

GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

*Búsqueda de moduladores del canal  
TRPM8 mediante técnicas de cribado  
de alto rendimiento*

Curso académico 2015/2016

Facultad de Ciencias experimentales.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Área de Bioquímica y Biología Molecular



Directora: Asia Fernández Carvajal | Celia Cordero Sánchez.



## Resumen

Los *termorreceptores de potencial transitorio (TRP)* son una superfamilia de canales iónicos compuesta por 7 subfamilias, en base a las diferencias en la homología de su secuencia. Estos canales están relacionados con la sensibilidad a estímulos térmicos, mecánicos o químicos y están implicados en procesos patológicos como el dolor o la inflamación. En concreto, el estudio se centra en un canal perteneciente a la familia de los TRPM (*termorreceptores de potencial transitorio de melastina*), TRPM8. Los actuales avances en el conocimiento de su implicación en condiciones fisiológicas y patológicas, abren un amplio marco de estudio destinado a la búsqueda de nuevos fármacos que modulen la actividad de estas proteínas de membrana. El objetivo de este trabajo es encontrar y determinar las propiedades farmacológicas de diversos compuestos derivados del mentol, agonista químico del canal. Específicamente se determina la potencia, la toxicidad y la capacidad de producir taquifilaxia de los compuestos seleccionados. El compuesto 2 es el que mejores resultados de actividad y toxicidad mostró, con una EC50 de  $18.83 \pm 1.83 \mu\text{M}$  y con capacidad de inducir taquifilaxia.

## Abstract

The *transient thermoreceptor potential channels (TRP)* is a superfamily of ionic channels composed by 7 members according to homology of sequence. These channels are related with sensitivity to different stimuli, as thermic, mechanic or chemicals ones and have been implicated in pathological conditions like pain and inflammation. In this study, we have focused on one of the channels belongs to TRPM member's family (*transient thermoreceptor potential channels of melastine*), TRPM8. Current advances in the knowledge of TRPM8 involvement in physiological and pathological conditions open up a broad framework of study aimed at the search for new drugs that modulate the activity of these membrane proteins. The aim of this investigation is to find and to determine the pharmacological properties of some menthol-like molecules, chemical agonist of this channel. Specifically, the potential, the toxicity and the capacity of promote taquiphilaxis of several chemicals are determined. Compound 2 is the one which has the best results of activity and toxicity with an EC50 of  $18.83 \pm 1.83 \mu\text{M}$  and taquiphilaxis behaviour.

**Palabras clave:** TRPs, dolor, canales iónicos, analgésicos, ojo seco, cáncer, TRPM8, agonistas, antagonistas, mentol, cribado de alto rendimiento (HTS).

## Índice

1. Introducción.....	Pág. 1
1. Superfamilia TRP.....	Pág. 1
2. Características TRPM8.....	Pág. 3
3. Características estructurales.....	Pág. 4
4. Regulación de TRPM8.....	Pág. 5
5. Condiciones patológicas.....	Pág. 7
2. Antecedentes y objetivos.....	Pág. 9
3. Materiales y métodos.....	Pág. 11
1. Sistemas celulares.....	Pág. 11
2. Medidas funcionales mediante técnicas fluorimétricas.....	Pág. 11
3. Imagen de Calcio.....	Pág. 14
4. Ensayos de viabilidad celular: MTT.....	Pág. 14
5. Docking.....	Pág. 15
4. Resultados obtenidos.....	Pág. 16
1. Cribado de compuestos derivados del mentol.....	Pág. 16
2. Ensayos de especificidad.....	Pág. 18
3. Caracterización de la potencia.....	Pág. 20
4. Evaluación de citotoxicidad.....	Pág. 21
5. Imagen de Calcio.....	Pág. 22
6. SAR.....	Pág. 24
7. Docking.....	Pág. 24
8. Ensayos in vivo .....	Pág. 26
5. Discusión. ....	Pág. 28
1. Cribado de compuestos, ensayos de especificidad y caracterización de la potencia.....	Pág. 28
2. Evaluación de citotoxicidad.....	Pág. 28
3. Imagen de Calcio.....	Pág. 29
4. SAR.....	Pág. 29
5. Docking.....	Pág. 30
6. Ensayos in vivo .....	Pág. 31
6. Conclusiones y proyección futura. ....	Pág. 32
7. Bibliografía.....	Pág. 33



## 1. Introducción

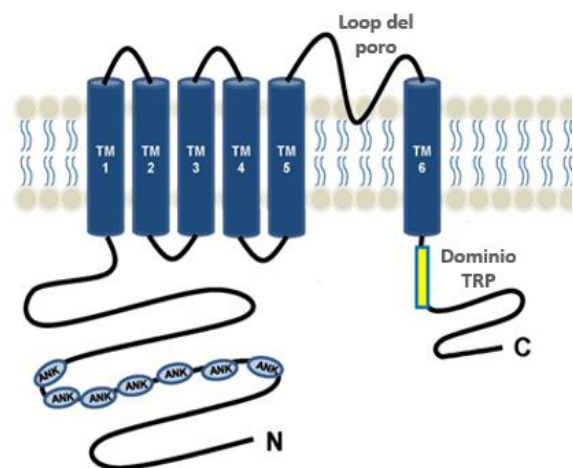
### 1.1. Superfamilia TRP

La superfamilia de los receptores de potencial transitorio (TRP) está compuesto por 30 miembros, agrupados en 7 subfamilias: TRPC (Clásicos o Canónicos) con 7 miembros, TRPV (Vanilloides) con 6 miembros, TRPM (Melastina) con 8 miembros, TRPA (Anquirina) con 1 miembro, TRPP (Policistina) con 3 miembros, TRPML (Mucolipina) con 3 miembros y TRPN (NOMPC, sin potencial mecanorreceptor C) con 2 miembros. Estas proteínas son canales catiónicos que permean a calcio y sodio, entre otros iones, y han sido asignadas a las subfamilias en función de la homología de secuencia [1]. Dentro de la superfamilia de los TRP, existe un pequeño grupo denominado termoTRP, compuesto por TRPV1, V2, V3, V4, M8 y A1, que reaccionan a un amplio rango de temperaturas [2, 3, 4].

Originariamente los canales TRP se encontraron en insectos, al estudiar los mecanismos de transducción visual en fotorreceptores. Posteriormente, se descubrió su papel en la visión y se encontraron homólogos en una inmensa diversidad de organismos, lo cual muestra la gran importancia evolutiva de estas proteínas. Estudios genómicos y estructurales desvelaron que existen relaciones evolutivas entre los canales TRP y los canales de calcio, así como con los canales de sodio activados por voltaje [1].

Todas las proteínas pertenecientes a esta superfamilia comparten una estructura común basada en 4 cadenas, cada una constituida por 6 dominios transmembranas (S1-S6) (Figura 1), y un p-loop entre los segmentos 5 y 6, responsable de la formación del poro. Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son citoplasmáticos, y están involucrados en la regulación del ensamblaje y función del canal. En la mayoría de los TRP, a excepción de TRPM, hay una serie de repeticiones de anquirina en el extremo N-terminal, de longitud variable [1, 5]. En el caso de TRPM y TRPC hay regiones ricas en prolina desde el S6 al C-terminal.

Una característica presente en todos los TRP es el dominio TRP, motivo de 25 aminoácidos situado en el C-terminal, que ha sido relacionado con la regulación y empaquetamiento del canal (Figura 1) [1]. En la figura 2 se representa la estructura funcional, con las 4 subunidades organizadas de forma concéntrica formando el poro, con orientación frontal y lateral respectivamente. En la figura 3 se muestran las diferentes regiones del extremo C-terminal y del N-terminal en función de la subfamilia, aportándole propiedades específicas a los canales pertenecientes a cada una de ellas. En el caso del loop, se ha observado una secuencia de aminoácidos conservada, posiblemente relacionada con la selectividad a calcio, característica presente en todos los integrantes de la superfamilia. Dentro de las subfamilias los miembros pueden diferir en selectividad, como en el caso de TRPV6 para magnesio o TRPML1 para el hierro [1, 6].



**Figura 1.- Subunidad de la superfamilia de canales TRP.** Puede observarse los S1-S6, el loop, el C-terminal, donde se encuentra el dominio TRP y el N-terminal, caracterizado por un gran dominio de sitios de unión a anquirinas [7].



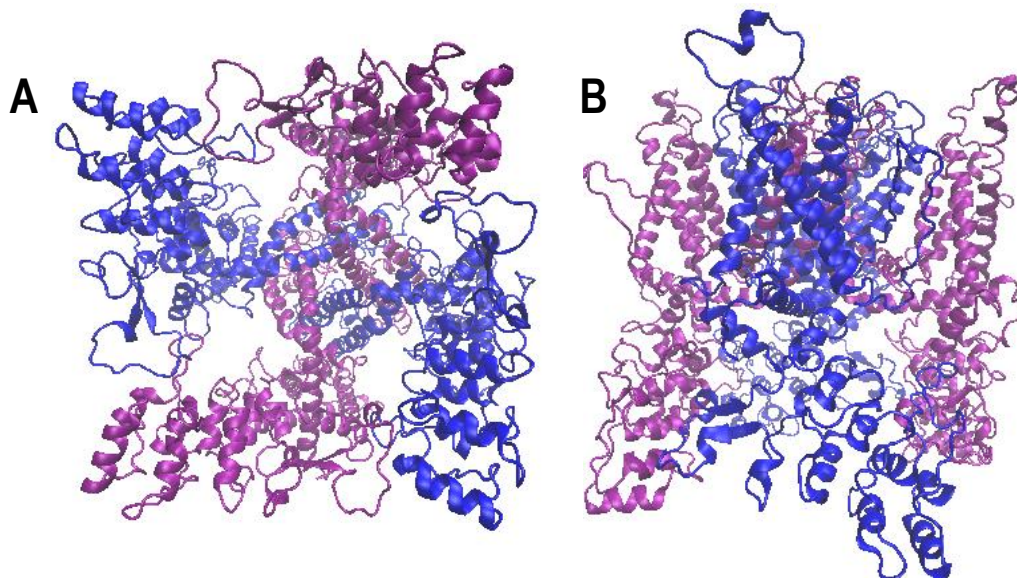


Figura 2.- **Canal TRPM8.** Representación en cintas de TRPM8 (PDB: 3J5P) donde se muestran las cuatro subunidades desde el lado frontal (A) y lateral (B).

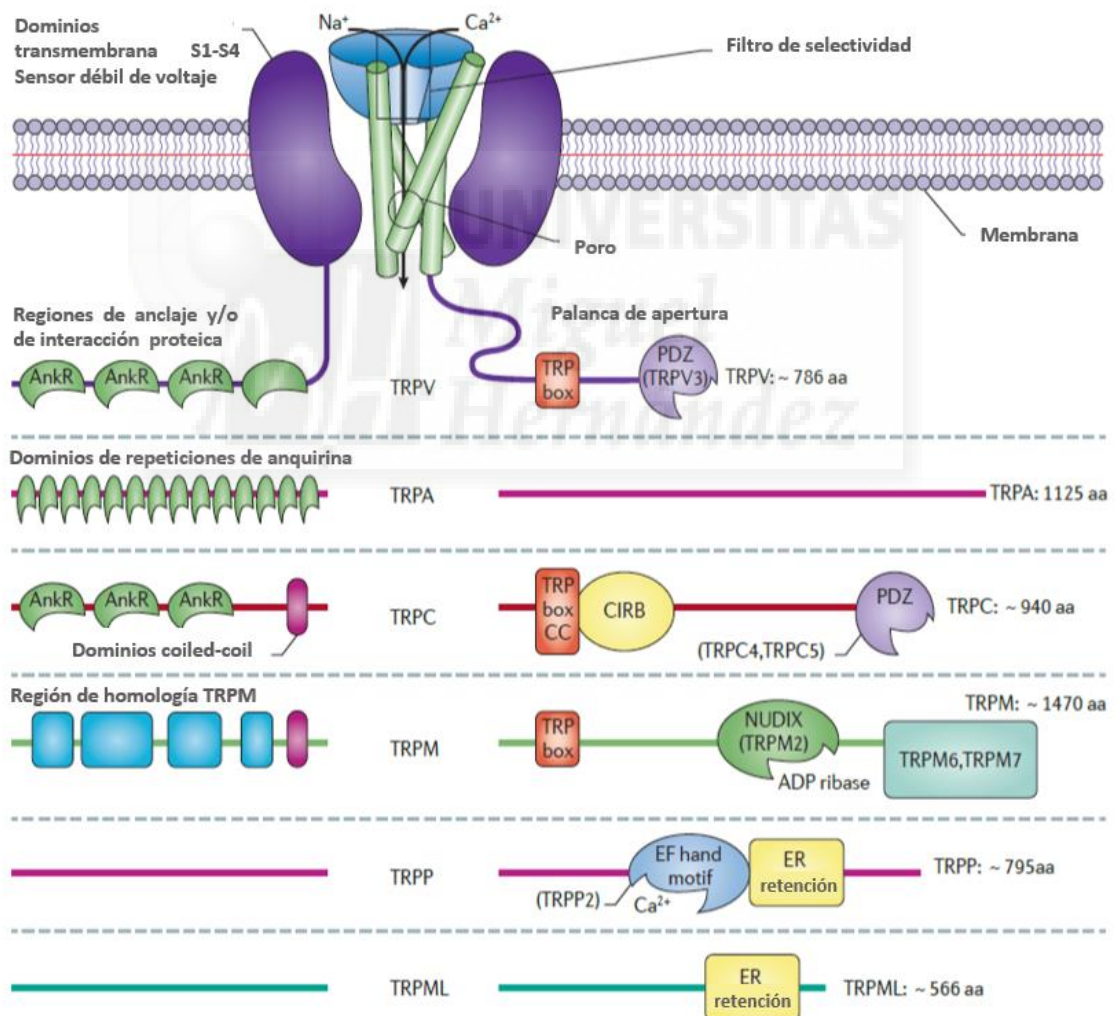


Figura 3.- **Canales TRP.** Las subfamilias TRP se caracterizan por los diferentes motivos del extremo C-terminal y N-terminal. TRPV, TRPA y TRPC son los canales que presentan repeticiones de anquirina (AnkR). Los canales TRPP y TRPML están caracterizados por el dominio de retención en retículo (ER Retención), lo cual indica que se expresan en orgánulos intracelulares. En TRPM aparece el dominio NUDIX, sitio de unión de las fosfohidrolasas [6].

## **1.2. Características de TRPM8**

TRPM8 es un homotetrámero polimodal con una alta selectividad por el calcio y pequeña selectividad por los cationes monovalentes como el sodio. Pueden activarse por múltiples mecanismos: voltaje, pH, frío, diversos agentes inflamatorios y ciertos compuestos químicos como mentol, eucalipto e icilina [8, 9]. La activación ejercida por el mentol y el frío en ciertas neuronas permitió determinar que ambos estímulos actuaban sobre la misma diana, estableciendo un nexo entre el mentol y TRPM8.

Originariamente, TRPM8 fue clonado a partir de células de cáncer de próstata, debido a su sobreexpresión en estas, y se encontraron tanto en la membrana plasmática como en las del retículo endoplasmático de diferentes células tumorales [5]. Este canal está expresado en circunstancias no patológicas en el 15% de las neuronas somatosensoriales, lo cual coincide con la proporción de neuronas que son sensibles a estímulos de frío en cultivos neuronales [2, 10, 11, 12]. Tanto TRPV1, canal relacionado con la sensación de calor, como TRPM8 se encuentran en ganglios como el espinal, el de las raíces dorsales, el trigémino o el ganglio nodoso, donde están los cuerpos neuronales de las neuronas somatosensoriales primarias. Han sido hallados en otros órganos como el ojo, el hígado, la vejiga, la próstata, los odontoblastos, el músculo liso o la epidermis, conociéndose la implicación de TRPM8 en diversas funciones biológicas, como la termorregulación, por lo que es de esperar que su alteración esté relacionada con determinadas patologías como el ojo seco, la vejiga hiperactiva o el cáncer [12]. Su presencia en esta gran diversidad de tipos celulares hace interesante la búsqueda de compuestos que normalicen la actividad del canal TRPM8 en condiciones patológicas.

La sensación de frío es detectada por aquellas neuronas que contienen los canales específicos que se activan en presencia de este estímulo, pertenecientes al sistema somatosensorial que engloba a los nervios C aferentes primarios no mielinizados y los nervios A $\delta$  ligeramente mielinizados. Son las neuronas sensibles a frío, trigeminales (TG) y ganglios de la raíz dorsal (DRG), las encargadas de convertir los estímulos en pulsos eléctricos [13, 14, 15]. La despolarización de la membrana de las neuronas sensoriales primarias causada por el canal TRPM8 activa los canales iónicos dependientes de voltaje que propagan los potenciales de acción a través de la neurona, para finalmente, liberar los neurotransmisores activando las neuronas sensoriales secundarias que envían el estímulo al tálamo. Es allí donde se establecerá conexión con las neuronas sensoriales terciarias, que harán llegar la señal eléctrica a la corteza cerebral, produciendo la sensación de frío (Figura 4).



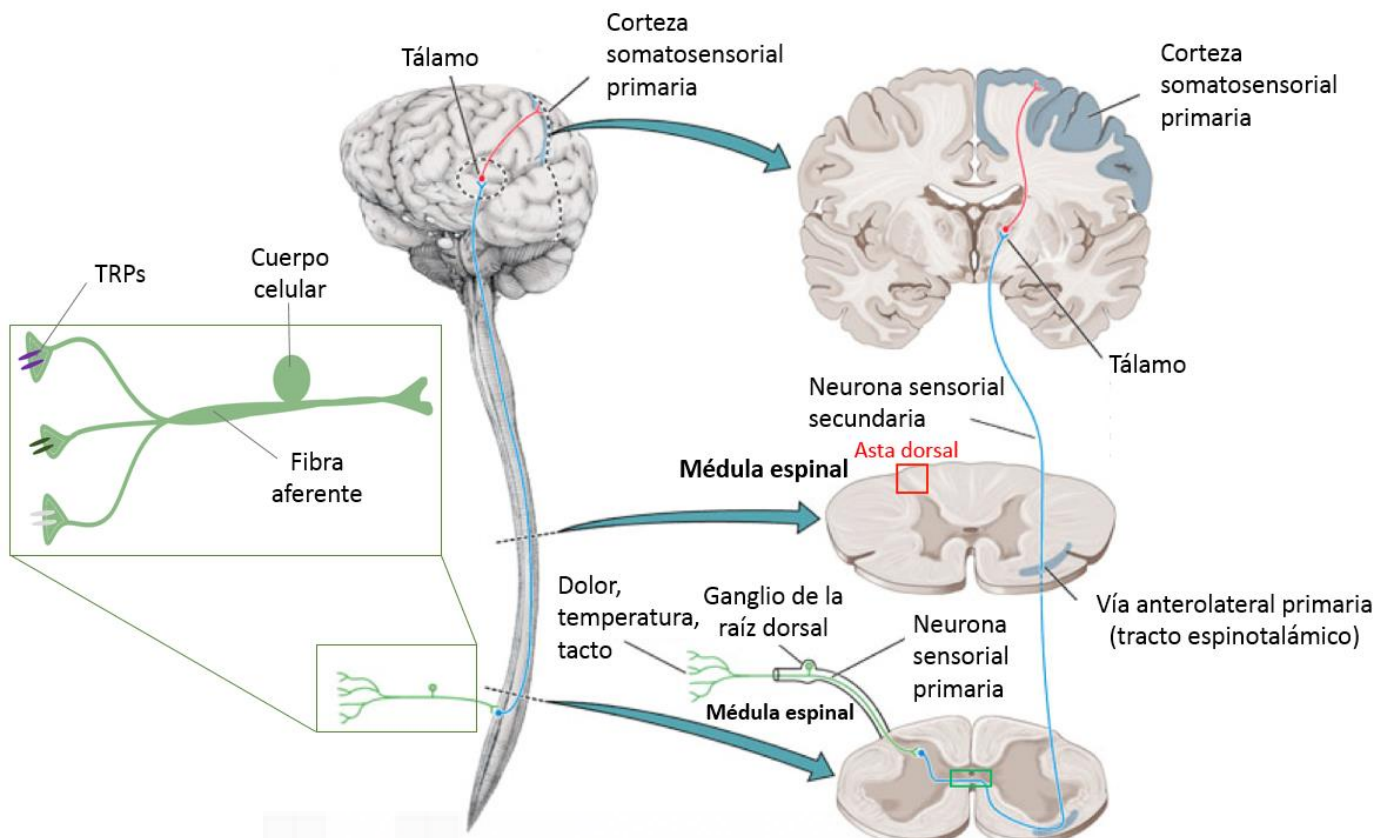


Figura 4.- **Vía somatosensorial.** El canal TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales primarias, que convierten el estímulo en una señal eléctrica y la propagan hacia las neuronas sensoriales secundarias, y estas a su vez a las neuronas sensoriales terciarias. Finalmente la información es analizada en la corteza somatosensorial, implicando la sensación de frío [16].

### 1.3. Características estructurales

Cada subunidad de TRPM8 tiene 1014-1018 aminoácidos, variando en función de la especie. Se diferencia de los otros miembros de TRPM en tener un dominio C-terminal más corto, relacionado directamente con la funcionalidad del canal ya que su delección supone la pérdida de la activación por frío o moduladores químicos. La región C-terminal también contiene el dominio de tetramerización, aunque estudios recientes han determinado que las regiones transmembranas son suficientes [17, 18]. Las regiones coiled-coil, comprendidas entre los aminoácidos E684 y R721, tienen dos funciones principales: ayudar a la subunidad a ensamblarse a su estructura funcional y colaborar en la activación de la respuesta a ligando químico y a temperatura [17]. En lo que respecta al N-terminal, región conservada en la familia TRP salvo en TRPM1 y TRPM5, ciertas investigaciones lo relacionan directamente con la localización del canal, siendo la región concreta 40-86 de TRPM8 importante para el transporte a la membrana [19].

TRPM8 está glicosilado en la asparragina 934, situada en el loop entre el S5 y S6, cuya eliminación tiene efectos en la translocación a la membrana. Una estructura importante en su función es el puente disulfuro que existe entre las cisteínas 929 y 940, situadas también en el loop entre S5 y S6. La mutación de cualquiera de las dos cisteínas supone la desaparición de la actividad inducida por frío, mentol o icilina, sin afectar al transporte de la proteína hacia la membrana, ya que está presente en la bicapa cuando presenta estas mutaciones [17, 18, 19].

En lo que respecta a la activación por voltaje, existe una gran controversia acerca de cuáles son los determinantes moleculares responsables de percibir el estímulo de voltaje. En los canales de potasio se ha demostrado que la región implicada en la activación por voltaje se encuentra en el segmento transmembrana S4. En los canales TRP, ciertos estudios indican que la mutación de los aminoácidos de carga positiva, situados en la región transmembrana S4 y en el segmento de unión S4-S5, alteran la dependencia de voltaje de TRPM8 [17, 19]. Otros investigadores realizaron un modelo basado en una interacción alostérica entre el voltaje y la temperatura, y determinaron que la región C-terminal de TRPM8 es la responsable de la respuesta del canal al voltaje [17, 18]. Según estos autores, tanto la dependencia del voltaje como de la temperatura, reside en diferentes regiones del dominio C-terminal, proponiendo a esta región como elemento imprescindible de la mayoría de las funciones principales de TRPM8 y en general, de la familia TRP.

Aunque no está claramente demostrado el mecanismo de activación del canal por frío, algunos grupos establecen que una posible razón es el efecto que tiene la temperatura en la interacción del C-terminal con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Sin embargo, otros grupos alegan que de ser el caso, todos los canales de la superfamilia TRP presentarían, al menos, cierta dependencia de la temperatura [18], proponiendo que la temperatura afecta a la interacción entre el extremo C-terminal y alguna región del canal, como el loop intracelular. Otras sugerencias están enfocadas a procesos celulares independientes que puedan promover finalmente la actividad del canal [17].

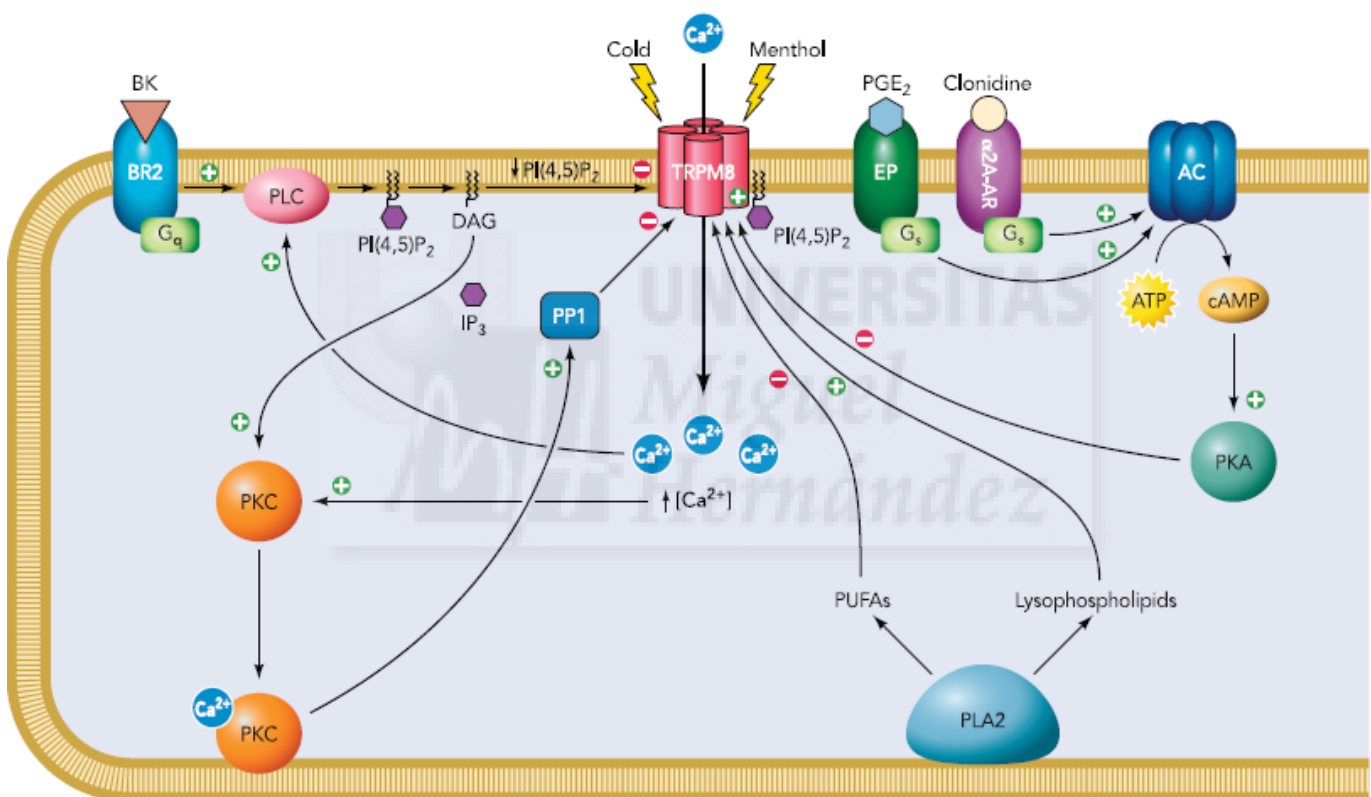
Se han tratado de determinar a su vez los sitios de unión de algunos moduladores químicos de TRPM8. En el caso del mentol, la tirosina 745 es indispensable para la activación del canal, viéndose suprimida la activación en caso de estar mutada. La tirosina 1005 y la leucina 1009 parecen estar también involucradas en el sitio de unión a mentol, dado que los mutantes pierden la sensibilidad a esta molécula, pero no a la temperatura. Otro sitio de unión fundamental, es por ejemplo el del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), molécula relacionada con la desensibilización del canal y por lo tanto con un mecanismo de regulación intracelular. En el extremo C-terminal existen tres residuos cargados positivamente [18], cuya neutralización supone la reducción a la sensibilidad a PIP<sub>2</sub> [17]. Algunos científicos proponen el dominio TRP como sitio de unión al PIP<sub>2</sub>, dado que existen 3 aminoácidos cargados positivamente en esta región, K995, R998 y R1008, cuyos mutantes presentan menos actividad [18, 20].

#### **1.4. Regulación de TRPM8**

El estudio para encontrar los canales involucrados en la sensación de frío estableció que el responsable era TRPM8, activado por temperaturas menores de 30°C en neuronas sensoriales y menores a 26°C en sistemas heterólogos. Estas diferencias sugieren la posibilidad de una modulación endógena en la actividad del canal in vivo, siendo conocida actualmente la necesidad de que el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) se una al canal para su activación [8, 9, 14]. El aumento de calcio intracelular puede modular de manera indirecta la actividad del canal a través de la fosfolipasa C (PLC) y la fosfoquinasa C (PKC). En el primer caso, se lleva a cabo la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), evitando la unión de las moléculas de PIP<sub>2</sub> al canal y por tanto, causando su desensibilización. En el caso de la vía de activación dependiente de PKC, la cantidad de c-AMP aumenta por la activación de proteínas G acopladas a la subunidad alfa de los receptores, estimulando la actividad de la fosfatasa 1 (PP1) que defosforila a TRPM8 y finalmente desensibiliza el canal (Figura 4). Adicionalmente, se han relacionado la actividad de ciertos estímulos a la modulación positiva del canal, como el caso de la fosfolipasa A2 no sensible a calcio (iPLA2), basada en la rotura del enlace éster del sn-2 de los glicerofosfolípidos, que generan ácidos grasos poliinsaturados que inhiben a TRPM8, y lisofosfolípidos que lo

activan por la bajada del umbral de temperatura, prevaleciendo la actividad del canal a pesar de tener efectos opuestos. Otras formas de modulación son la actividad de PKA, la glicosilación del canal en residuos específicos y el aumento del pH intracelular [2, 8, 13]. Tratamientos con mediadores proinflamatorios como son la bradiquina y la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) han mostrado respuestas de desensibilización del canal TRPM8, cuyos mecanismos moleculares, la vía PCL y PKA respectivamente, han sido descritos previamente [17].

Estas regulaciones endógenas, que conllevan la desensibilización del canal por la entrada de calcio, hacen interesante la búsqueda de agonistas para modular su actividad mediante la desensibilización o taquifilaxia, siendo las vías de la PKC, PCL y PKA las encargadas de estos efectos. Una vez el canal es activado por un estímulo, la disminución de la actividad es progresiva en el tiempo, durante el cual no se obtendrá respuesta del canal si es expuesto de nuevo a un estímulo, fenómeno conocido como taquifilaxia.



**Figura 5.- Modulación de TRPM8 por la señalización intracelular.** TRPM8, representado por cuatro subunidades, puede ser modulado por gran diversidad de cascadas de señalización en neuronas sensoriales. La activación de la fosfolipasa C (PLC) da lugar a un descenso de los niveles de PIP<sub>2</sub> en plasma, hidrolizándolo a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), desensibilizando el canal. La activación de la adenilato ciclasa da lugar a un aumento del c-AMP, que activa la proteína quinasa A, regulando negativamente al canal. El incremento celular de calcio activa a la fosfoquinasa C (PKC) que modula a la fosfatasa 1 (PP1) e inhibe al canal por defosforilación [22].

### **1.5. Condiciones patológicas**

Debido a la inmensa variedad de órganos y tipos celulares en los que se encuentra TRPM8 y la gran diversidad de funciones con las que se le relaciona, la alteración de su función tiene como resultado múltiples enfermedades.

En primer lugar, se ha establecido el vínculo entre la hiperactividad de TRPM8 y el desarrollo y mantenimiento de la alodinia por frío e hiperalgesia, lo que implica la presencia del canal en neuronas pertenecientes a la ruta nociceptiva. Ambos síntomas están relacionados con el dolor inflamatorio, fundamentalmente mediado por TRPV1 y TRPA1 pero también vinculado con TRPM8, existiendo evidencias funcionales y patológicas que implican al canal en condiciones de inflamación. De hecho, se conoce la importancia de moléculas pro-inflamatorias como la bradiquinina y PGE<sub>2</sub> en la actividad de TRPM8 [17]. La percepción de la temperatura es una característica fundamental en el sistema nervioso, permitiendo a los organismos evitar el daño físico y elegir las condiciones ambientales idóneas para la supervivencia. Los nervios termosensibles pueden detectar las temperaturas inocuas o nocivas, habiendo evidencias experimentales que reflejan la relación de la actividad de TRPM8 con dolor por frío, dado que la ausencia de este supone la disminución de la sensación a frío nocivo [13,14]. En condiciones normales, el frío provoca la activación de los nervios A $\delta$ , relacionados con la percepción a frío inocuo, que desembocan en la inhibición de los nervios C2, pertenecientes a la vía de señalización nociceptora. A menores temperaturas, los nervios A $\delta$  dejan de hacer su efecto inhibitorio sobre los nervios C2, siendo a su vez estimulados por el frío y dando lugar a la percepción del frío como sensación glacial, punzante o dolor por calor. Los bajos umbrales de activación y la sensibilidad a mentol de las fibras C2, sugieren que el sensor de temperatura es TRPM8, teniendo un papel en la función nociceptiva [17]. Adicionalmente, se descubrió su estrecha implicación con el dolor en estudios de la familia de receptores de factores neurotrópicos 3 (GFR $\alpha$ 3), observándose un ascenso de la sensibilidad al frío al añadir artemisa, agonista natural de GFR $\alpha$ 3. La ausencia de percepción a frío al añadir artemisa en ratones con una versión mutante de TRPM8 (knock out) y la abundante presencia de esta molécula en condiciones inflamatorias, vinculan al canal a la hipersensibilidad a frío en dichas condiciones [24]. Por otra parte, el dolor neuropático, padecimiento ocasionado por una lesión traumática del nervio o por enfermedades como la neuropatía diabética, está asociado con la hipersensibilidad a estímulos mecánicos y de frío, donde TRPM8 parece tener un papel fundamental. Recientemente, se ha demostrado la importante implicación de TRPM8 en la analgesia, al tratar con mentol en casos de dolores crónicos, neuralgias y dolores dentales y musculares, basándose en la desensibilización del canal como método de bloqueo de la actividad [21]. Esta nueva función establecida en neuronas sensoriales, hacen de TRPM8 una diana terapéutica interesante para desarrollar nuevos fármacos de carácter analgésico [13]. Adicionalmente, se han realizado experimentos en ratones knock out de TRPM8 que recibían oxaliplatino como tratamiento quimioterapéutico, en los que se observaron una disminución de la sensación de dolor con respecto a los ratones de fenotipo salvaje, surgiendo un nuevo ámbito de estudio para desarrollar fármacos con la intención de paliar los síntomas no deseados de estos tratamientos y los del dolor [22, 23, 24].

Paralelamente, diversos estudios han relacionado específicamente la importante participación de canales TRPM8 alterados en los tumores, implicados en la iniciación y progresión celular, encontrándose incluso diferentes formas mutadas de TRPM8 en cánceres de próstata, pulmonar, melanomas, adenocarcinoma, cáncer de vejiga y colorrectal. Algunas investigaciones muestran que TRPM8 es activado por la testosterona en las fases iniciales del cáncer de próstata, influencia que se ve disminuida en la transición a cáncer andrógeno-independiente o en pacientes a los que se les administra un tratamiento anti-andrógeno. La pérdida de relación entre la actividad de TRPM8 y el desarrollo del cáncer está correlacionado con un peor pronóstico en los pacientes de cáncer de próstata avanzados [22, 25]. El uso de bloqueadores y

de mentol en células tumorales de próstata promueve la apoptosis y reducen la viabilidad de las células cancerígenas dependientes de andrógenos, por lo que se deduce que en los estadios iniciales TRPM8 es esencial para la supervivencia [22]. En concreto, se ha observado en células cancerígenas de próstata la presencia de canales de TRPM8 con los 65 primeros aminoácidos delecionados en el extremo N-terminal, además de la continua liberación de calcio al citosol desde el retículo endoplasmático por parte de estos canales [19]. Estos hechos hacen a TRPM8 una diana potencial para el diagnóstico y el tratamiento de estas patologías, focalizado en la búsqueda de bloqueadores o moduladores negativos. Por consiguiente, ampliar los conocimientos sobre la actividad y regulación de TRPM8 puede ser relevante a la hora de desarrollar nuevos fármacos anti-tumorales menos invasivos para el paciente y con un grado menor de efectos secundarios por la menor toxicidad en las células no tumorales [22].

Otra de las enfermedades con implicación directa del canal TRPM8 es el ojo seco, afección en el que el lagrimeo basal es menor del habitual, quedando eliminada la película de la superficie ocular [26]. La implicación de TRPM8 se basa en el papel de las neuronas aferentes primarias que conectan con la córnea, que son capaces de regular el fluido ocular, incrementando el lagrimeo. El tratamiento con mentol de esta patología ha mostrado tener resultados positivos, sin causar los efectos de irritación o dolor. En consecuencia, la búsqueda de agonistas, especialmente con baja capacidad de desensibilización, tiene especial importancia, con el objetivo de incrementar el volumen de lagrimeo. Igualmente, en aquellas situaciones de hiperactividad de TRPM8 en el lagrimal, como los casos de alergias, irritación corneal y conjuntivitis bacteriana, son necesarios antagonistas que lo bloqueen, con el fin de normalizar el lagrimeo [27].

Todos los recientes descubrimientos que relacionan la alteración funcional de TRPM8 con gran variedad de patologías, como las respiratorias, las dermatológicas y las gastrointestinales, determinan un nuevo marco de estudio, enfocado en la modulación de su actividad. Consecuentemente, se están estableciendo nuevas líneas de investigación para el estudio terapéutico de moléculas, obtenidas a partir de quimiotecas naturales o sintéticas, que permitan explotar su potencial. Basándonos en la modulación positiva del mentol en TRPM8, se han desarrollado quimiotecas a partir de este compuesto, con la intención de encontrar algún posible fármaco con menores efectos de irritación, inflamación y malestar general que los ocasionados por el mentol. Los compuestos, suministrados por el grupo del Doctor Giancesare Tron de la Università del Piemonte Orientale, Novara, Italia, fueron estudiados mediante técnicas de cribado de alto rendimiento para caracterizarlos farmacológicamente.

## **2. Antecedentes y objetivos**

Actualmente, no existen tratamientos farmacológicos con compuestos basados en el mentol, aunque sí son ampliamente utilizados para la cosmética y la higiene, como es el caso del WS-12, derivado del mentol con una EC50 de  $12 \pm 5 \mu\text{M}$  [28]. Una de las características que hace a WS-12 atractivo como compuesto, es la incapacidad de producir taquifilaxia en el canal, pudiendo ser usado como agonista continuo, aunque sin utilidad a modo de bloqueador. Por esta razón, se trata de buscar moduladores de TRPM8 cuya desensibilización o taquifilaxia pueda utilizarse para evitar la actividad del canal, con la intención de no utilizar bloqueadores de TRPM8, que pueden producir efectos secundarios indeseables debido a la gran diversidad de funciones reguladas por el canal y su importancia fisiológica como es el caso de la regulación de la temperatura corporal.

En lo que respecta al mecanismo de acción, se observó que el compuesto WS-12 podía inducir la activación máxima del canal en ausencia de calcio extracelular y tampoco se veía afectada en soluciones acidificadas, situaciones comunes con el mentol y diferentes de la icilina, la cual requiere calcio extracelular para activar a TRPM8 y cuyo efecto en el canal es bloqueado por pH ácido. A pesar de estas diferencias, el mentol y la icilina tienen una eficacia farmacológica similar [29].

Una de las posibles aplicaciones de los agonistas de TRPM8 es su uso como analgésicos, debido a la implicación de estos canales en las vías de transducción del dolor. Actualmente, los opioides, como la morfina, son compuestos ampliamente utilizados como analgésicos que actúan sobre diferentes proteínas acopladas a proteínas G, teniendo efectos inhibitorios de la sinapsis. Tienen consecuencias en el estado de ánimo, en la dependencia física y diversos efectos por el abuso de su consumo, razones que determinan la urgencia del descubrimiento de nuevos fármacos que faciliten la dosificación y el tratamiento para los pacientes, atenuando los efectos secundarios de la medicación y normalizando la dosis. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son otros analgésicos que tienen como dianas a las enzimas ciclooxigenasas (COX), involucradas en la producción de prostaglandinas, y cuya inhibición se traduce en la disminución de la sensibilización de neuronas somatosensoriales, con efectos secundarios cardiovasculares o gastrointestinales [30, 31].

La hipersensibilidad a frío en los pacientes que reciben oxaliplatino como tratamientos quimioterapéuticos, es un efecto secundario que obliga a parar de administrar este agente citotóxico. Debido a la vinculación de TRPM8 con la sensibilidad a frío, se pueden utilizar moduladores de la actividad de TRPM8 para paliar los efectos secundarios a los que esta medicación conlleva, permitiendo la continuidad con el tratamiento [32].

En lo que respecta al cáncer, el reciente descubrimiento del nexo entre las células tumorales y TRPM8 hace a este canal una potencial diana terapéutica para tratar esta enfermedad, especialmente en el cáncer de próstata. Los compuestos utilizados actualmente en quimioterapia afectan al tejido objetivo y a otros tipos celulares, lo que desemboca en múltiples efectos secundarios en el paciente. Consecuentemente, la búsqueda de nuevos compuestos que impidan la proliferación de las células tumorales o disminuyan su viabilidad celular, sin afectar a las células no tumorales es primordial. En la patología del ojo seco, es trascendental el desarrollo de nuevos compuestos basados en la estimulación de la producción lagrimal gracias a la activación del canal TRPM8 [22].



El área de investigación para el cribado de compuestos que afectan a la actividad de TRPM8 es fundamental para mejorar los tratamientos y reducir los efectos secundarios con respecto a la medicación actual. La principal familia investigada es la TRP, especialmente TRPV1 y TRPM8 (aunque será TRPM8 el canal principal sobre el cual se efectuará este estudio). El conocimiento exhaustivo del funcionamiento de los diferentes mecanismos de desensibilización de TRPM8, permite explotar el potencial farmacológico de los agonistas del canal, obteniendo el efecto terapéutico deseado y evitando el uso de antagonistas. Actualmente, ya existen fármacos dirigidos a canales TRP que se basan en el uso de agonistas aprovechando la desensibilización, como es el caso de la capsaicina, agonista del canal TRPV1 que produce su desensibilización y por tanto actúa como analgésico. Cabe destacar, la notable importancia de encontrar derivados del mentol para utilizar en los tratamientos, y evitar los efectos secundarios que el mentol ocasiona, como la irritación, el escozor y la picazón. En este trabajo, se pretenden hallar compuestos derivados del mentol que no tengan los efectos adversos de éste, y con propiedades farmacológicas mejores o similares.

Es por todo ello que los objetivos del trabajo es emplear los conocimientos teóricos adquiridos a lo largo del grado en un laboratorio de investigación científica. En concreto:

- Realizar un cribado de alto rendimiento con la intención de encontrar nuevos compuestos moduladores de TRPM8.
- Establecer sus propiedades farmacológicas para determinar su potencial terapéutico:
  - o Caracterizar la potencia.
  - o Definir la citotoxicidad.
  - o Evaluar la taquifilaxia
- Realizar los estudios de relación estructura-función.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Sistemas celulares**

Para el estudio del canal TRPM8, se utilizaron células embrionarias de riñón humanas (HEK) a las cuales se les transfectó un plásmido que contenía el gen del canal TRPM8 de rata (HEK-TRPM8). La expresión es modulada por la exposición al antibiótico Geneticina 418 permitiendo obtener el canal de manera estable. Se cultivan en monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum), 1% Penicilina-Estreptomicina y 0.45 mg/ml de Geneticina 418, mantenidas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

Los ensayos se han realizado con células con pases entre 20 y 40, siendo cada pase realizado en flask de 25 ml cuando hay un 100% de confluencia, momento en el que se retira el medio y se tripsinizan. Para las medidas de actividad y viabilidad celular se cultivan las células en placas de 96 pocillos pretratadas con polilisina a una densidad de 30000 y 10000 células por pocillo, respectivamente, y 20000 células por cristal de 12 mm en el caso de las medidas de Imagen de Calcio.

En lo que respecta a los ensayos de especificidad, se utilizaron células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) transfectadas con un plásmido que expresa de forma estable el canal TRPV1 de rata. Se cultivan en monocapa en medio Earle's Minimum Essential Medium with earle's salt (EMEM) con 10% de FBS, 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 1% de Penicilina-Estreptomicina y 0.4 µg/mL de antibiótico Puomicina. Las células fueron mantenidas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> y usadas para los ensayos con un máximo de 20 pases, realizando cada pase en flask de 25 mL con una confluencia superior al 90%. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos pretratadas con polilisina diluida y a una densidad de 40000 células por pocillos.

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizaron células embrionarias de riñón HEK, cultivadas en monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) y 1% Penicilina-Estreptomicina, mantenidas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> y utilizadas en los ensayos con pases entre 20 y 40, siendo cada pase realizado en flask de 25 mL con una confluencia del 100%. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos pretratadas con polilisina y a una densidad de 10000 células por pocillo.

#### **3.2. Medidas funcionales mediante técnicas fluorimétricas**

Para realizar las medidas de función, se utilizan sondas fluorescentes sensibles a calcio, en concreto, Fluo-4NW (Lifestechnolgy) con Probenecid, detergente suave de baja toxicidad, que permite la entrada de la sonda en la célula e inhibe a los transportadores de aniones orgánicos, evitando alteraciones en las medidas por el transporte de la sonda al exterior celular. La unión del calcio a la sonda producirá un incremento en la fluorescencia, ya que la activación del canal TRPM8 supone un aumento de la concentración de calcio citosólico que se traducirá en un aumento en la intensidad de fluorescencia.

Para llevar a cabo las medidas, se incuban las células durante 3 días, se retira el medio de las células, y se añade 100 µl de sonda en cada pocillo. Se deja incubar durante 30 minutos a 37°C, permitiendo a la célula incorporar la sonda correctamente, y se mantienen a 30° durante 40 minutos, para aclimatar a las células. Transcurrido ese tiempo, se toman

las medidas de fluorescencia con el lector de placas POLARstar Omega a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm. Durante las medidas, las células se encuentran a 30°C, y se realizan 20 ciclos, obteniéndose los datos de cada uno de los pocillos en cada ciclo.

Una vez se han realizado los tres primeros ciclos, se añaden los compuestos a cribar, 1 µl de AMTB 1 mM (N-(3-Aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methoxy]-N-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride) (concentración en pocillo de 10 µM) como control negativo y DMSO (Dimetil sulfóxido) como control de vehículo. Aquellos compuestos que actúen como agonistas darán lugar a un aumento en la fluorescencia. Antes de comenzar el ciclo 11, el lector dispensa en todos los pocillos el agonista conocido, en este caso 10 µl de mentol a 1 mM (concentración en pocillo de 100 µM), con la intención de diferenciar los compuestos que actúan como antagonistas del canal, en cuyo caso no se observaría aumento en la fluorescencia al añadir el mentol.

Este procedimiento es el que permite conseguir mejores resultados con respecto a otros parámetros de temperatura y tiempo. Todos los resultados de fluorescencia se analizarán mediante el programa Excell. Los valores de intensidad de fluorescencia permitirán identificar si los compuestos son agonistas o antagonistas y determinar su potencia con un ensayo de dosis-respuesta.

Para validar el ensayo, se realiza el cálculo del factor Z, que debe encontrarse entre 0.5 y 1 para considerar el ensayo fiable. El factor Z se define con la siguiente expresión:

$$Z = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma_+ + \sigma_-)}{|\mu_+ - \mu_-|}$$

Los valores de  $\mu_+$  y  $\mu_-$  son los valores promedio de la diferencia de fluorescencia entre el ciclo 10 y ciclo 11 de los controles positivos y negativos, respectivamente. Los valores  $\sigma_+$  y  $\sigma_-$  son los valores de desviación estándar de las diferencias calculadas de controles positivos y negativos, respectivamente.

Para asignar a los compuestos un comportamiento agonista o antagonista, se representa gráficamente la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos. El diseño del experimento está programado para que el POLARstar Omega inyecte mentol en todos los pocillos en el ciclo 10. Como controles, se utilizan algunos pocillos en los que solo se añade mentol tras el ciclo 10 (control positivo), y otros pocillos a los que se añade AMTB tras el ciclo 3 y mentol tras el ciclo 10 (control negativo) (Figura 6).

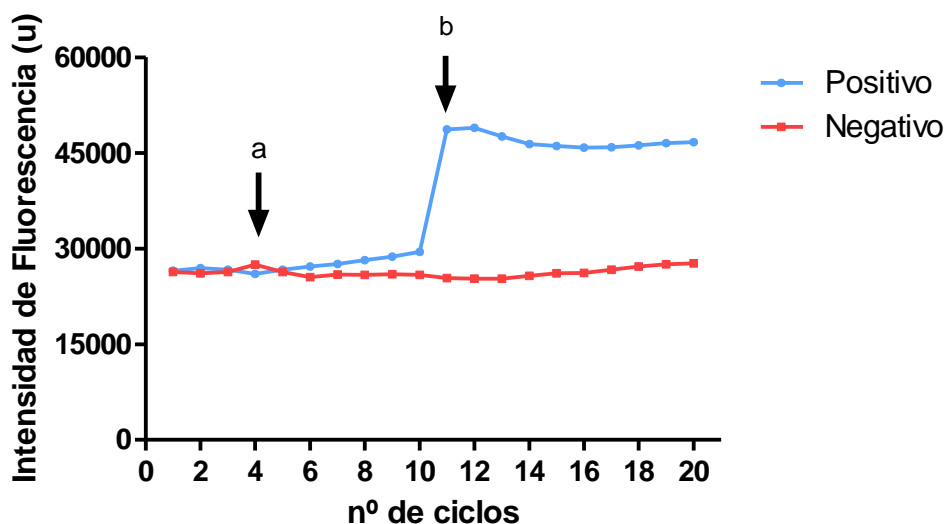


Figura 6.- Registro representativo de fluorescencia de células HEK-TRPM8. Se representa de color azul el control positivo, 10  $\mu$ l de mentol a 1mM, el cual es añadido tras el ciclo 10 (b). Se observa en rojo el control negativo, AMTB, añadido tras el ciclo 3 (a). Tras el ciclo 10 se añade el mentol (b) y no se detecta aumento en la fluorescencia debido al bloqueo del canal.

Aquellos compuestos que se comporten como agonistas presentarán un incremento de fluorescencia significativo en el ciclo 4 (Figura 7). En el caso de los antagonistas, no se observará un aumento en la intensidad de fluorescencia en el ciclo 11. Dentro de los antagonistas pueden haber diferentes formas de modular al canal, de manera que pueden aparecer antagonistas parciales, que no permiten el 100% de activación del canal por parte del mentol.

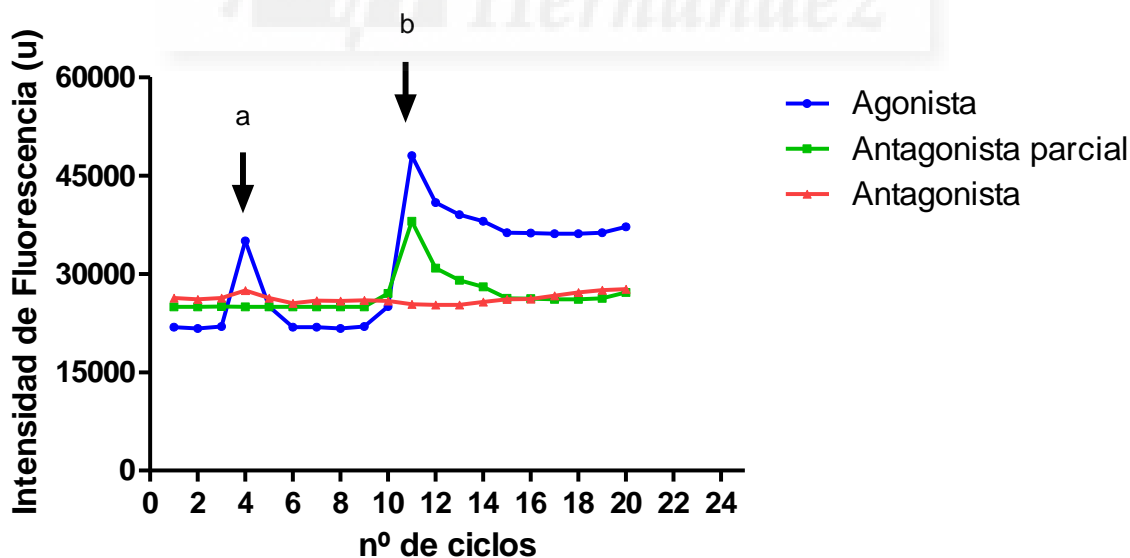


Figura 7.- Comportamiento de los diferentes posibles compuestos en HEK-TRPM8. El azul representa el agonista, añadido tras el ciclo 3(a), en el que se observa la activación del canal gracias al incremento de fluorescencia. En el caso de ser un antagonista parcial, es añadido tras el ciclo 3 (a) y se observará que no se obtiene la totalidad de la actividad del canal cuando se añade el mentol tras el ciclo 10 (b), representado en color verde. De color rojo se observa la acción del antagonista, añadido antes del ciclo 4 (a), sin aparecer actividad ante la presencia de mentol (b).

. Se procede a realizar el cálculo de la actividad, expresado en porcentaje de activación o inhibición según su comportamiento:

$$\% \text{ Activación} = \frac{\mu(IF_{\text{ciclo 4}} - IF_{\text{ciclo 3}})}{\mu(\Delta IF_{\text{control}})_{\text{ciclo 4-ciclo 3}}} \cdot 100$$

Para el cálculo de la potencia, el ensayo de fluorimetría se realiza con diferentes concentraciones del compuesto a estudiar. Para ello, se representa gráficamente el porcentaje de activación frente a la concentración en el programa de cálculo de Graphpad Prism 5.0, y se realiza un ajuste a la ecuación de Hill.

$$y = V_{\text{max}} \cdot \frac{x^n}{k^n + x^n}; \text{ Siendo } V_{\text{max}} \text{ un } 100\% \text{ y el valor } k \text{ la EC50.}$$

Los valores han sido normalizados con respecto a la máxima señal obtenida con el compuesto, en el que el 100% la actividad máxima.

### **3.3 Imagen de Calcio**

Además de las medidas funcionales y cribado de alto rendimiento con fluorescencia en POLARstar Omega, se han tomado medidas de actividad con técnicas de Imagen de Calcio con la intención de obtener registros de una sola célula y por tanto ganar resolución. Este dispositivo permite ver gracias a sondas fluorescentes de calcio, el aumento de la concentración de calcio citosólico en cada célula, permitiendo obtener imágenes de las células y la intensidad de fluorescencia en ellas.

Las células se incuban durante 24 horas, y se mantienen 90 minutos con la sonda, 3  $\mu\text{l}$  de Fluo4 (Lifestecology) a 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 2.5  $\mu\text{l}$  de detergente, ácido plurónico a 20 % en DMSO, en 1 mL de HBSS 1x. La técnica se basa en tener registros individuales de la fluorescencia en un campo de células, en el que debe mantenerse un flujo constante de buffer HBSS 1x (5 mL/minuto) para evitar la muerte celular. En los experimentos de taquifilaxia programados, se perfunde durante 30 segundos el buffer, seguidos de 3 pulsos de agonista de 30 segundos intercalados con 360 segundos de buffer.

### **3.4 Ensayo de viabilidad celular MTT**

Para realizar los ensayos de viabilidad celular se utiliza la técnica del MTT, ensayo colorimétrico basado en la medida de absorbancia de cristales de formazán. Los cristales de formazán son resultado de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la succinato-deshidrogenasa, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial. Las medidas de absorbancia obtenidas serán proporcionales a la viabilidad celular, dado que serán las células viables las que tengan activa esta enzima. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang [33].

La placa será utilizada tras 3 días de incubación a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, momento en el que se añadirán los compuestos a estudiar. Al estar trabajando con TRPM8, se utilizará 1  $\mu\text{l}$  de mentol a 10 mM, es decir, a una concentración en pocillo de 100  $\mu\text{M}$  como control de muerte celular por la apertura del canal y control negativo 3  $\mu\text{l}$  de RIPA, con el fin de observar la muerte celular máxima ocasionada por el detergente. El control del vehículo será 1  $\mu\text{l}$  de DMSO, debido a que

es el disolvente en el que se encontrarán los compuestos. Como control positivo se utilizarán pocillos a los que no se les ha añadido ningún compuesto. Una vez añadidos los compuestos, se incuba la placa durante 24 horas a 37°C, y se añaden 5 µl de MTT a 5mg/ml en disolución de PBS. Se incuba durante 4 horas a 37°C, durante las cuales se formarán los cristales de formazán. A continuación, se retira el medio, se le añaden 100 µl de DMSO, y se mantiene a temperatura ambiente durante 10 minutos permitiendo la rotura de las células y la disolución de los cristales. En todo momento, la placa debe ser protegida de la luz, debido a la fotosensibilidad del MTT. Se realizan las medidas a 560 nm y a 630 nm, como filtro de referencia. Se relacionará directamente el número de células viables y la cantidad de cristales de formazán liberados.

El porcentaje de citotoxicidad se define con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{D.O.células tratadas}}{\text{D.O.células control+}} \cdot 100\%$$

### 3.5 Docking

Las simulaciones de Modelado Molecular se realizaron a través del servidor proteo.ibmc.umh.es, ejecutando Yasara para el cálculo en pUTTY, con el comando:

```
"nohup /home/1402_1516/celia.corderoMB/yasara/yasara -txt dock_run.mcr > informe.txt"
```

Con él se obtenían los resultados del cálculo de docking, con runs= 500 y utilizando "AutodockLGA" del macro "dock\_run.mcr". El modelo pdb del canal TRPM8 se obtuvo realizando las modificaciones pertinentes en el modelo del canal TRPV1 (PDB: 3J5P). Para el docking local de carácter semiflexible, se ha utilizado Yasara, el macro "dock\_runlocal.mcr", con 100 runs y el método "AutodockLGA". Para este procedimiento se mantuvo el receptor rígido, exceptuando las cadenas laterales de los aminoácidos con los que interactuaba en el docking global y el ligando, que tendrían carácter flexible.



#### 4. Resultados obtenidos

##### 4.1 Cribado de compuestos derivados de mentol

La familia de compuestos derivados de mentol está formada por 27 miembros, los cuales fueron ensayados para medir el efecto sobre la actividad del canal TRPM8 en células HEK-TRPM8 mediante técnicas fluorescentes tal y como se detalla en el apartado 3.2 de *Materiales y métodos*. Se seleccionaron aquellos compuestos que presentaron mayor actividad que el mentol para continuar los estudios (Figura 8). Todos los ensayos de actividad fueron realizados por triplicado.

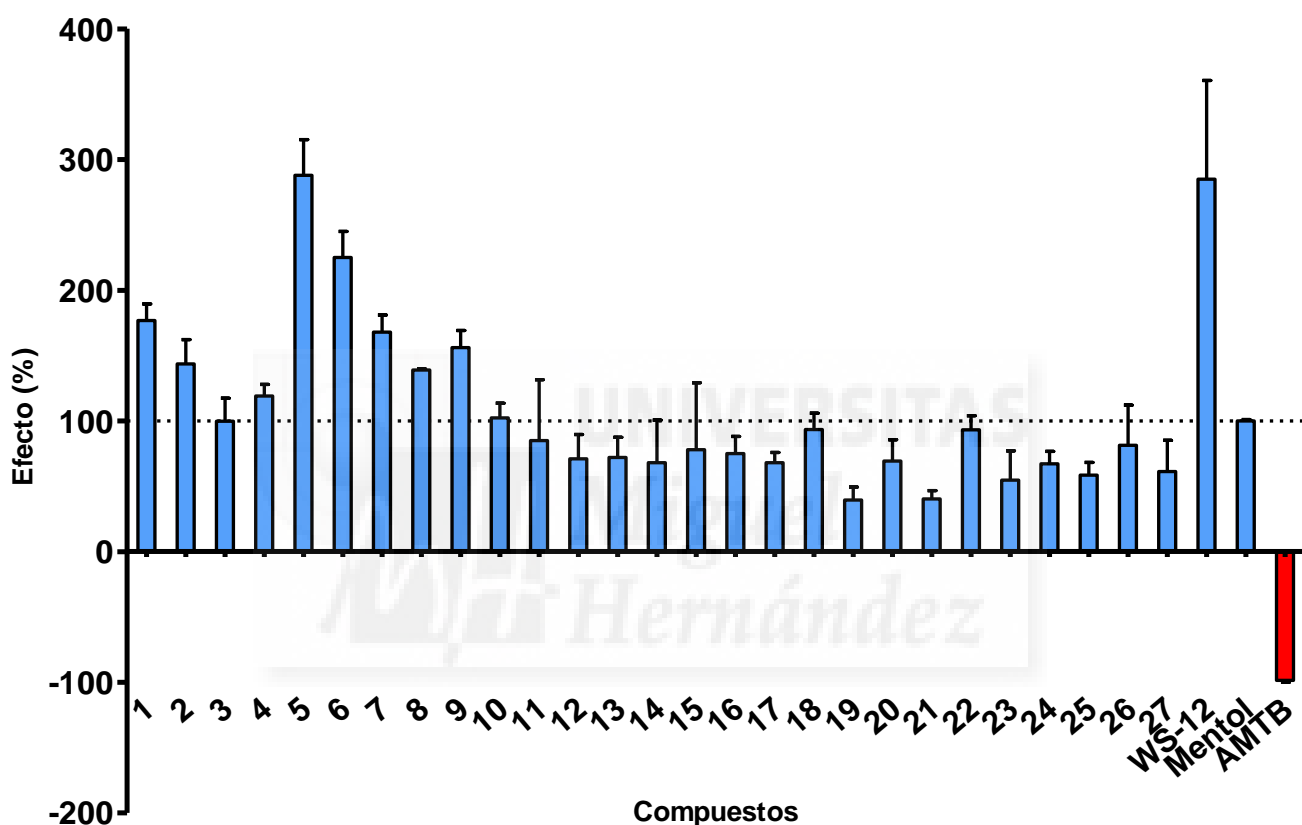
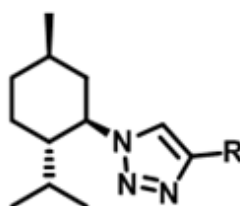


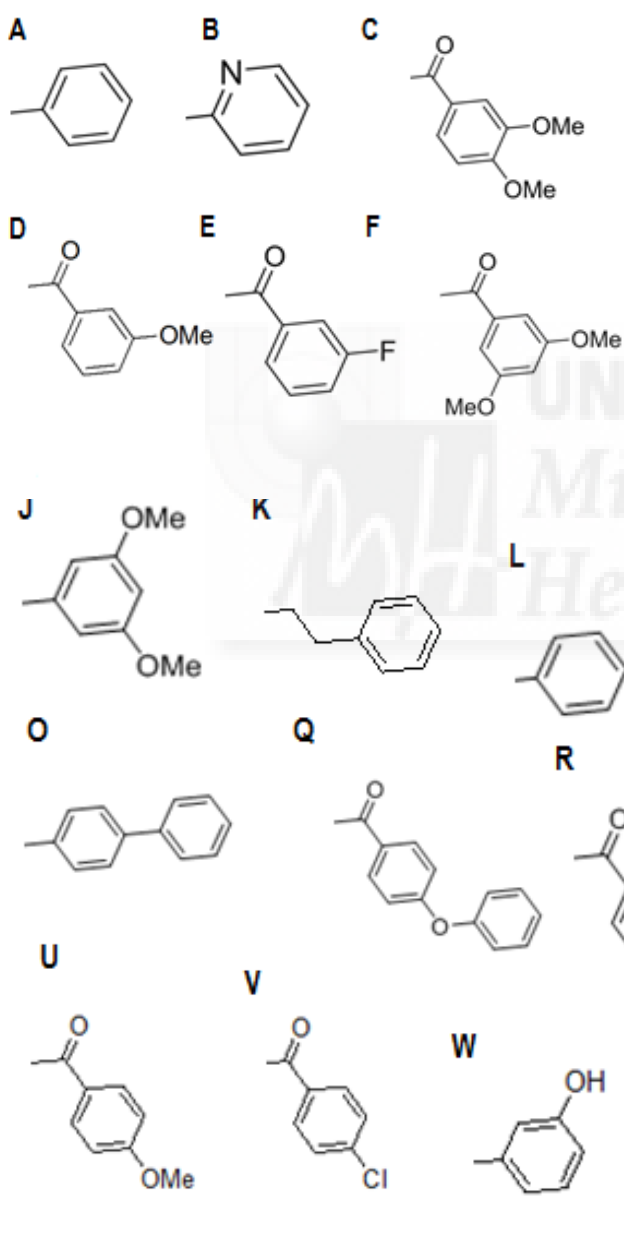
Figura 8.- **Representación resumen del Recopilatorio.** Aparecen los porcentajes de actividad de los compuestos pertenecientes a la familia a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ . El mentol a  $100 \mu\text{M}$  es la referencia a partir del cual se han realizado los cálculos. Se muestran como controles el AMTB, mostrando el bloqueo, y el WS-12.

Las estructuras químicas de los compuestos cribados están representadas en la figura 9.

Fórmula Markush



Radicales aromáticos



Radicales alquílicos y cíclico

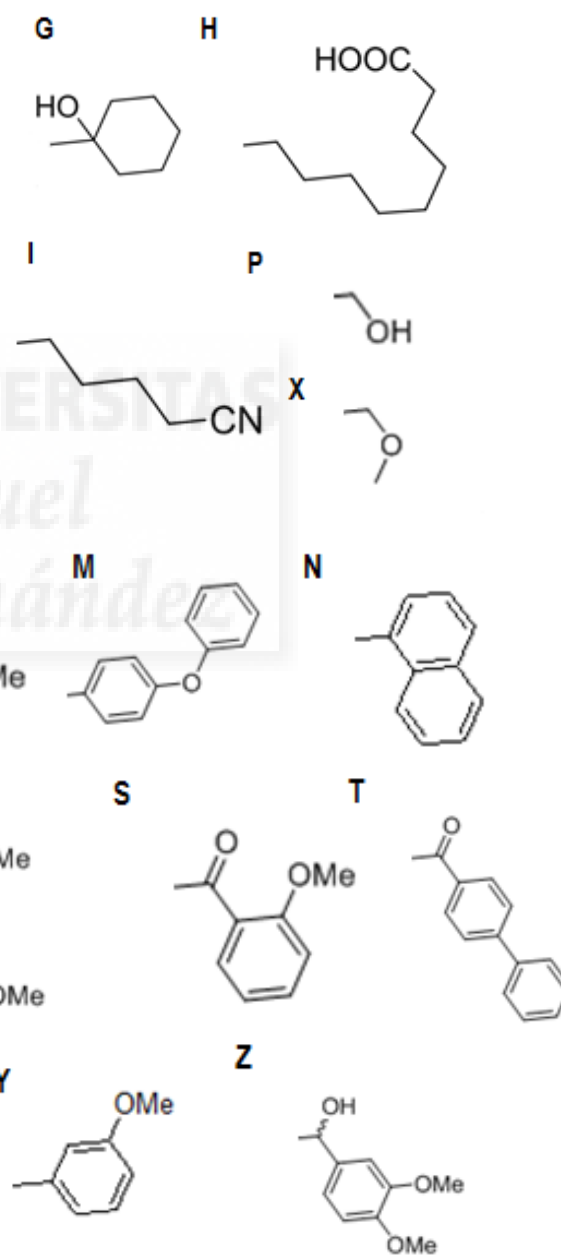


Figura 9.- **Quimioteca.** Estructura química basada en mentol: R representa los sustituyentes específicos de los compuestos. Se muestran los diferentes sustituyentes clasificados en radicales aromáticos y radicales alquílicos y cíclico.

Se probaron los compuestos seleccionados, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, en presencia del bloqueador AMTB a 10  $\mu$ M para comprobar que la intensidad de fluorescencia observada corresponde con la actividad del canal (Figura 10). El compuesto 10 no fue seleccionado dada a la dificultad de purificarlo, y por tanto tener muchas impurezas. En el caso de que en el ensayo se mantuviera en el registro el pico de intensidad, puede que el compuesto esté afectando a la permeabilidad de la membrana o activando otros mecanismos, hecho que ocurre para los compuestos 5, 6, 7, 8 y 9.

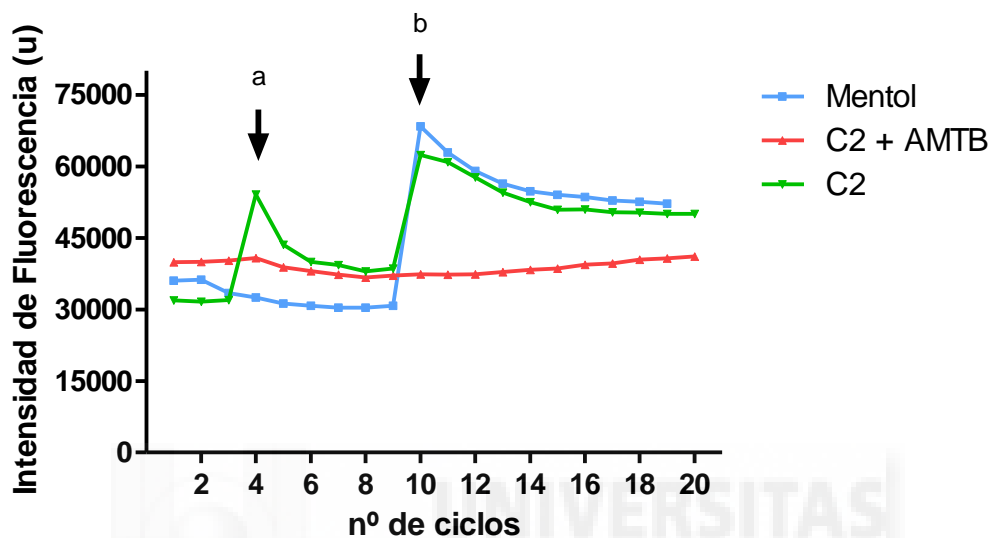


Figura 10.- **Ensayo representativo de la activación del canal TRPM8 por el compuesto 2.** En color azul se presenta la actividad del canal en presencia de mentol, añadido tras el ciclo 10 (b). En color rojo, se presenta la actividad de TRPM8 en presencia de AMTB, habiendo sido añadido junto al compuesto 2 tras el ciclo 3 (a) y mentol tras el ciclo 10 (b). En color verde viene representada las medidas de actividad del canal cuando se añade el compuesto 2 tras el ciclo 3 (a) y mentol tras el ciclo 10 (b).

#### 4.2 Ensayos de especificidad

Para comprobar la especificidad de los compuestos seleccionados, se midió en células de neuroglioblastoma humano (SH-SY5Y) que expresan el canal TRPV1 la actividad producida por los compuestos en presencia y ausencia de rojo rutenio, antagonista del canal TRPV1, para determinar si la fluorescencia observada es por la actividad de TRPV1. Los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 presentaron una ligera activación, que era inhibida con rojo rutenio, en ningún caso superando el 40% (Figura 11). El compuesto 9 presentó actividad que no era inhibida por rojo rutenio, pudiendo implicar la alteración en la permeabilidad de membrana o muerte celular.

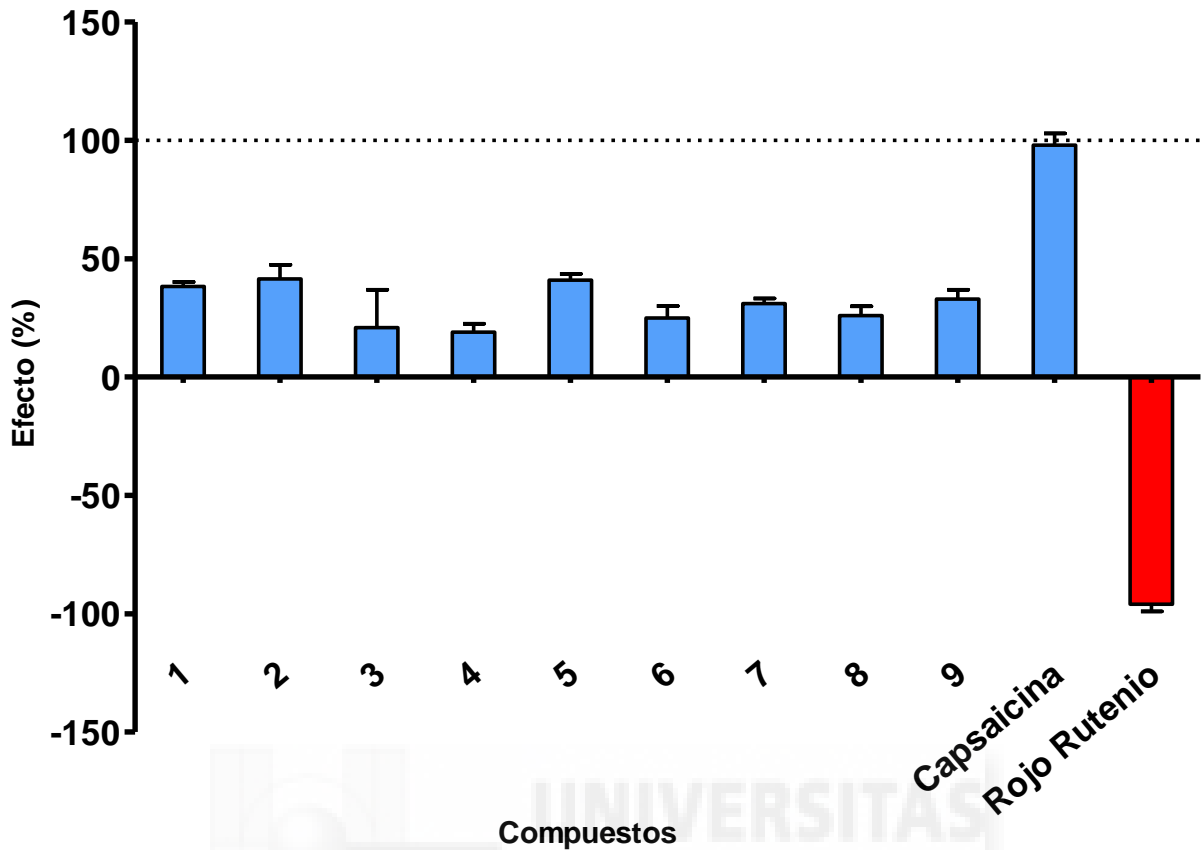


Figura 11.- Representación resumen de los resultados de los ensayos de especificidad. Aparecen los porcentajes de actividad de los compuestos seleccionados a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el canal TRPV1. Se utilizan como controles el rojo rutenio, mostrando el bloqueo y la capsaicina, mostrando la activación.

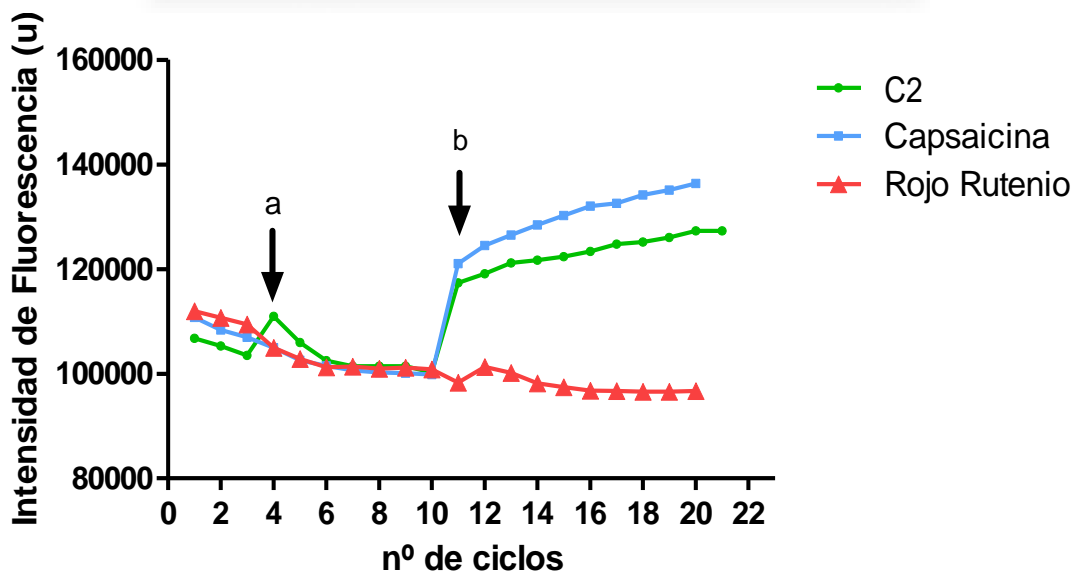


Figura 12.- Registro representativo de la actividad del canal TRPV1 por el compuesto 2. En color azul se presenta la actividad del canal en presencia de capsaicina a 10  $\mu\text{M}$ , añadido tras el ciclo 10 (b). En color rojo se presenta la actividad de TRPV1 en presencia de rojo rutenio a 10  $\mu\text{M}$ , habiendo sido añadido junto al compuesto 2 tras el ciclo 3 (a) y mentol tras el ciclo 10 (b). En color verde viene representada las medidas de actividad del canal cuando se añade el compuesto 2 tras el ciclo 3 (a) y mentol tras el ciclo 10 (b).

### 4.3 Caracterización de la potencia

Se determinó la potencia de los compuestos que fueron seleccionados calculando el EC50, gracias a los ensayos de dosis–respuesta realizados. Para ello se registraron la actividad ocasionada para 6 concentraciones diferentes de compuesto. El cálculo de la EC50 fue realizado por el programa Graphpad Prism 5, cuyos resultados se muestran los expuestos en la figura 13B.

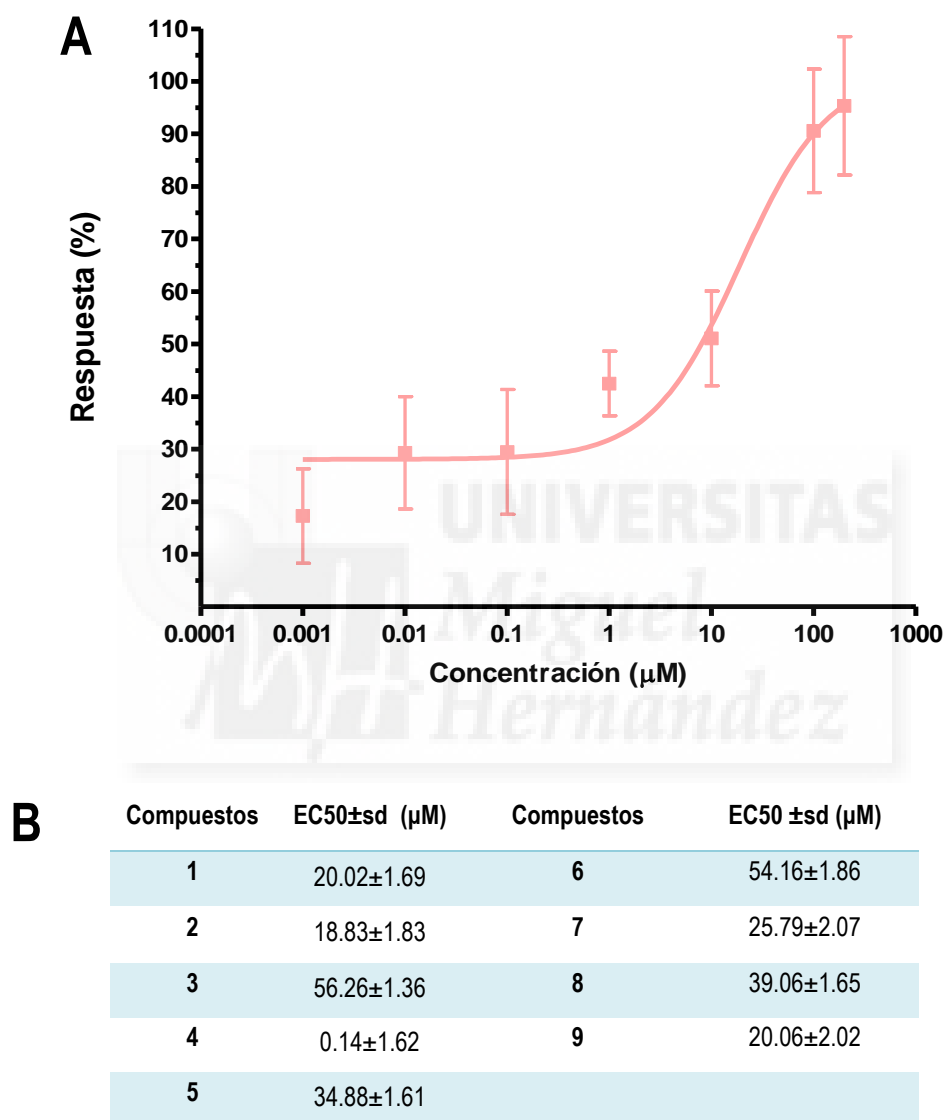


Figura 13.- (A) **Representación gráfica de la dosis respuesta del Compuesto 2.** Los resultados han sido normalizados a la actividad del canal, por lo que el 100% corresponde a la máxima actividad del canal producida por el compuesto. El estudio ha sido realizado por triplicado, obteniendo un total de 9 muestras. (B) **Tabla esquemática con las EC50 de los compuestos estudiados.** Los datos fueron obtenidos por Graphpad Prims 5.0.

#### 4.4 Evaluación de la citotoxicidad

En primer lugar, se hicieron ensayos de citotoxicidad para el AMTB y el mentol, para determinar las concentraciones que se utilizarían en los experimentos en las células HEK-TRPM8 (Figura 14).

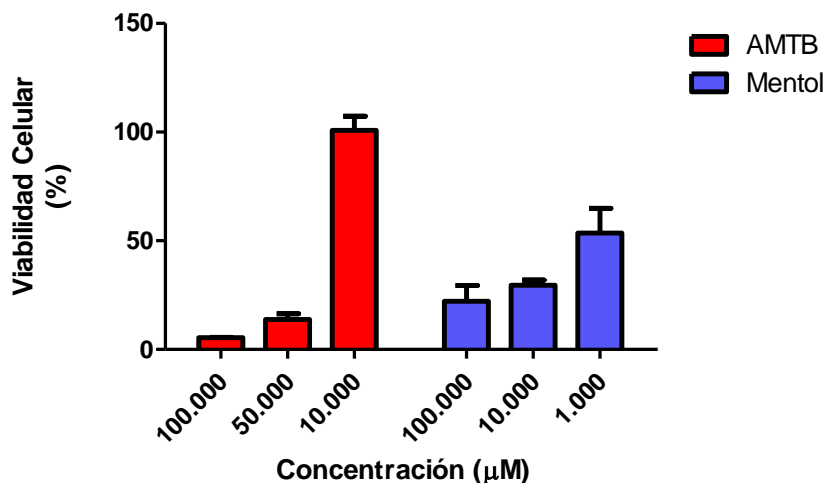


Figura 14.- Resultados de los ensayos de viabilidad celular en HEK-TRPM8. Se ensayaron concentraciones diferentes de mentol y AMTB.

Por otra parte, se estudió la citotoxicidad de los compuestos en las células HEK-TRPM8 a la concentración de 100 μM, con el fin de comparar los resultados con la EC50 del mentol (100 μM). Las medidas de MTT muestran que la mayoría de compuestos son tóxicos a 100 μM, sin embargo, en todos los casos se determina los compuestos son significativamente menos tóxicos que el mentol (Figura 15).

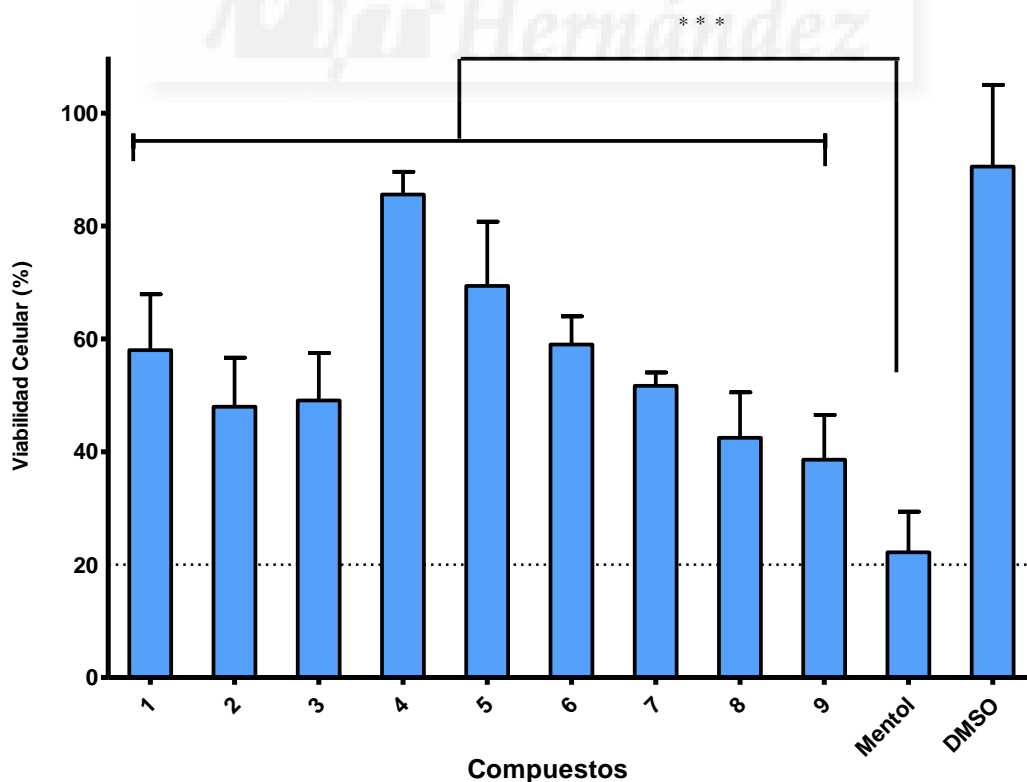


Figura 15.- Viabilidad celular en células HEK-TRPM8. Se observan los datos obtenidos de viabilidad celular en porcentaje a una concentración de 100 μM. Los datos obtenidos fueron analizados con t-student para determinar si eran estadísticamente significativos (\*\*\*)



Adicionalmente, se realizaron pruebas de viabilidad celular en HEK sin TRPM8 con la intención de determinar si la muerte celular registrada en las células HEK-TRPM8 es causada por la apertura del canal o por algún otro mecanismo de acción (Figura 16).

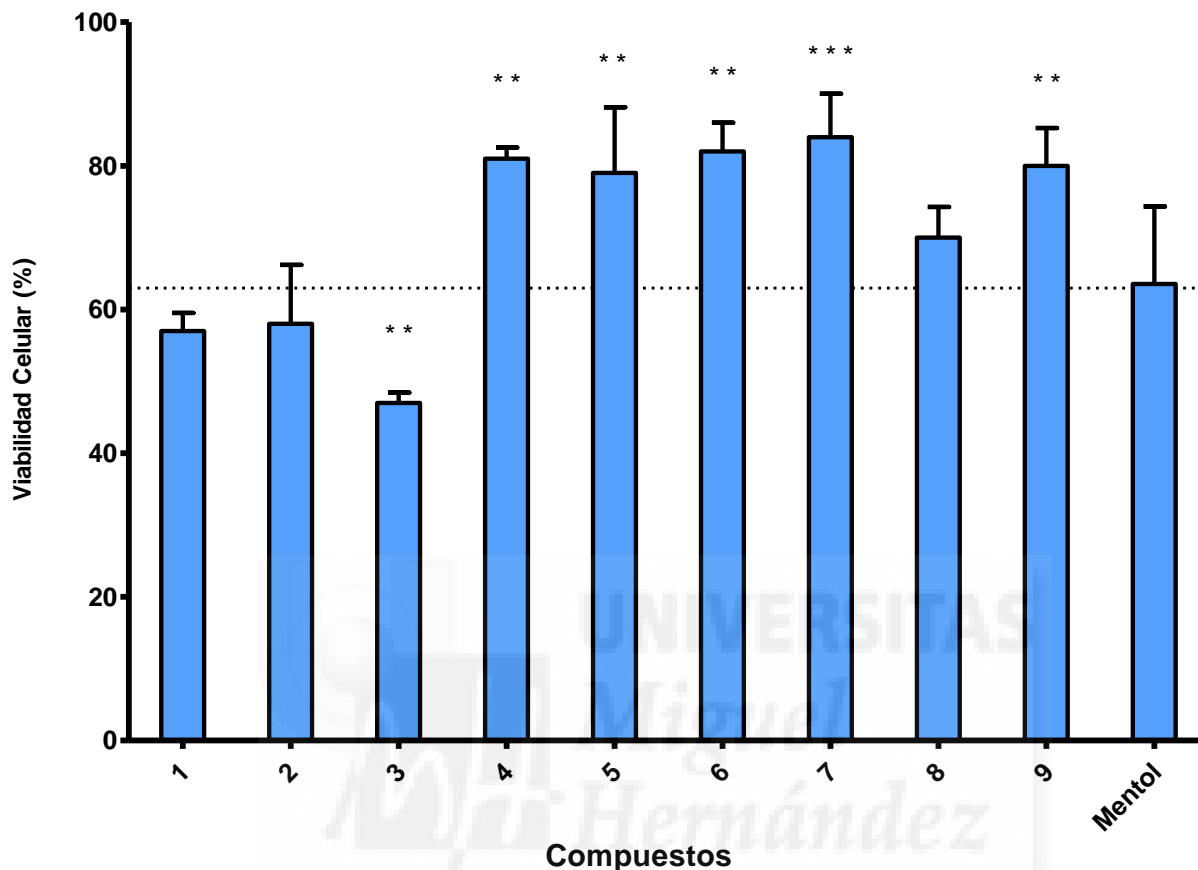


Figura 16.- **Viabilidad celular en células HEK.** Se observan los datos obtenidos de viabilidad celular en porcentaje a una concentración de 100  $\mu$ M. Los datos obtenidos fueron analizados con t-student para determinar si eran estadísticamente significativos, marcados con (\*\*\*) o (\*\*). Aquellos que no tengan marcas no fueron estadísticamente significativos, por lo que serían igual de tóxicos que el mentol.

#### 4.5 Imagen de Calcio

Se realizaron los ensayos con uno de los compuestos seleccionados con el fin de evaluar la capacidad de taquifilaxia en el canal TRPM8, el compuesto 2. El protocolo utilizado fue la administración de 3 pulsos de compuesto, intercalados por lavados con buffer HBSS. Se procedió a estudiar la taquifilaxia del canal por el mentol a 0.3 mM (Figura 17A) y por el compuesto 2 a 100  $\mu$ M (Figura 17B), y se observa que la intensidad de fluorescencia de cada uno de los picos, disminuye progresivamente. Para la experimentación se eligió al compuesto 2 entre los 3 compuestos posibles (1, 2 y 4) ya que sus efectos en animales fueron previamente demostrados por el grupo del Dr. Carlos Belmonte del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

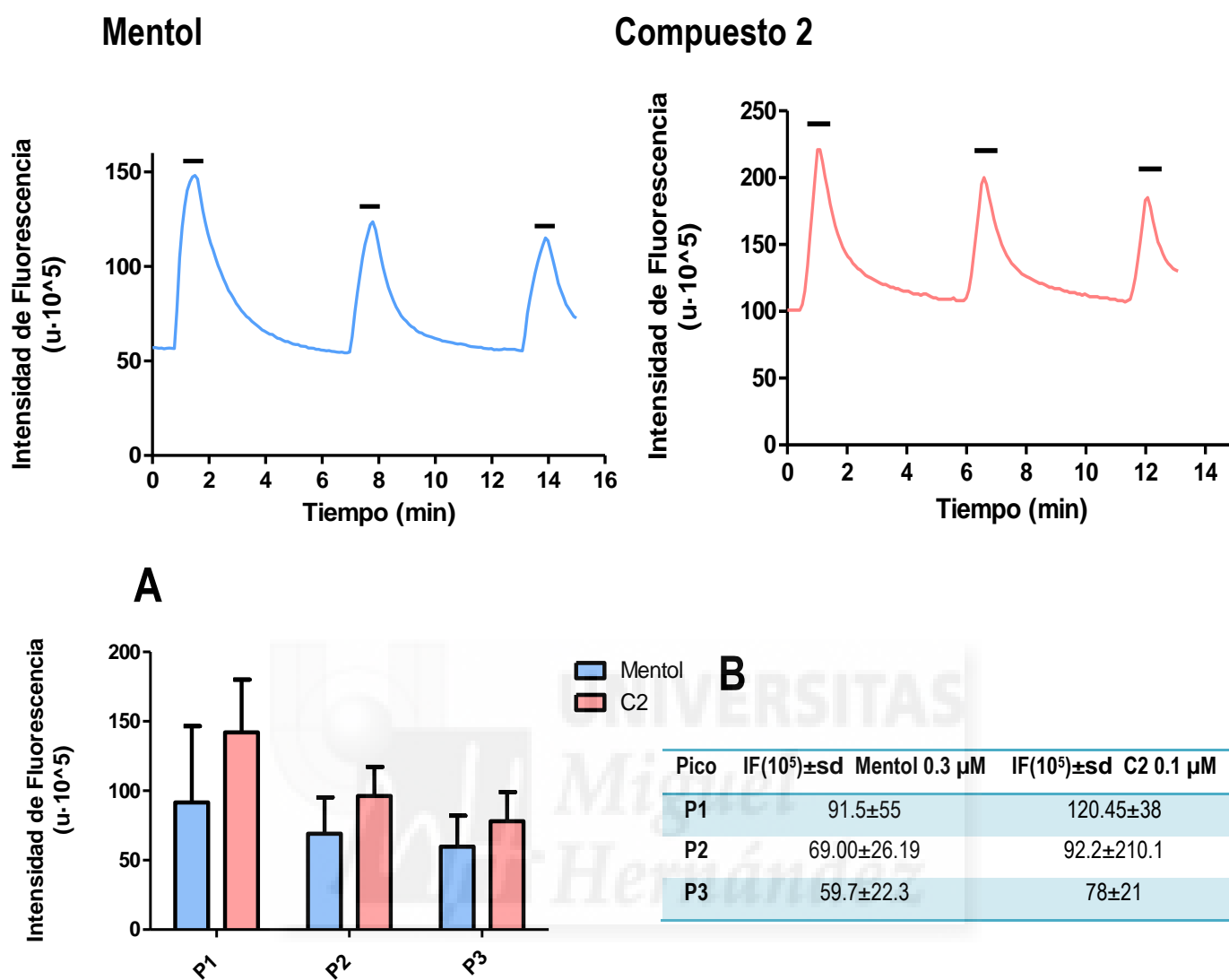


Figura 17.- **Estudio de tachyfilaxia en TRPM8. (Mentol)** La figura representa un ensayo de Imagen de Calcio en un campo de células, donde se administraron 3 pulsos de mentol 0.3 mM durante 30 segundos, con 6 minutos de buffer (HBSS 1x) entre pulsos. **(Compuesto 2)** La figura representa un ensayo de Imagen de Calcio en un campo de células, donde se administraron 3 pulsos de compuesto 2 a 100 μM durante 30 segundos, con 5 minutos de buffer (HBSS 1x) entre pulsos. **(A)** Se muestra en el diagrama, la relación entre los picos de mentol aplicados durante el ensayo. **(B)** Tabla que recoge las intensidades de fluorescencia.

#### 4.6 SAR

Se han llevado a cabo estudios de análisis de relación actividad-estructura con el fin de identificar cuáles son las posiciones atómicas que favorecen la actividad para poder diseñar específicamente compuestos químicos (Figura 18). Para ello se han tomado los porcentajes de actividad a 100  $\mu\text{M}$  con respecto al mentol 100  $\mu\text{M}$  y se han comparado las estructuras químicas de los compuestos.

Compuesto	Grupo químico	Actividad $\pm$ sd (%) a 100 $\mu\text{M}$	Compuesto	Grupo químico	Actividad $\pm$ sd (%) a 100 $\mu\text{M}$
1	A	176.85 $\pm$ 12.71	15	N	78.74 $\pm$ 51.1
2	B	143.64 $\pm$ 18.61	16	O	75.56 $\pm$ 13.25
3	C	96.88 $\pm$ 17.54	17	P	68.99 $\pm$ 7.82
4	G	119 $\pm$ 9	18	Q	93.51 $\pm$ 12.52
5	E	288.00 $\pm$ 27.21	19	R	39.39 $\pm$ 9.97
6	F	255 $\pm$ 20	20	S	69.24 $\pm$ 16.38
7	D	168.00 $\pm$ 13.09	21	T	40.30 $\pm$ 634
8	H	139.00 $\pm$ 0.83	22	U	93.27 $\pm$ 10.67
9	I	156.00 $\pm$ 13.12	23	V	54.62 $\pm$ 2.61
10	-	102.38 $\pm$ 11.26	24	W	67.25 $\pm$ 9.55
11	J	85.9 $\pm$ 46.55	25	X	58.52 $\pm$ 9.75
12	K	71.19 $\pm$ 18.60	26	Y	81.40 $\pm$ 30.64
13	L	72.24 $\pm$ 15.45	27	Z	61.35 $\pm$ 23.75
14	M	68.46 $\pm$ 32.71			

Figura 18.- **Tabla resumen con las propiedades farmacológicas de los compuestos.** Se indican los grupos químicos de los compuestos y el porcentaje de actividad a 100  $\mu\text{M}$  con respecto al mentol 100  $\mu\text{M}$  (100%).

#### 4.7 Docking

Se han realizado experimentos de docking, in silico, para estimar los residuos con los que interaccionan los compuestos. Dada sus estructuras, basadas en el esqueleto químico del mentol, se ha analizado el docking suponiendo que el sitio de unión es común con el mentol, en el que el aminoácido Y745 es el principal implicado. Tras hacer los análisis de manera global, se eligió el clustal en el que el compuesto interaccionaba con dicha tirosina, determinando a su vez cuales eran el resto de aminoácidos implicados. Posteriormente, se realizó el docking local de carácter semiflexible, con la intención de encontrar la orientación más probable, con una mejor energía de unión.

El docking global del compuesto 2, el cual presentaba mejores características farmacológicas, dio como resultado 196 clustals, de los cuales 2 interaccionaban con la Y745. Se hizo el docking local con las cadenas laterales de los residuos, K719, Y726, Y738, N741, Y745, S820 e Y826 libres. Se observó que interaccionaba con todos ellos a través de interacciones hidrofóbicas, con los aminoácidos F712, P716, W725, P734, V737, I813 y K822 y formaba puentes de

hidrógeno entre la Y826 y los nitrógenos del anillo. Los cálculos dieron lugar a 6 clustals, de los cuales se eligió la opción con una energía de unión de 7.54 Kcal/mol (Figura 19).

El docking global del compuesto 19, que presentaba la menor actividad, obtuvo 285 resultados, de los cuales 4 interaccionaban con la Y745. Se hizo el docking local con las cadenas laterales de los residuos K719, Y726, Y727, F738 e Y745 libres. En los resultados obtenidos, además de con estos residuos, la molécula interaccionaba con las cadenas laterales de los aminoácidos P716, P734, V737, N741 y L817, todos con interacciones hidrofóbicas y con la Y745 por un puente de hidrógeno. Los cálculos obtenidos fueron de 10 clustals, de los cuales se eligió la opción con energía 6.83 Kcal/mol (Figura 20).

Los aminoácidos P716, K719, Y726, P734, V737, F738, N741 e Y745 son comunes en los resultados de docking de ambos compuestos. Los aminoácidos F712, W725, I813, S820, K822 e Y826 solo interaccionan con el compuesto 2, mientras que los aminoácidos Y727 y L817 interaccionan con el compuesto 19. En ambos tiene lugar la formación de puentes de hidrógeno con la Y826 y con la Y745, respectivamente, y sus energías de unión son diferentes, siendo la del compuesto 2 mayor que la del compuesto 19.

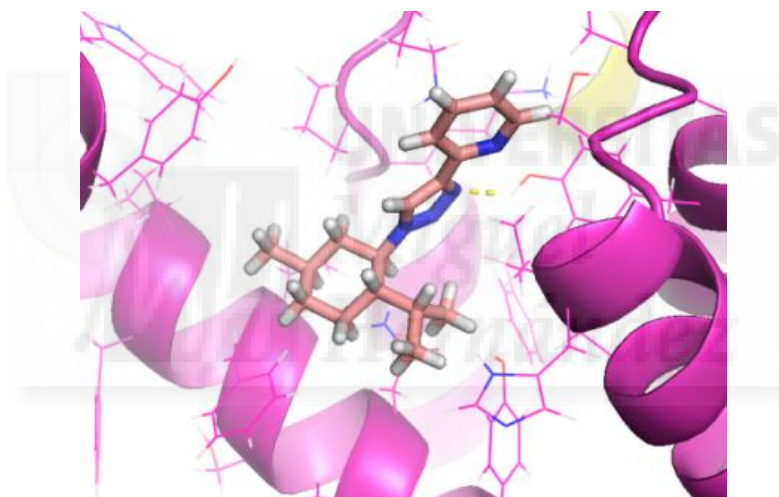


Figura 19.- **Resultado Docking.** Resultado docking local para el compuesto 2.

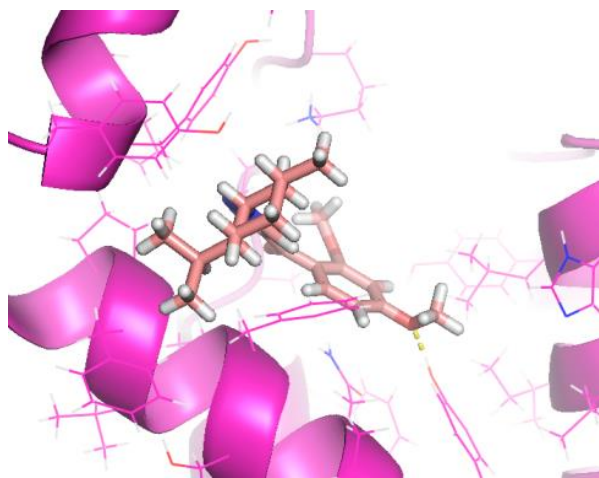


Figura 20.- **Resultado Docking.** Resultado docking local para el compuesto 19.

Se realizaron los ensayos de docking para los compuestos candidatos, 1, 2 y 4, y para los compuestos que menor actividad presentaban a 100  $\mu$ M, compuestos 19, 21, 23 y 25, determinándose la energía de unión y los aminoácidos con los que interaccionan cada uno de ellos (Figura 21).

Compuesto	1	2	4	19	21	23	25
E. unión (Kcal/mol)	8,06	7,54	8,33	6,83	6,53	6,77	6,16
Aminoácidos con los que interaccionan	F712	F712				F712	
	K715		K715		K715	K715	K715
	P716	P716		P716		P716	P716
	K719	K719		K719			K719
		W725	W725				
		Y726	Y726	Y726		Y726	Y726
				Y727			
		P734	P734	P734			
					F735		
	V737	V737	V737	V737			V737
	F738	F738	F738	F738	F738	F738	F738
	N 741	N741		N741		N741	
					V742	V742	V742
	Y745	Y745	Y745	Y745*	Y745*	Y745	Y745
		I813					
	L817		L817	L817	L817	L817	L817
	S820	S820					
		K822					
	Y826	Y826*	Y826				Y826
						V830	

Figura 21.- **Tabla resumen con las energías de unión (Kcal/mol) y los aminoácidos que interaccionan con los compuestos.** Se marcan (\*) aquellos aminoácidos con los que interaccionaban los compuestos con puentes de hidrógeno. Los compuestos 1, 2 y 4 son aquellos candidatos con mayor potencial farmacológico, y los compuestos 19, 21, 23 y 25 los que menor actividad presentaban a 100  $\mu$ M

#### 4.8 Ensayos in vivo

Basándonos en el papel del canal TRPM8 en la patología asociada al ojo seco [26] se consideró oportuno probar el efecto agonista de uno de los compuestos seleccionados sobre el lagrimeo en un modelo animal. Se usaron cobayas para determinar si la exposición ocular al compuesto daba lugar a un aumento en el lagrimeo [26]. Se utilizaron hilos de rojo fenol, aplicado en el canto nasal del párpado inferior durante 30 segundos, midiendo la distancia en mm que recorre la lágrima. Se probaron a 10  $\mu$ M los compuestos WS-12 y 2, uno de los compuestos con potencial farmacológico, y mentol a 200  $\mu$ M (Figura 22) [34]. Los procedimientos fueron realizados por el grupo del Dr. Carlos Belmonte del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

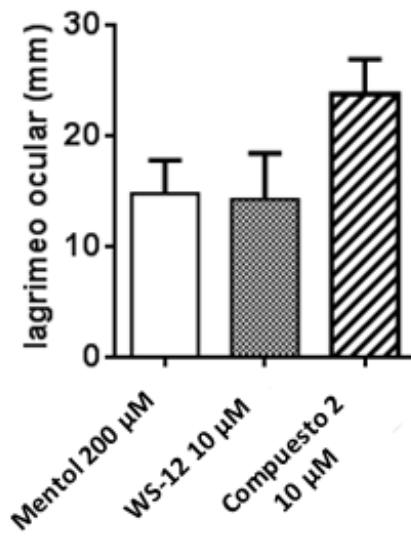


Figura 22.- **Representación gráfica de los resultados de lagrimeo en cobayas.** Se presentan los resultados del mentol a 200 µM y de los compuestos WS-12, 2, a 10 µM.



## 5. Discusión

### 5.1 Cribado de compuestos, ensayos de especificidad y caracterización de la potencia.

El cribado de alto rendimiento (HTS) se ha realizado empleando técnicas fluorimétricas basadas en sondas de calcio, que permiten caracterizar y determinar el potencial farmacológico de los compuestos estudiados. En este trabajo se han cribado 27 compuestos derivados del mentol, todos ellos agonistas del canal y de los cuales los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 fueron elegidos para continuar su caracterización dado que presentaban una actividad mayor que la del mentol a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Los compuestos 5, 6, 7, 8 y 9 fueron descartados como posibles moléculas con potencial farmacológico, dado que la actividad observada se mantenía en presencia del antagonista del canal: AMTB, sugiriendo que los compuestos podrían actuar de forma inespecífica o bien estarían alterando la permeabilidad de la membrana.

Los ensayos de especificidad en células de neuroglioblastoma humano transfectado con TRPV1 determinaron que los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, activaban el canal y además, la actividad era bloqueada en presencia de rojo rutenio, antagonista de TRPV1. A pesar de ello, las actividades máximas obtenidas no superaban el 40%, por lo que fueron descartados como posibles moduladores del canal TRPV1, y considerados específicos de TRPM8. La actividad que presentaba el compuesto 9 no era bloqueado por el antagonista, por lo que también quedó descartado como posible modulador de TRPV1.

Adicionalmente, se calculó el valor de la EC50 de los compuestos normalizando al 100% de su respuesta, para conocer la potencia de cada uno de ellos. En todos los casos, la EC50 es menor que la del mentol concluyéndose que los 9 compuestos son más potentes que el mentol, cuya EC50 es 100  $\mu\text{M}$ . El más potente de ellos resultó ser el compuesto 4 ( $0.14 \pm 1.62 \mu\text{M}$ ), seguido de los compuestos 2 ( $18.83 \pm 1.83 \mu\text{M}$ ) y 1 ( $20.02 \pm 1.69 \mu\text{M}$ ), también candidatos con gran potencial farmacológico y los compuestos 9 ( $20.06 \pm 2.02 \mu\text{M}$ ) y 7 ( $25.79 \pm 2.07 \mu\text{M}$ ), anteriormente descartados.

Esta técnica ha demostrado tener alta sensibilidad para la identificación de moduladores de TRPM8 y la capacidad de detectar los falsos positivos. Su reproducibilidad se ve reflejada en las pequeñas desviaciones obtenidas y en los valores Z determinados en cada experimento, siempre superiores al 0.5, lo que implica que la relación señal/ruido es muy alta. Sin embargo, debe acudir a técnicas electrofisiológicas para continuar el estudio y determinar otras características farmacológicas, como el mecanismo de actuación y las cinéticas de apertura y cierre del canal.

### 5.2 Evaluación de la citotoxicidad

Los análisis estadísticos realizados en los resultados de los ensayos de viabilidad celular en HEK-TRPM8, permitieron definir las diferencias significativas comparando la muerte celular de los compuestos a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  con la del mentol a 100  $\mu\text{M}$ . En todos los casos la citotoxicidad observada por parte de los compuestos era significativamente menor que la provocada por el mentol. Este hecho hace que los compuestos sean de gran interés, dado que las propiedades citotóxicas del mentol se ven mejoradas.



En lo que respecta a los ensayos de citotoxicidad en HEK, se demostró que el compuesto 3 era significativamente más tóxico para las células que el mentol, por lo que quedó descartado. Los compuestos 1, 2 y 8 resultaron ser igual de tóxicos para las HEK que el mentol, por lo que no se mejora en toxicidad, pero tampoco quedan descartados. En el caso de los compuestos 4, 5, 6, 7 y 9, la toxicidad era significativamente menor que la del mentol en estas células.

### 5.3 Imagen de Calcio

Los protocolos seguidos en los ensayos de Imagen de calcio se describen en el apartado 4.5 de Resultados. Los ensayos de Imagen de calcio se llevaron a cabo con el mentol y con el compuesto 2, con la intención de observar la capacidad de inducir taquifilaxia en el canal TRPM8. El experimento reveló que el mentol a 100  $\mu\text{M}$  tenía una intensidad de fluorescencia en los picos menor que la del compuesto 2 a 100  $\mu\text{M}$ , demostrando la potencia del compuesto 2 frente al mentol. Paralelamente, se observa que el compuesto 2 tiene la capacidad de producir taquifilaxia, siendo los tiempos para llegar a la fluorescencia basal menores que la del mentol. Consecuentemente, el compuesto 2 sería un candidato con potencial farmacológico que, gracias a la capacidad de inducir taquifilaxia, podría utilizarse como modulador negativo del canal TRPM8. Los ensayos de taquifilaxia en los compuestos 1 y 4 serían relevantes, para continuar la determinación de sus potenciales farmacológicos.

### 5.4 SAR

En lo que respecta a los análisis función-estructura, se relacionaron las estructuras de los sustituyentes de los compuestos y los datos obtenidos en la experimentación.

Se ha demostrado que los sustituyentes basados en cadenas alquílicas (Compuestos 8 y 9) o en un grupo cetona que introduce a un grupo fenilo (Compuestos 3, 5, 6 y 7) no son adecuados para el desarrollo farmacológico de activadores de TRPM8 ya que resultaron no ser específicos sobre el canal al no ser bloqueables por AMTB o ser tóxicos (Figura 23 y 24).

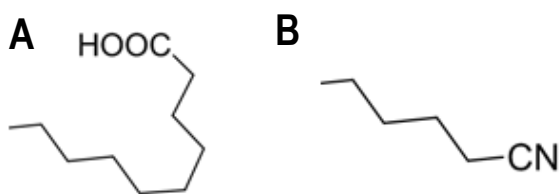


Figura 23.- Estructuras químicas de los sustituyentes del compuesto 8 (A) y del compuesto 9 (B).

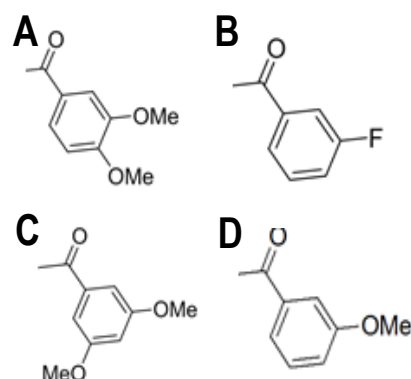


Figura 24.- Estructuras químicas de los sustituyentes de los compuestos 3 (A), 5 (B), 6 (C) y 7 (D).

Los sustituyentes representados en la figura 25 tienen en común la presencia de dos bencenos enlazados de diferentes modos (Compuestos 14, 15, 16, 18 y 21), estructuras que quedan descartadas como base para sintetizar moduladores del canal por presentar una actividad a 100  $\mu\text{M}$  menor que la del mentol.

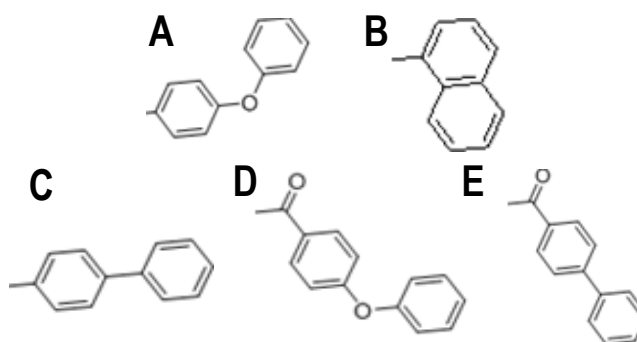


Figura 25.- Estructura química de los sustituyentes de los compuestos 14 (A), 15 (B), 16 (C), 18(D) y 21 (E)

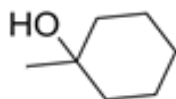


Figura 26.- Estructura química del sustituyente del compuesto 4.

El sustituyente basado en un grupo hidroxi-ciclohexano (Compuesto 4) tiene estructura diferente a los demás. La actividad observada en el canal en su presencia es similar a la del mentol y la toxicidad es menor que la de este, por lo que sería una buena base para diseñar nuevos compuestos activadores del canal TRPM8 (Figura 26).

Los compuestos cuyos sustituyentes se basan en un grupo fenil y piridina promueven una actividad en el canal mayor que la del mentol, presentan menor toxicidad en HEK-TRPM8 y toxicidad parecida en HEK que la de este, (Compuestos 1 y 2, Figura 27). Las estructuras químicas son parecidas entre sí, diferenciándose en la presencia de un nitrógeno en el anillo. Se concluye que estos sustituyentes son buenas bases para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial farmacológico que modulen la actividad de TRPM8.

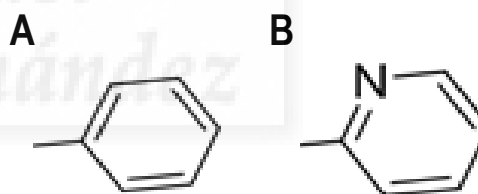


Figura 27.- Estructura química de los sustituyentes de los compuestos 1 (A) y 2 (B)

### 5.5 Docking

El docking realizado se llevó a cabo con el programa YASARA, permitiendo determinar los posibles sitios de unión de los compuestos y las interacciones que tenía lugar. Para realizar el análisis de los resultados se tuvo en cuenta la Y745, aminoácido establecido como crítico para la activación de TRPM8 por mentol [13, 17].

Se trata de estimar la estructura del compuesto que permite una mejor interacción con el canal y aquellos aminoácidos que permiten una mejor unión con los compuestos. Mediante la comparación de los resultados de docking, tanto las energías de unión, como de los aminoácidos implicados en la interacción y los resultados experimentales, se pueden conocer los aminoácidos que intervienen en la interacción con los compuestos. Se ha realizado una tabla (Figura

28) en la que se plasman los aminoácidos que interaccionan con los compuestos que tienen un mayor potencial farmacológico, compuestos 1, 2 y 4 (Candidatos), con algunos que fueron excluidos de la selección, compuestos 19, 21, 23 y 25 (Descartados) y aquellos que interaccionaban con compuestos tanto del grupo de los “Candidatos” como de los “Descartados” (Comunes).

Solo 3 de los 7 compuestos forman puentes de hidrógeno, siendo el compuesto 2 con la Y826 y los compuestos 19 y 21 con la Y745. Las energías de unión rondan las 8 Kcal/mol en los compuestos 1, 2 y 4, relacionados con una mayor actividad y con gran potencial farmacológico, mientras que en el caso de los compuestos 19, 21, 23 y 25 son cercanas a 6.5 Kcal/mol.

Comunes			Candidatos		Descartados	
F712	K715	P716	W725	(C2 y C4)	Y727	(C19)
K719	Y726	P734	I813	(C2)	Y735	(C21)
V737	F738	N741	S820	(C1 y C2)	V742	(C21, C23 y C25)
Y745	L817	Y826	K822	(C2)	V830	(C23)

Figura 28.- **Tabla resumen de los resultados del docking.** Aparecen los aminoácidos que interaccionaban con compuestos de ambos grupos (Comunes), con los compuestos 1, 2 y/o 4 (Candidatos) y con los compuestos 19, 21, 23 y/o 25 (Descartados).

## 5.6 Ensayos in vivo

Con respecto la experimentación animal realizada, se observa en los resultados que el compuestos 2 estimula más el lagrimeo que el mentol, a una concentración 20 veces menor. Estas evidencias determinan que el compuesto 2 es una molécula con gran potencial farmacológico y con alta probabilidad de funcionar en humanos, aunque sería necesario continuar con la experimentación. Haciendo los ensayos pertinentes, podría realizarse los estudios en Fase Clínica y llegar al mercado como tratamiento para el ojo seco.

Dado el diseño del protocolo experimental, en el que hay una única aplicación del compuesto, no puede verse el efecto de taquifilaxia del canal. Es por ello, que sería de notable importancia realizar ensayos en animales para determinar si sería posible una estrategia de tratamiento con este compuesto, con la intención de no observar efecto de taquifilaxia, y definir la utilidad del compuesto como activador. Por otra parte, es relevante la experimentación en modelos animales de dolor y cáncer, donde el mecanismo de acción del tratamiento estaría basado en la capacidad de producir taquifilaxia, y de nuevo, diseñar el protocolo para tratar de utilizar el efecto como tratamiento.

## **6. Conclusiones y proyección futura**

En este estudio se han cribado 27 compuestos derivados del mentol, de los cuales el que mejores propiedades farmacológicas presenta es el Compuesto 2, con una actividad del  $143.64 \pm 18.60\%$  a  $100 \mu\text{M}$  y  $\text{EC}_{50} 18.83 \pm 1.83 \mu\text{M}$ , una toxicidad baja y, adicionalmente, es un potencial modulador negativo de TRPM8, gracias a la inhibición ejercida por el efecto de taquifilaxia en el canal. En consecuencia, se concluye que el mentol es una buena base para crear nuevos compuestos con mejores características farmacológicas.

La relación entre estructura-actividad es actualmente poco conocida, por lo que en el presente estudio se determina, además de las características farmacológicas, las formas químicas que favorecen o no a la activación del canal TRPM8. Para identificar los grupos químicos que proporcionan esta información, se han analizado todos los compuestos del ensayo, considerando las diferencias en los porcentajes de activación a  $100 \mu\text{M}$ . Finalmente se estableció que los compuestos con mejores propiedades tenían un sustituyente basado en el benceno o piridina, y que la estructura química introducida por un grupo cetona, seguida de un fenil disustituido, no es una buena base para el diseño de las moléculas.

A su vez, se han estimado los posibles sitios de unión de dichos compuestos en el canal TRPM8 gracias a programas de simulación de Modelado Molecular. Tras identificar los residuos que interactuaban con los compuestos, en el sitio de unión a mentol (Y745), se realizó un docking local, de carácter semi-flexible, para determinar la orientación correcta del ligando con respecto al canal. El compuesto 2 presentó una energía de unión alta con respecto a la del compuesto 19, con menor porcentaje de actividad a  $100 \mu\text{M}$ .

Gracias a toda la información obtenida, se puede determinar el farmacóforo idóneo para el sitio de unión a mentol que activa al canal. La caracterización concreta de los grupos químicos que favorecen la actividad y disminuyen la toxicidad con respecto al mentol permite diseñar de manera específica nuevos compuestos con mejores propiedades farmacológicas y probarlos en laboratorio, con la intención de mejorar las propiedades farmacológicas.

Una vez caracterizados los mejores compuestos, se podrían realizar ensayos de electrofisiología que permitieran determinar las cinéticas de apertura y cierre y el comportamiento de los compuestos, es decir, si son reguladores alostéricos, competitivos o no competitivos. Adicionalmente, sería fundamental hacer ensayos de toxicidad que descarten cualquier posible efecto en cardiomiocitos y en neuronas, con el fin de no desarrollar fármacos que puedan afectar directamente a las funciones vitales. También sería imprescindible determinar la toxicidad en queratinocitos, para las aplicaciones tópicas del compuesto en el caso de analgésicos locales.

Para finalizar, se podrían hacer ensayos en animales con otras moléculas con potencial farmacológico en el presente estudio. En este caso, se hicieron pruebas en animales para determinar la reversión del ojo seco, pero sería de notable importancia continuar los estudios y realizar ensayos en otros modelos animales, como de dolor o de cáncer, para observar los efectos de analgesia y quimioterapéuticos.

## 7. **Bibliografía**

1. Frolov, R. V., & Weckstrom, M. (2015). Harnessing the Flow of Excitation: TRP, Voltage-Gated Na<sup>+</sup>, and Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels in Contemporary Medicine. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 103, 25–95. <http://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.11.001>
2. McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58. <http://doi.org/10.1038/nature719>
3. Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., ... Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5), 705–715. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)
4. Reid, G. (2005). ThermoTRP channels and cold sensing: What are they really up to? *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 451(1), 250–263. <http://doi.org/10.1007/s00424-005-1437-z>
5. Bidaux, G., Sgobba, M., Lemonnier, L., Borowiec, A. S., Noyer, L., Jovanovic, S., ... Haider, S. (2015). Functional and Modeling Studies of the Transmembrane Region of the TRPM8 Channel. *Biophysical Journal*, 109(9), 1840–1851. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.027>
6. Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T., & Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(8), 601–20. <http://doi.org/10.1038/nrd3456>
7. Yoo, S., Lim, J. Y., & Hwang, S. W. (2014). Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. *Molecules*, 19(4), 4708–4744. <http://doi.org/10.3390/molecules19044708>
8. Andersson, D. A., Chase, H. W. N., & Bevan, S. (2004). TRPM8 Activation by Menthol, Icilin, and Cold Is Differentially Modulated by Intracellular pH. *The Journal of Neuroscience*, 24(23), 5364–5369. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0890-04.2004>
9. Chuang, H. H., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*, 43(6), 859–869. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.038>
10. Viana, F., de la Peña, E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature Neuroscience*, 5(3), 254–260. <http://doi.org/10.1038/nn809>
11. Reid, G., & Flonta, M. L. (2002). Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neuroscience Letters*, 324(2), 164–168. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00181-7](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00181-7)
12. Thut, P. D., Wrigley, D., & Gold, M. S. (2003). Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience*, 119(4), 1071–1083. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00225-2](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00225-2)
13. Latorre, R., Brauchi, S., Madrid, R., & Orio, P. (2011). A Cool Channel in Cold Transduction. *Physiology*, 26(4), 273–285. <http://doi.org/10.1152/physiol.00004.2011>
14. McKemy, D. D. (2005). How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Molecular Pain*, 1, 16. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-1-16>
15. Simone, D. a, & Kajander, K. C. (1997). Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *Journal of Neurophysiology*, 77(4), 2049–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114254>
16. Anatomy of the Sensory System , University of Queen's, School of Medicine
17. Babes, A., Ciobanu, A. C., Neacsu, C., & Babes, R.-M. (2011). TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve endings. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), 78–88. <http://doi.org/10.2174/138920111793937835>
18. Brauchi, S. (2006). A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4835–4840. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-05.2006>

19. Phelps, C. B., & Gaudet, R. (2007). The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36474–36480. <http://doi.org/10.1074/jbc.M707205200>
20. Rohács, T., Lopes, C. M. B., Michailidis, I., & Logothetis, D. E. (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature Neuroscience*, 8(5), 626–634. <http://doi.org/10.1038/nn1451>
21. Proudfoot, C. J., Garry, E. M., Cottrell, D. F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D. C. Mitchell, R. (2006). Analgesia Mediated by the TRPM8 Cold Receptor in Chronic Neuropathic Pain. *Current Biology*, 16(16), 1591–1605. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.061>
22. Liu, Z., Wu, H., Wei, Z., Wang, X., Shen, P., Wang, S. Lu, Y. (2016). TRPM8: a potential target for cancer treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1–11. <http://doi.org/10.1007/s00432-015-2112-1>
23. Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L. Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150), 204–208. <http://doi.org/10.1038/nature05910>
24. Lippoldt, E. K., Elmes, R. R., McCoy, D. D., Knowlton, W. M., & McKemy, D. D. (2013). Artemin, a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Member, Induces TRPM8-Dependent Cold Pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(30), 12543–12552. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5765-12.2013>
25. Asuthkar, S., Demirkhanyan, L., Sun, X., Elustondo, P. A., Krishnan, V., Baskaran, P. Zakharian, E. (2015). The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), 2670–2688. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.610873>
26. Kurose, M., & Meng, I. D. (2013). Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *Journal of Neurophysiology*, 110(2), 495–504. <http://doi.org/10.1152/jn.00222.2013>
27. Belmonte C., Acosta, M. C., Merayo-Llodes, J., Gallar, J. (2015) What causes Eye Pain? *Current ophthalmology reports*. 3(2), 111-121
28. Sherkheli, M. A., Vogt-Eisele, A. K., Bura, D., Beltrán Márques, L. R., Gisselmann, G., & Hatt, H. (2010). Characterization of selective trpm8 ligands and their structureactivity response (s.a.r) relationship. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 242–253.
29. Sherkheli, M. A., Gisselmann, G., Vogt-Eisele, A. K., Doerner, J. F., & Hatt, H. (2008). Menthol derivative WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 370–378.
30. Temporelli, P. L., Zito, G. B., Pedretti, R. F., Belisarii, F. I., Putorti, G., & Faggiano, P. (2014). [Nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAID) and risk of cardiovascular events. Literature review and clinical implications]. *Monaldi Archives for Chest Disease = Archivio Monaldi per Le Malattie Del Torace / Fondazione Clinica Del Lavoro, IRCCS [and] Istituto Di Clinica Tisiologica E Malattie Apparato Respiratorio, Universita Di Napoli, Secondo Ateneo*, 82(3), 165–170.
31. Vane, J. R., Botting, R. M., & Kingdom, U. (1860). Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, 9343(98).
32. Angelova, S. G., Krasteva, M. E., Gospodinova, Z. I., & Georgieva, E. I. (2012). Electroneurography in the evaluation of oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer patient. *Neoplasma*, 59(6), 622–630. <http://doi.org/10.4149/neo>
33. Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](http://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
34. Carmen Acosta, M., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2014). Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(6), 3403–3412. <http://doi.org/10.1167/iovs.13-13774>