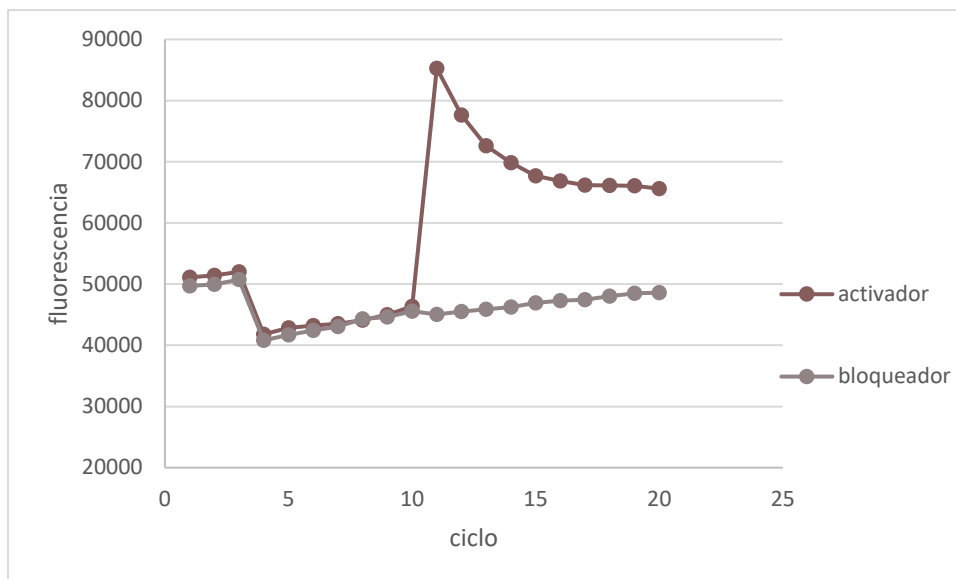


Figura 7. Ejemplo de un activador y un bloqueador del canal TRPM8. Observamos que en el ciclo 10 al añadirse el activador, en este caso mentol 100 μ M, se produce una entrada de calcio a la célula como consecuencia de la apertura del canal, que en la gráfica se traduce en un aumento de la fluorescencia, mientras que en el caso del bloqueador, la fluorescencia se mantiene constante a pesar de la aplicación del agonista del canal.

El parámetro empleado para la validación del ensayo fue el factor Z, que es un parámetro estadístico que tiene en cuenta la ventana de señal en el ensayo y la variación en los datos. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor Z} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Donde μ es la media y σ la desviación estándar de los controles positivos (p) y negativos (n).

El valor máximo de z es de 1. Se consideran válidos los valores de z entre 0.5 y 1

El porcentaje de bloqueo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Bloqueo} = \left(1 - \frac{Fca - Fcb}{Fa - Fb} \right) * 100$$

Donde Fca es la fluorescencia tras la adición de mentol en presencia de compuesto, Fcb es la fluorescencia antes de la adición del mentol en presencia de compuesto, Fa es la fluorescencia tras la adición de mentol en ausencia de compuesto, y Fb es la fluorescencia antes de la adición de mentol en ausencia de compuesto.

El cálculo de la potencia se realizó mediante un ajuste a la ecuación de Hill:

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

Donde Bmax es el máximo bloqueo y Bmin el mínimo bloqueo.

Para aquellos compuestos cuyos resultados de potencia se ajustaron a una bifásica, se calculó cada uno de sus valores de IC50 por separado empleando la ecuación indicada anteriormente.

3.4. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para evaluar la toxicidad de los compuestos se llevaron a cabo experimentos basados en la detección de la actividad mitocondrial de las células vivas mediante un análisis colorimétrico conocido como MTT. En este ensayo las enzimas oxidorreductasas dependientes de NADPH, reflejan bajo condiciones definidas el número de células viables presentes, ya que estas enzimas son capaces de reducir el colorante de tetrazolio a su forma insoluble tetrazan, que presenta color violeta. Por consiguiente, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que se cuantifica midiendo la absorbancia en un espectrofotometro.

Se sembraron células HEK en placas de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células/pocillo y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. 24 horas después de la siembra se añadieron los compuestos a diferentes concentraciones (desde 0.1 hasta 500 µM) disueltos en DMSO y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Tras este tiempo se añadieron 5 µL de solución de MTT con una concentración de 5 mg/ml en solución tampón PBS y se dejó incubar 4 horas, durante las cuales se forman los cristales de formazán. Transcurrido este tiempo se eliminó el medio en el que estaban y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 minutos, lo que permite la disolución de los cristales. Finalmente se midió la densidad óptica a 560 nm y a 630 nm.

El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% Viabilidad = \left(\frac{DO \text{ cels tratadas}}{DO \text{ cels control}} \right) * 100$$

Los controles consistieron en 1 µL de DMSO en el caso del control positivo, ya que éste es el vehículo en el que van disueltos los compuestos, y 1 µL de detergente RIPA como control negativo (para observar el máximo nivel de muerte celular).

3.5. Ensayos in-silico

Para estudiar las relaciones estructura-actividad de los compuestos y los residuos implicados en la unión proteína-ligando, se efectuaron experimentos in silico, que mediante métodos estocásticos nos proporcionan una predicción de las posibles orientaciones del ligando al formar el complejo con la proteína y la energía de unión asociada a cada una, basándose en las interacciones establecidas entre ambas moléculas. De este modo, se puede predecir la orientación más probable de las dos moléculas tras su unión para formar el complejo.

Las simulaciones de unión proteína-ligando y el análisis de interacciones se llevó a cabo mediante Autodock implementado en Yasara, software que emplea el cálculo de las energías de interacción entre el ligando y la proteína para adaptar la configuración del acoplamiento. Estas simulaciones se realizaron a través del servidor proteo.ibmc.umh.es, ejecutando el script dock_run.mcr programado para ejecutar el docking mediante el método autodockLGA, 300 runs y el ligando flexible.

Estudios previos en el laboratorio (27), han definido los residuos implicados en la unión de un compuesto con la estructura común a los de la quimioteca testada al canal TRPM8 (F700, I701, L704, A747, L750, L751, Y754, T803, L1009) con lo que en este estudio se han dirigido los ligandos a este sitio de unión, realizándose así docking del tipo local.

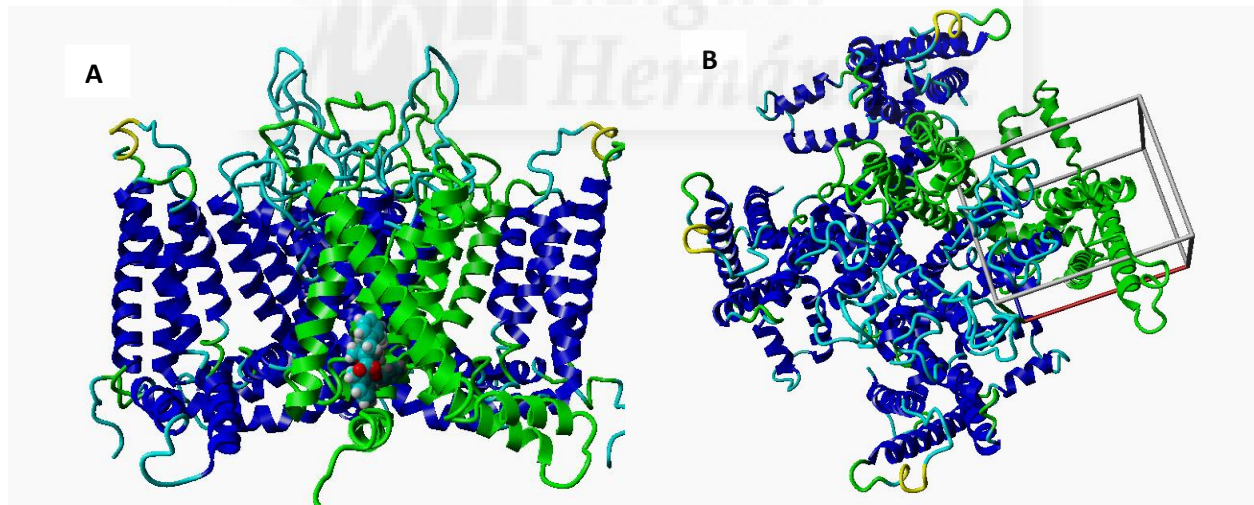


Figura 8. A) Vista Lateral del complejo proteína-ligando obtenido previamente en el laboratorio (21). B) Vista superior de la escena que contiene el canal y la caja a la que se dirigirán los ligandos. Para una mejor visualización, se ha destacado en verde la cadena con una mayor implicación en la unión.

Tras estos ensayos se obtiene un fichero que contiene la energía de unión asociada a cada run, que es cada conformación propuesta el programa. También nos proporciona un número de clusters, con la media de las energías de unión que lo conforman y la desviación estándar. Un cluster es una agrupación de las soluciones con alto grado de similitud, de modo que se puede considerar que el ligando se ha unido al mismo sitio, pero presenta pequeñas diferencias, como puede ser la rotación de un enlace.

4. RESULTADOS

4.1. Cribado de derivados de β -lactamas

Con el fin de identificar nuevas moléculas con cierta actividad de bloqueo del canal TRPM8, se emplearon técnicas de cribado de alto rendimiento aplicando la metodología descrita en el apartado 3.3. En nuestro caso, se evaluó el efecto bloqueante de una librería combinatoria de síntesis química sobre el canal TRPM8 a las concentraciones de 50 y 5 μ M para seleccionar aquellos compuestos que presentasen mejores resultados en cuanto a eficacia.

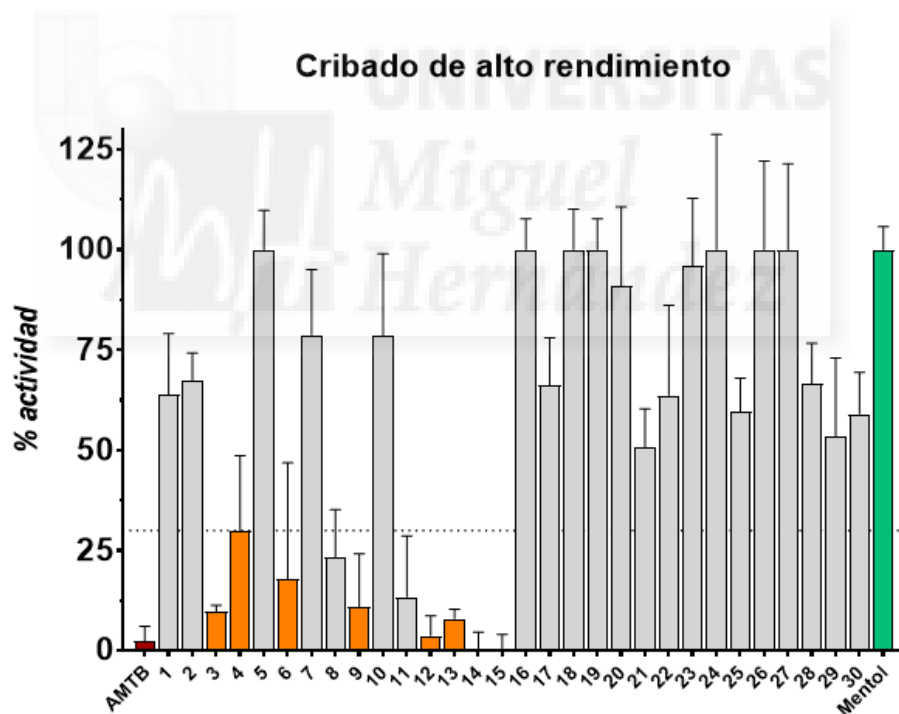


Figura 9. Resultado del cribado de la quimioteca. Se representa el porcentaje de actividad del canal para los diferentes compuestos aplicados a concentraciones de 50 μ M, normalizados con respecto al 100% de actividad (mentol a 100 μ M). Se representan en color naranja los bloqueadores seleccionados para los ensayos de potencia y toxicidad (3, 4, 6, 9, 12, 13, 14), en gris los compuestos no seleccionados, en rojo el control de bloqueo AMTB, y en verde el control de activación mentol. Se muestra una línea de puntos en el 30% de actividad, porcentaje tomado como referencia para aceptar o descartar compuestos por su actividad.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron por su eficacia de bloqueo los compuestos representados en color naranja (3, 4, 6, 9, 12, 13 y 14) para realizar los ensayos de dosis-respuesta, toxicidad y docking, ya que se observan niveles de activación del canal inferiores al 30% respecto al mentol, considerándose así bloqueadores del canal.

El resto de compuestos se descartaron debido a los bajos valores de actividad bloqueante del canal observados o a diferentes factores como la baja disponibilidad de los mismos o su dificultad de síntesis.

4.2. Ensayos de dosis-respuesta

Se caracterizó la potencia de los compuestos seleccionados tras el cribado inicial mediante el cálculo de la IC₅₀, que es la concentración de compuesto necesaria para conseguir un 50% de bloqueo. Esto se obtuvo midiendo la actividad del canal para varias concentraciones del mismo compuesto.

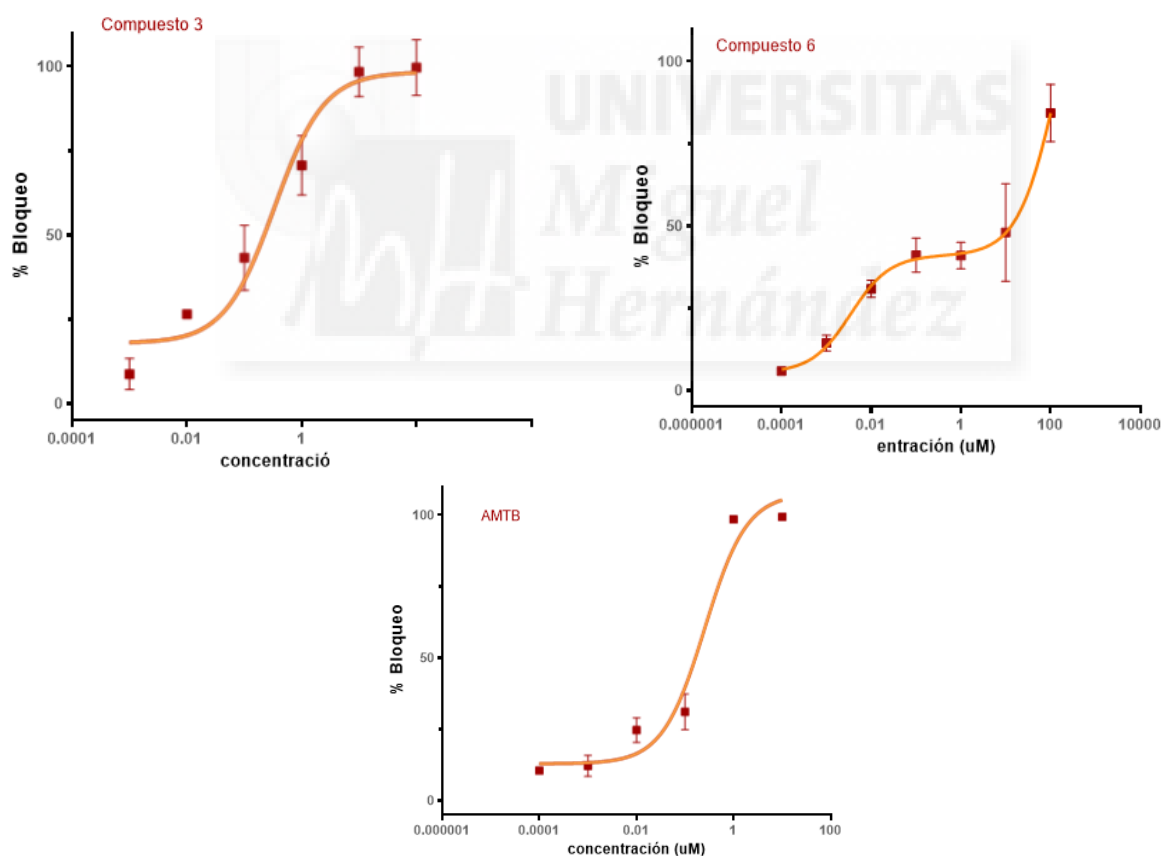
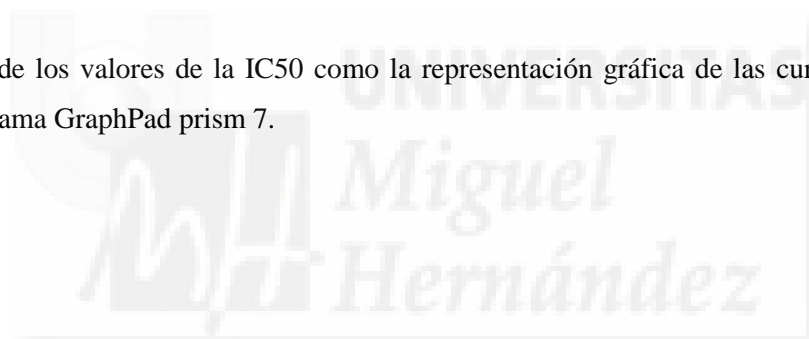


Figura 10. Representación de los dos tipos de curvas obtenidas tras los ensayos de actividad y del control AMTB.

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos de las IC50 (media \pm SD) para los compuestos seleccionados tras el cribado inicial y para el control AMTB:

<i>Compuesto</i>	<i>Valor IC50 obtenido</i>	
<i>AMTB</i>	0.2524 \pm 1.74 μ M	
<i>3</i>	0.33 \pm 1.78 μ M	
<i>4</i>	7.10 \pm 0.30 μ M	
<i>6</i>	0.004 \pm 1.39 μ M	49.15 \pm 3.93 μ M
<i>9</i>	17.80 \pm 1.79 nM	15.27 \pm 1.68 μ M
<i>12</i>	0.19 \pm 1.56 μ M	22.58 \pm 1.49 μ M
<i>13</i>	0.06 \pm 1.12 μ M	1.02 \pm 1.11 μ M
<i>14</i>	0.37 \pm 1.12 nM	0.87 \pm 1.37 μ M

Tanto el cálculo de los valores de la IC50 como la representación gráfica de las curvas se ha realizado mediante el programa GraphPad prism 7.



4.3. Ensayos de viabilidad celular (MTT)

Se realizaron ensayos de viabilidad celular con el objetivo de determinar la toxicidad de los compuestos estudiados. Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4. Cada compuesto se estudió para 4 concentraciones diferentes, escogidas en base a los datos obtenidos en el ensayo de dosis-respuesta. Los resultados se han normalizado en base a DMSO, vehículo en el que van disueltos los compuestos, y como control negativo se ha aplicado RIP-A, un conocido desestabilizador de la membrana celular.

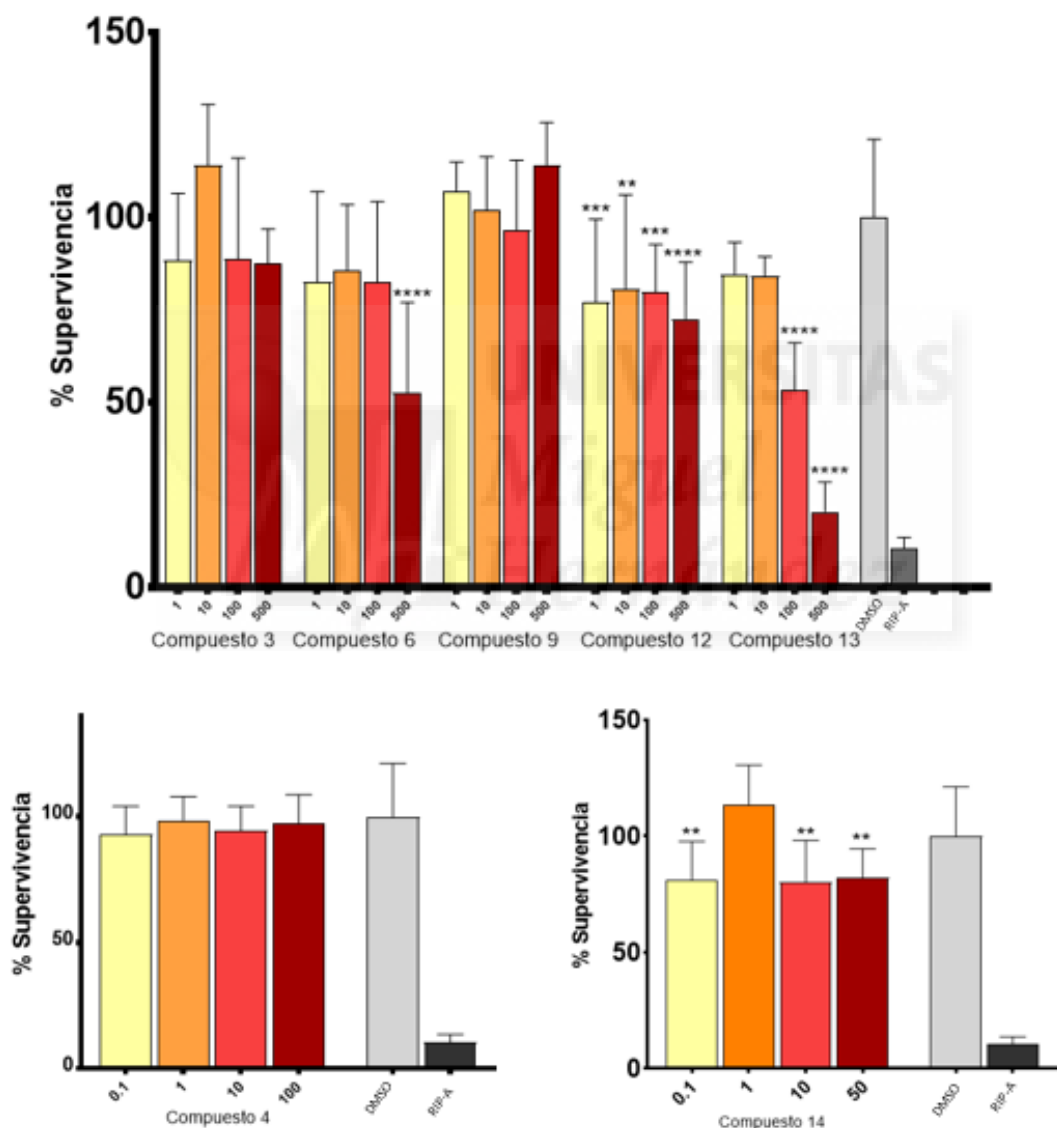


Figura 11. Resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad para los diferentes compuestos.. A) Resultados de los compuestos 3, 6, 9, 12 y 13 testados a las concentraciones de 1, 10, 100 y 500 µM. B) Resultados del compuesto 4 testado a las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 µM. C) Resultados del compuesto 14 testado a las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 50 µM.

El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el programa Graphpad prism. Se empleó el análisis de la T de student (t-test), comparando el valor de DMSO con los valores de cada compuesto, y se han representado con asteriscos las diferencias significativas, basándonos en el P-valor, con las siguientes pautas: P-valor<0.1 **, P-valor<0.01 ***, P-valor<0.001****

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad, se descartan como potenciales moléculas con actividad farmacológica los compuestos 12 y 14 al observarse diferencias significativas en la viabilidad celular a bajas concentraciones con respecto al DMSO. Respecto a los compuestos 6 y 13, se observan diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto al DMSO a concentraciones 1 orden de magnitud superior a la IC50, con lo que no es necesario descartarlos, no obstante, los compuestos 3, 4 y 9 presentan mejores características en relación a la toxicidad, ya que no muestran diferencias significativas a ninguna de las concentraciones testadas.



4.4. Análisis de relación estructura-actividad

Se llevaron a cabo estudios in-silico para establecer una relación entre la estructura y la actividad de los compuestos que presentaron mejores propiedades (3, 4, 6, 9, 12, 13, 14), y con dos compuestos con baja y nula actividad antagonista del canal (1 y 24), con el fin de identificar los diferentes radicales e interacciones con el receptor que favorezcan la actividad del compuesto. Se ha tenido en cuenta el valor de la IC50 del sitio de unión de alta afinidad de cada compuesto y la energía de unión obtenida en los ensayos de docking para el cluster seleccionado.

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Carbonos cadena N- alquílica	IC50	Energía de unión (kcal/mol) (media ± SD)
3	Ph	Bn	Bn	H	Boc	H	2	0.33 ± 1.78 μM	13.31 ± 1.16
4	Ph	NHBn	NHBn	H	Boc	H	2	7.10 ± 0.30 μM	15.70 ± 0.94
6	Ph	Me	Me	H	Z	H	2	3.90 ± 1.39 nM	14.30 ± 0.55
9	Ph	tBu	Me	Me	Z	H	2	17.80 ± 1.79 nM	14.30 ± 0.76
12	Ph	NHBn	NHBn	H	Boc	Me (S)	2	0.19 ± 1.56 μM	16.28 ± 0.97
13	Ph	NHBn	NHBn	H	Boc	Me (R)	2	0.06 ± 1.12 μM	16.31 ± 0.96
14	Ph	Bn	Bn	H	Boc	Me	2	0.36 ± 1.12 nM	15.09 ± 1.19
1	Ph	Me	Me	H	Boc	H	2	-	6.24 ± 0.63
29	Ph	Bn	Bn	H	Boc	H	3	-	07.53 ± 0.38

4.5. Docking

Se llevaron a cabo experimentos de docking in-sílico, con el objetivo de observar las interacciones de cada compuesto con el receptor. Se ha acotado el sitio de unión obtenido previamente en otros estudios realizados en el laboratorio, de modo que se hizo docking local y se seleccionó para cada caso el cluster de mayor energía y cuyas interacciones se ajustasen más a las encontradas en el docking tomado como referencia.

En la tabla se muestran las energías de unión (media \pm SD) del cluster escogido para cada compuesto con buenos resultados en actividad, toxicidad, y potencia (3, 4, 9, 13), como de las moléculas que presentaron valores bajos de actividad (1, 29) así como las interacciones que establecen con el receptor. Se han sombreado los datos obtenidos para los compuestos con buena actividad bloqueadora con el objetivo de facilitar la visualización de la tabla. Se indican los residuos que establecen puentes de hidrógeno con (H).



Compuesto	3	4	6	9	13	1	29
Energía de unión (kcal/mol)	13.32 ± 1.16	15.70 ± 0.94	14.30 ± 0.55	14.30 ± 0.76	16.31 ± 0.96	6.24 ± 0.63	7.53 ± 0.38
Aminoácidos implicados en la interacción	LEU 697						LEU 697
	PHE 700						PHE 700
	ILE 701			ILE 701	ILE 701	ILE 701	ILE 701
		LEU 704	LEU 704	LEU 704			
		VAL 705	VAL 705		VAL 705 (H)		
		PHE 744		PHE 744	PHE 744		
		ALA 747		ALA 747	ALA 747		
	LEU 750					LEU 750	LEU 750
	LEU 751		LEU 751		LEU 751	LEU 751	LEU 751
	TYR 754						TYR 754
		LEU 806	LEU 806	LEU 806			LEU 806
		ILE 837 (H)	ILE 837	ILE 837	ILE 837 (H)		ILE 837
		THR 840	THR 840	THR 840	THR 840	THR 840	THR 840
		LEU 841	LEU 841	LEU 841	LEU 841		
		LEU 843		LEU 843	LEU 843	LEU 843	
				ILE 844	ILE 844	ILE 844	ILE 844
	GLU 1004						GLU 1004

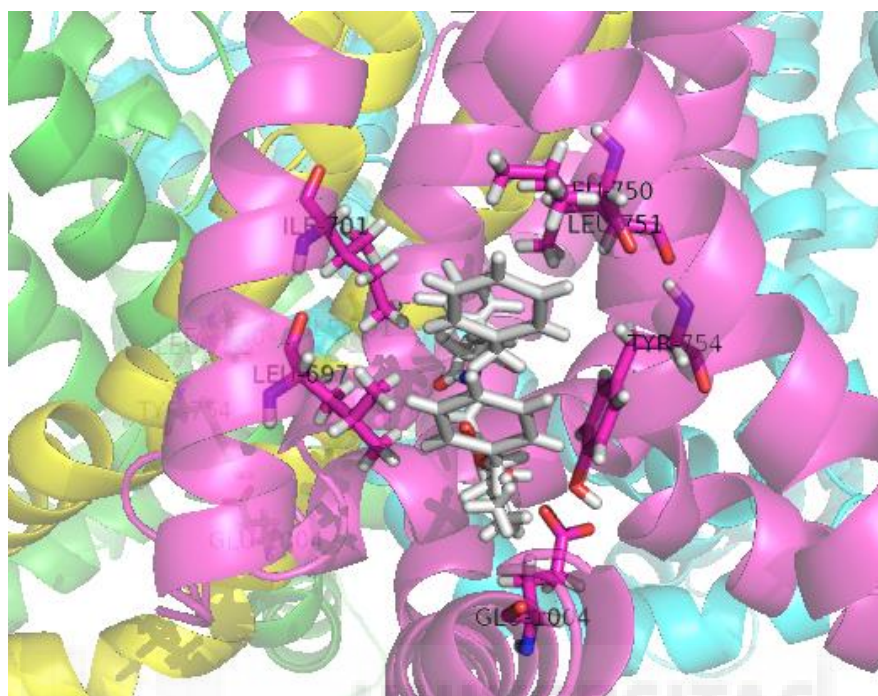


Figura 12. Representación del resultado de docking para el compuesto 3 mostrando las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión.

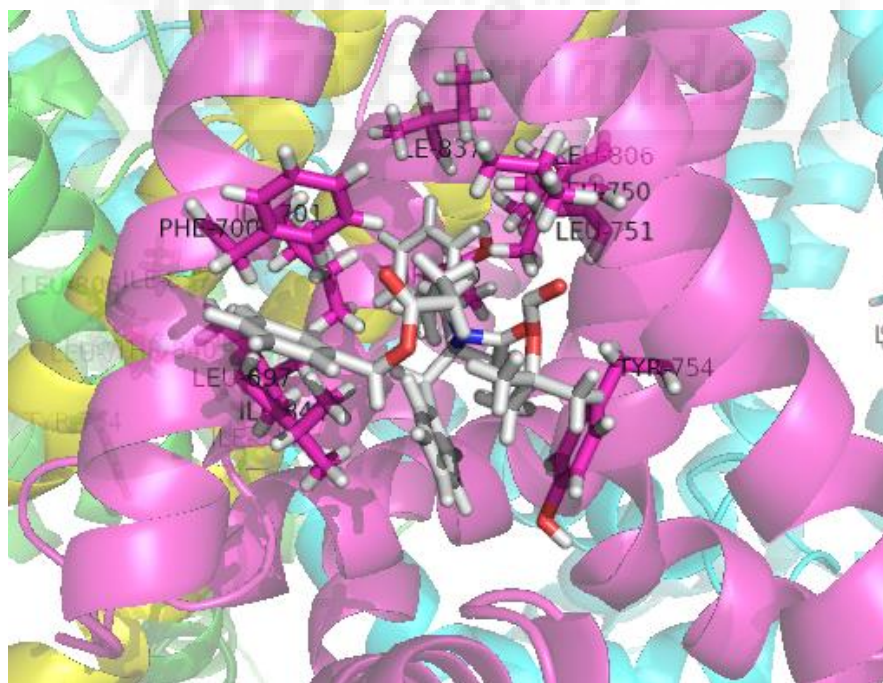


Figura 13. Representación del resultado de docking para el compuesto 29 mostrando las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión.

5. DISCUSIÓN

Para realizar este estudio, se han llevado a cabo dos tipos de ensayos, experimentos fluorimétricos basados en sistemas celulares y experimentos in-silico, cuyos resultados se han analizado y comparado con el objetivo de contrastar los datos obtenidos mediante ambas técnicas, ya que cada una de ellas presenta diferentes ventajas y limitaciones.

En primer lugar, los sistemas celulares se consideran una buena aproximación a escala de laboratorio ya que permiten simular las interacciones que se producen entre el metabolismo celular y los compuestos a testar, y suponen una alternativa a la experimentación animal, sobretodo en estudios como el que hemos realizado, en los que se parte de un conjunto de compuestos y se seleccionan progresivamente en base a los resultados obtenidos en cada experimento. No obstante, estos sistemas presentan características a tener en cuenta, como el tiempo de respuesta celular o las posibles interferencias de los compuestos, pudiendo suponer una fuente de hits inespecíficos.

Respecto a los ensayos fluorimétricos, destacan diversas ventajas, como la capacidad que presentan para cribar gran cantidad de compuestos con alta reproducibilidad o la facilidad de uso que suponen los protocolos automatizados. No obstante, presentan una baja resolución de la cinética de los eventos moleculares, y la frecuencia de resultados falsos positivos es alta, por lo que se hace necesario contrastar los resultados obtenidos con ensayos alternativos más específicos y con mayor capacidad para confirmar los resultados positivos. Por todo ello, estos ensayos se consideran un buen punto de partida para el cribado de compuestos, concretamente para descartar compuestos con baja actividad.

En cuanto a los ensayos in-silico, concretamente de docking, nos permiten simplificar el sistema de estudio. De este modo, nos permite descartar algunos compuestos sin la necesidad de realizar ensayos in-vivo o in vitro, mediante el análisis de posibles conformaciones, interacciones y energías asociadas. También nos permite contrastar los datos obtenidos del cribado inicial, aportando una mayor confianza al estudio general. No obstante, hay que tener en cuenta que el método empleado en este estudio es heurístico, es decir, podemos realizar un mismo ensayo con los mismos parámetros y obtener diferentes resultados en cada uno de ellos.

Al contrastar los datos de actividad obtenidos mediante el cribado, y de energía de unión por medio de ensayos in-silico, observamos que los compuestos con alto porcentaje de bloqueo (actividad del canal inferior al 30%), presentan valores de energía de unión más elevados (alrededor de 15 kcal/mol) que aquellos que muestran bajo porcentaje de bloqueo (actividad del canal superior a 30%), cuya energía de unión obtenida ha sido de alrededor de 8 kcal/mol.

Los resultados de los ensayos de potencia sugieren que puede haber dos sitios de unión para los compuestos 6, 9, 12, 13 y 14. Un sitio de unión de alta afinidad, cuyos valores de IC₅₀ se encuentran en el rango nanomolar y micromolar, y otro sitio de menor afinidad, con valores de IC₅₀ en el rango micromolar. No obstante, se consideran necesarios más experimentos empleando técnicas con una mayor sensibilidad para confirmar los resultados obtenidos.

Respecto a los ensayos de potencia, observamos que, de los seleccionados por toxicidad, el compuesto 9 destaca por mayor potencia que el control de bloqueo AMTB, ya que hemos obtenido el valor de IC₅₀ del rango nanomolar (17.80 ± 1.79 nM) para el sitio de unión de mayor afinidad, frente al valor de 0.25 ± 1.74 μ M obtenido para el AMTB. Los compuestos 3 y 4 presentan un valor de IC₅₀ muy similar al obtenido para el AMTB, siendo del rango de micromolar, con lo que se consideran también buenos bloqueadores, siendo el 3 ligeramente más potente que el 4.

En cuanto a la relación entre la estructura de los compuestos y su función, cabe destacar varios aspectos. En primer lugar, observamos los mismos sustituyentes químicos para el compuesto 3, con buena actividad de bloqueo, que para el compuesto 29, que no presenta esta actividad. La única diferencia entre ambos es la longitud de la cadena N-alquílica, de 2 y 3 carbonos, respectivamente. Esto parece indicar que esta cadena es un factor estructural influyente en la actividad, y que un aumento de ésta conlleva a la pérdida de actividad bloqueante del compuesto. Dado que ambos compuestos presentan los mismos sustituyentes, es de esperar que las interacciones con el canal TRPM8 muy similares, hecho que observamos en la tabla del apartado 4.5., exceptuando contactos con residuos puntuales, hecho que puede deberse a que el ligando, como consecuencia del aumento de la cadena N-alquílica, adopte una posición ligeramente diferente a la del compuesto 3.

Otros elementos estructurales que parecen influir en la actividad bloqueante de los compuestos en relación a la estructura es la presencia de ciertos grupos químicos en las posiciones R2, R3 y R5.

Si nos fijamos en el compuesto 6 y el 1, podemos observar que únicamente difieren en la posición R5, que está constituida por un grupo bencil-ciclocarbonil (Z) y un grupo tert-butiloxicarbonilo (Boc) respectivamente, sugiriendo que la presencia en esta posición de un éster bencílico favorece el efecto antagonista.

También observamos el grupo Z en la posición R5 del compuesto 9, que presenta una mayor actividad de bloqueo que el compuesto 6 y cuya única diferencia con éste reside en la posición R2, siendo un grupo tert-butilo (tBu) para el compuesto 9, y un grupo metilo (Me) para los compuestos 1 y 6, sugiriendo que esta diferencia puede ser responsable del aumento de actividad observado.

Por último, observamos diferencias en los grupos químicos R2 y R3 entre los compuestos 4 y 13, constituido por un grupo NHBn, y el compuesto 29, que presenta un grupo Bn en esta posición. Todo esto parece indicar que la presencia de grupos hidrofóbicos en las posiciones R2, R3 y R5 confieren un aumento en el efecto antagonista.

Respecto a las interacciones establecidas entre los ligandos y el canal, parecen ser aportar una mayor energía de unión las establecidas con los residuos LEU 704, 705, 744, 747, 841, dado que se observan exclusivamente en los compuestos que presentan buenos resultados tanto de actividad de bloqueo, como de energía de unión. No obstante, no se puede descartar que ciertas interacciones que se establezcan también con compuestos que no presentan buenas propiedades contribuyan positivamente al complejo proteína-ligando, dado que los compuestos tratados en este estudio presentan estructuras con alto grado de similitud.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Teniendo en cuenta todo lo citado anteriormente, podemos concluir que, demostrada la importancia de la implicación de TRPM8 en ciertos procesos fisiológicos y patológicos, la búsqueda de moduladores para este canal supone un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos.

- Basándonos en este hecho, hemos identificado 3 compuestos con potenciales propiedades farmacológicas, se trata de los compuestos 9, 3 y 4, indicados de mayor a menor potencia.
- Ninguno de los compuestos escogidos mostró efectos de toxicidad en los ensayos de viabilidad celular, y en los ensayos in-silico de estructura función, se obtuvieron valores elevados de energía de unión con respecto a los obtenidos para compuestos que mostraron un bajo porcentaje de bloqueo.
- En cuanto a la relación entre la estructura de los compuestos y su actividad, se han observado dos factores determinantes. El primero de ellos es la presencia de grupos hidrofóbicos (como esteres bencílicos o grupos tBu) en las posiciones R2, R3 y R5, que favorecen la actividad antagonista de los compuestos. El segundo factor es la longitud de la cadena N-alquílica, siendo más larga en los compuestos de menor actividad antagonista.

Como perspectivas futuras, consideramos necesario comprobar la especificidad y selectividad de los compuestos seleccionados, en sistemas celulares que expresen otros miembros de la familiar TRP, como puede ser TRPV1, y posteriormente en sistemas celulares que expresen canales de otras familias, tales como canales de sodio/potasio.

Adicionalmente, se deberían realizar estudios de cardiotoxicidad, estudiando el efecto de los compuestos en los canales de potasio tipo hERG o Kv11.1, responsables de la repolarización del potencial de acción cardíaco, para descartar los compuestos que puedan interferir con la función cardíaca.

Se deberían realizar ensayos electrofisiológicos con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos, de modo que obtendríamos resultados con una mayor sensibilidad y nos aportaría información acerca de la cinética de apertura y cierre del canal.

Sería interesante realizar a nivel in silico mutaciones en el sitio de unión de mayor afinidad de los compuestos que sugieren la presencia de dos sitios de unión, como por ejemplo el compuesto 9, para confirmar los datos obtenidos mediante los experimentos celulares.

Por último, se podrían llevar a cabo ensayos en modelos animales con las moléculas que presentasen las mejores propiedades farmacológicas. Puesto que se han buscado bloqueadores del canal, se podrían aplicar a estudios con modelos de hiperalgesia o de frío inducido por oxaliplatino, patologías en las que el canal se encuentra sobreexpresado o sobreactivado.



7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) M. Jesús Pérez de Vega, Isabel Gómez-Monterrey, Antonio Ferrer-Montiel, y Rosario González-Muñiz. Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (22)
- (2) Antonio Ferrer Montiel. Los canales de comunicación sensorial TRPs como dianas farmacológicas. **2009**.
- (3) Li M, Yu Y y Yang J. Structural Biology of TRP Channels. *Advances in experimental medicine and biology.* **2011**. 704. 1-23. doi:10.1007/978-94-007-0265-3_1.
- (4) Kalia J, Swartz KJ. Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Scientific Reports.* **2013**. 3. 1523. doi:10.1038/srep01523. (5) David D. McKemy, Werner M. Neuhausser y David Julius. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* **2002**. 416. 52-58. doi:10.1038/nature719
- (6) McKemy D. D., Neuhausser W. M. & Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* **2002**. 416. 52–58. doi: 10.1038/nature719
- (7) Knowlton WM, McKemy DD. TRPM8: From cold to cancer, peppermint to pain. *Curr Pharm Biotechnol.* **2011**. 12. 68–77.
- (8) Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S et al. A trp channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* **2002**. 108. 705–715.
- (9) Malkia A, Morenilla-Palao C, Viana F. The emerging pharmacology of TRPM8 channels: hidden therapeutic potential underneath a cold surface. *Curr Pharm Biotechnol.* **2011**. 12. 54–67. doi: 10.2174/138920111793937916.
- (10) Kwokyin Hui, Yibin Guo, Zhong-Ping Feng. Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels. *Elsevier.* 2005. 333. 374-382. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.123
- (11) Brauchi S, Orio P, Latorre R. Clues to understanding cold sensation: Thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **2004**. 101(43). 15494-15499. doi:10.1073/pnas.0406773101.
- (12) Gordon-Shaag A, Zagotta WN, Gordon SE. Mechanism of Ca(2+)-dependent desensitization in TRP channels. *Channels.* **2008**. 2. 125–129. doi: 10.4161/chan.2.2.6026.

- (13) Yudin Y, Rohacs T. Regulation of TRPM8 channel activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2012**. 353. 68-74. doi:10.1016/j.mce.2011.10.023.
- (14) Rohacs T., Lopes C.M., Michailidis I., Logothetis D.E. Pi(4,5)p2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci*. **2005**. 8. 626–634. doi: 10.1038/nn1451.
- (15) Fernández JA, Skryma R, Bidaux G, et al. Short Isoforms of the Cold Receptor TRPM8 Inhibit Channel Gating by Mimicking Heat Action Rather than Chemical Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. **2012**. 287(5). 2963-2970. doi:10.1074/jbc.M111.272823.
- (16) Stephen D Silberstein. Migraine. *The Lancet*. **2004**. 363(9406). doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15440-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15440-8)
- (17) Liu Z, Wu H, Wei Z, Wang X, Shen P, Wang S, Wang A, Chen W, Lu Y. TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2016**. 142. 1871–1881. doi: 10.1007/s00432-015-2112-1
- (18) Valero ML, Mello de Queiroz F, Stühmer W, Viana F, Pardo LA. TRPM8 Ion Channels Differentially Modulate Proliferation and Cell Cycle Distribution of Normal and Cancer Prostate Cells. *Mongin AA, ed. PLoS ONE*. **2012**. 7. 12. doi:10.1371/journal.pone.0051825.
- (19) Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*. **2007**. 55. 365–376. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.008
- (20) Mukerji G, Yiangou Y, Corcoran SL, et al. Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urology*. **2006**. 6. 6. doi:10.1186/1471-2490-6-6.
- (21) R. De la Torre Martinez. Characterization and evaluation of trpv1 and trpm8 antagonists as potential therapeutic tools for treating pain. **2016**.

