



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Identificación y caracterización de nuevos moduladores del canal iónico TRPV1 basados en la técnica PROTAC

Realizado por

Lucía Villena Martínez

Dirigido por

Asia Fernández Carvajal

Laura Butrón García

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Área de Bioquímica y Biología Molecular

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

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CURSO 2024 – 2025

RESUMEN

Los receptores de potencial transitorio (TRP) son una superfamilia de canales iónicos multifuncionales permeables a una gran variedad de cationes, y cuya activación puede darse por estímulos físicos (temperatura, voltaje, presión y tensión) y químicos. En los últimos años han sido estudiados en profundidad debido a su implicación en numerosas patologías, como trastornos cardiovasculares, cáncer o dolor crónico. Dentro de la subfamilia TRPV, el canal iónico TRPV1 posee una enorme importancia por su polimodalidad y su implicación en enfermedades ampliamente distribuidas, siendo por tanto uno de los más estudiados como posible diana terapéutica. En este contexto, los compuestos PROTAC, encargados de inducir la degradación de proteínas, podrían ser uno de los tratamientos más prometedores para inhibir la actividad patológica de TRPV1. Por todo ello, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto de ocho compuestos PROTAC sobre TRPV1, realizando un cribado inicial para estudiar cuales de ellos pueden resultar más prometedores. Además, se realizaron ensayos de permeabilización de la membrana y citotoxicidad para descartar posibles efectos nocivos. Por último, se realizó un ensayo de detección y cuantificación proteica, Western Blot, optimizando previamente el protocolo. En conjunto, bajo las condiciones ensayadas, no se pudo determinar que los compuestos indujeran la degradación del canal.

ABSTRACT

Transient receptor potential (TRP) channels are a superfamily of multifunctional ion channels permeable to a wide variety of cations, whose activation can occur in response to physical (temperature, voltage, pressure, and tension) and chemical stimuli. In recent years, they have been studied extensively due to their involvement in numerous pathologies, such as cardiovascular disorders, cancer, and chronic pain. Within the TRPV subfamily, the ion channel TRPV1 is of great importance due to its polymodality and its involvement in widely distributed diseases, making it one of the most studied targets for potential therapeutic intervention. In this context, PROTAC compounds, which induce protein degradation, could represent one of the most promising treatments to inhibit the pathological activity of TRPV1. For this reason, the present project investigated the effect of eight PROTAC compounds on TRPV1, performing an initial screening to identify the most promising candidates. In addition, membrane permeability and cytotoxicity assays were conducted to rule out possible adverse effects. Finally, a protein detection and quantification assay, Western Blot, was performed, after first optimizing the protocol. Overall, under the conditions tested, it was not possible to demonstrate that the compounds induced channel degradation.

Palabras clave: TRPV1; PROTAC; degradación proteica; cribado de compuestos; citotoxicidad; Western Blot

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Superfamilia TRP.....	1
1.2	Subfamilia TRPV	3
1.2.1	TRPV1	4
1.3	Implicación de TRPV1 en condiciones patológicas	6
1.4	Estrategias de degradación dirigida de proteínas (DDP)	8
1.4.1	Compuestos PROTAC	9
2	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
3	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1	Cultivos celulares	13
3.2	Compuestos ensayados	13
3.3	Ensayos fluorimétricos.....	14
3.4	Ensayo de viabilidad celular.....	16
3.5	Ensayos de detección y cuantificación proteica: Western Blot	16
3.5.1	Análisis cuantitativo	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1	Ensayos fluorimétricos.....	19
4.1.1	Cribado de compuestos.....	20
4.1.2	Evaluación de compuestos como agonistas	22
4.2	Ensayo de viabilidad celular.....	23
4.3	Ensayo de detección y cuantificación proteica: Western Blot.....	24
5.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	28
	BIBLIOGRAFÍA.....	29
	ANEXOS	36
1.	Protocolo Western Blot inicial.....	36

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ARD: anquirina

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

CaM: calmodulina

CaMKII: Ca²⁺/Calmodulina quinasa II

CIPN: neuropatía periférica inducida por quimioterapia

CPS: capsaicina

DDP: degradación dirigida de proteínas

DPN: neuropatía periférica diabética

DRG: ganglio de la raíz dorsal

FBS: suero fetal bovino

IMIDs: fármacos inmunomoduladores de estructura imida

MetAP-2: metionina aminopeptidasa 2

MTT: bromuro de 3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – ilo) – 2,5 – difeniltetrazol

NGF: factor de crecimiento nervioso

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PIP2: fosfatidilinositol – bifosfato

POI: proteína de interés

PROTAC: *proteolysis targeting chimera*

RR: rojo rutenio

ROS: especies reactivas de oxígeno

RTX: resiniferatoxina

SDS – PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

SNIPERs: *specific and nongenetic inhibitor of apoptosis protein – dependent protein erasers*

SNC: sistema nervioso central

TG: ganglios trigéminos

TRP: receptor de potencial transitorio

TRPA: receptor de potencial transitorio de anquirina

TRPC: receptor de potencial transitorio canónico

TRPM: receptor de potencial transitorio de melastatina

TRPP: receptor de potencial transitorio de policistina

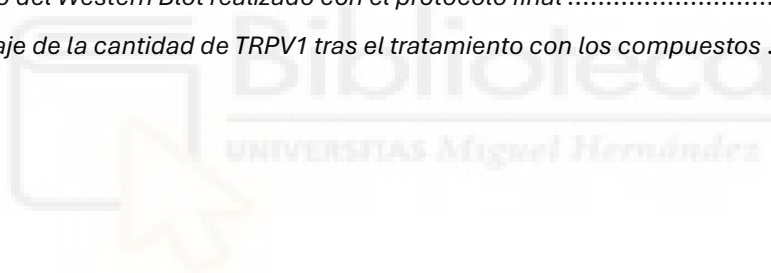
TRPML: receptor de potencial transitorio de mucolipina

TRPV: receptor de potencial transitorio vanilloide

UPS: Sistema ubiquitina – proteasoma

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de un canal de la familia TRP	2
Figura 2. Representación esquemática de la estructura del canal iónico TRPV1 y sus sitios de interacción	5
Figura 3. Unión de la capsaicina y TRPV1	5
Figura 4. Esquema representativo de los mecanismos DDP	8
Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de los PROTACs	10
Figura 6. Representación de la actividad del canal TRPV1 en presencia de capsaicina y rojo rutenio.....	19
Figura 7. Curvas dosis-respuesta de la capsaicina y el rojo rutenio sobre el canal TRPV1	20
Figura 8. Representación del incremento de la fluorescencia en el cuarto ciclo.....	21
Figura 9. Cribado de compuestos en TRPV1	21
Figura 10. Actividad del canal TRPV1 en presencia de los compuestos candidatos y rojo rutenio	22
Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular (MTT) en células HEK-hTRPV1	23
Figura 12. Revelado del Western Blot realizado con el protocolo inicial.....	24
Figura 13. Resultados del Western Blot de TRPV1 tras la modificación del protocolo inicial.....	25
Figura 14. Resultados del Western Blot de TRPV1 tras la optimización	26
Figura 15. Revelado del Western Blot realizado con el protocolo final	26
Figura 16. Porcentaje de la cantidad de TRPV1 tras el tratamiento con los compuestos	27



1. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten y regulan el flujo de iones a través de ella, actividad que está modulada por diferentes estímulos fisiológicos y ambientales. En particular, TRPV1 es un canal iónico perteneciente a la superfamilia TRP que participa en la detección de estímulos como el calor nocivo y los compuestos picantes, regulando la percepción del dolor. En condiciones patológicas, su sobreactivación amplifica la sensibilidad al dolor, contribuyendo a la aparición del dolor crónico. Por este motivo, TRPV1 se ha convertido en una diana terapéutica cuyo objetivo es modular su actividad. En este contexto, los compuestos PROTAC podrían inducir la degradación selectiva de TRPV1 y, así, reducir la hiperalgesia (Huang et al., 2024).

1.1 Superfamilia TRP

Los receptores de potencial transitorio (TRP) son una superfamilia de canales iónicos multifuncionales, permeables a una gran variedad de cationes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ (Zhang et al., 2023). Estos canales constituyen una de las familias de canales iónicos más amplias y están presentes en muchos tipos celulares de los organismos eucariotas. Además, cada célula puede expresar uno o varios tipos de canales TRP, aspecto fundamental para la adaptación de la respuesta celular a diversos estímulos, ya que cada uno posee unas características moleculares y estructurales específicas.

La mayoría de estos canales iónicos se pueden activar tanto por estímulos físicos (temperatura, voltaje, presión y tensión) como químicos (Koivisto et al., 2022), y desempeñan una función esencial en numerosos procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la transmisión sensorial, la percepción térmica (termocepción), la detección del dolor (nocicepción) y la regulación de la proliferación celular (Y. Liu et al., 2023). Por tanto, en condiciones patológicas, los canales TRP disfuncionales pueden contribuir a la aparición de dolor crónico y neuropático, inflamación, trastornos cardiovasculares, cáncer o enfermedades neurodegenerativas.

Los canales TRP fueron propuestos por primera vez en 1969, tras identificar un mutante de *Drosophila melanogaster* que mostraba una respuesta transitoria en lugar de prolongada a los estímulos de luz continua (Cosens & Manning, 1969). Sin embargo, no fue hasta 1975 cuando se denominó “*transient receptor potential*” (*trp*) al mutante en base a su fenotipo electrofisiológico (Minke et al., 1975). Más tarde, estudios genéticos y electrofisiológicos identificaron que estos canales eran los responsables de la despolarización de la membrana de las células fotorreceptoras en respuesta a la luz, por lo que la ausencia de una copia funcional del gen *trp* generaba esa respuesta temporal y la posterior insensibilización de los canales (Montell & Rubin, 1989). En 1995 se propuso que estas proteínas también se encontraban en células de organismos vertebrados, informando poco después de la primera secuencia completa de un homólogo humano (Petersen et al., 1995; Zhu et al., 1995).

Desde su descubrimiento se han descrito 28 tipos de canales TRP en mamíferos, agrupados según la homología de secuencia en seis subfamilias: receptor de potencial transitorio vanilloide (TRPV), anquirina (TRPA), canónico (TRPC), melastatina (TRPM), polycistina (TRPP) y mucolipina (TRPML) (Y. Liu et al., 2023). Cabe destacar que los miembros pertenecientes a una misma subfamilia no necesariamente poseen las mismas o similares funcionalidades.

Basándose en las diferencias topológicas y de secuencia, se ha realizado una clasificación de estas subfamilias en dos grupos. Las del grupo 1, que incluyen a TRPC, TRPV, TRPM, TRPA y TRPN, son las que poseen una mayor homología con el miembro fundador, el TRP de *Drosophila* o TRPC. Por otro lado, el grupo 2 está formado por las subfamilias TRPP y TRPML y están distantemente relacionadas con las del grupo 1 (Venkatachalam & Montell, 2007).

Respecto a sus características estructurales clave, los canales TRP poseen 4 subunidades, cada una formada por seis hélices α transmembrana (S1-S6), donde los dominios S5 y S6, junto con el *loop* situado entre ambos, forman el poro del canal, y cuya selectividad varía entre las diferentes isoformas TRP (Figura 1). La región formada por los dominios S1-S4 es la encargada de la detección y respuesta a estímulos, ya sean cambios en el voltaje (no todos los TRP son sensibles al voltaje), interacciones con ligandos y/o estímulos físicos. Tanto el extremo C como el N se encuentran en el interior celular y es el extremo citoplasmático de la hélice S6 el responsable de formar la compuerta, encargada de regular la entrada de los cationes. Con la excepción de los canales TRPM, los TRP del grupo 1 poseen un dominio de repetición de anquirina (ARD) en el extremo N – terminal. La mayoría de los canales TRP son funcionales como homotetrámeros, pero en ocasiones se ha observado heteromultimerización (Diver et al., 2022; Venkatachalam & Montell, 2007; Zhang et al., 2023).

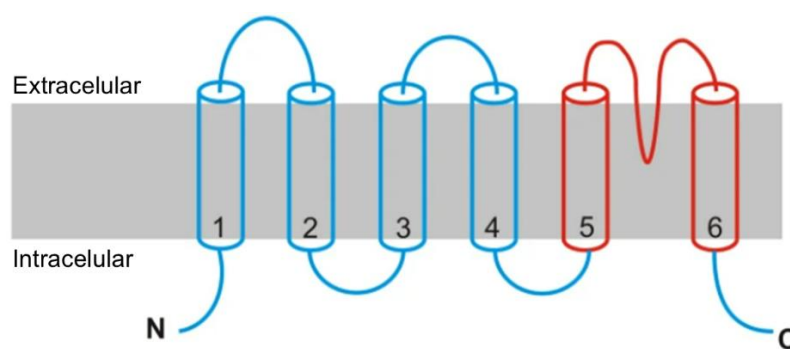


Figura 1. Estructura general de un canal de la familia TRP. Se muestra un esquema representativo con seis segmentos transmembrana (S1–S6), con los extremos N- y C-terminal localizados en el citoplasma. El segmento entre S5 y S6 (en rojo) forma la región del poro del canal (Kalia & Swartz, 2013).

Además de sus funciones sensoriales, los canales TRP están implicados en procesos celulares como la migración, la señalización intracelular y la homeostasis del calcio (Nilius & Owsianik, 2011). Estos canales se encuentran altamente conservados, lo que resalta su relevancia biológica en la adaptación

celular a estímulos ambientales (Peng et al., 2015). Asimismo, su regulación es compleja y está influida por lípidos de membrana como el PIP_2 , que puede modular su actividad de forma positiva o negativa según el tipo de canal y el contexto celular (Rohacs, 2014). Por ejemplo, en canales como TRPM8 y TRPV1, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) puede estabilizar el estado abierto o, en otros casos, inhibirlo. Además, la hidrólisis de PIP_2 mediada por receptores acoplados a proteínas G puede provocar la inactivación del canal, integrando señales extracelulares con la actividad iónica. Debido a su versatilidad funcional en la percepción sensorial, su expresión ubicua y a su amplia participación en diversos procesos patológicos, resulta crucial el estudio de los canales TRP como objetivos terapéuticos para el tratamiento de las canalopatías.

1.2 Subfamilia TRPV

Los canales TRPV (*Transient Receptor Potential Vanilloid*) forman parte de la superfamilia TRP y reciben el nombre por su sensibilidad a la capsaicina, un compuesto vanilloide presente en los chiles picantes (Zhang et al., 2023). Esta subfamilia está formada por los miembros TRPV1 – 6, y se encuentra dividida a su vez en dos subgrupos: TRPV1 – 4 y TRPV5 – 6. Este último posee una elevada selectividad para el Ca^{2+} , a diferencia de los miembros del primer grupo. Aunque presentan una alta homología de secuencia, los distintos TRPV tienen mecanismos de activación y funciones fisiológicas específicas (Kärki & Tojkander, 2021; Seeböhm & Schreiber, 2021). Esta activación se da principalmente en presencia de un agonista, variaciones de pH o por calor, y la dependencia del voltaje es bastante baja. Debido a que pueden ser activados térmicamente, están incluidos en los llamados termo – TRP (Pumroy et al., 2020).

La actividad de esta subfamilia puede ser modulada por interacciones proteína – proteína y diversos ligandos, tanto lípidos endógenos como moléculas naturales y sintéticas. Por ejemplo, la calmodulina (CaM) regula negativamente estos canales cuando el calcio intracelular es alto, uniéndose al extremo C-terminal. Los lípidos de membrana, especialmente los fosfatidilinosítoles como $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, también modulan estos canales. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ activa TRPV5 – 6, mientras que su papel en el resto varía entre activador e inhibidor según el contexto. Además, el colesterol influye en la actividad de TRPV1 y TRPV3, aumentando su sensibilidad y facilitando su localización en balsas lipídicas ricas en colesterol (Pumroy et al., 2020).

La principal característica de los canales TRPV humanos que los diferencia de los demás miembros de la superfamilia TRP es que contienen seis repeticiones de anquirina en el extremo N – terminal, denominado dominio de repetición de anquirina (Pumroy et al., 2020). El patrón de expresión de los canales TRPV es considerablemente amplio en todo tipo de tejidos y órganos, neuronales y no neuronales, como son los ganglios de la raíz dorsal (TRPV1, TRPV3), las neuronas sensoriales (TRPV1,

TRPV3, TRPV4), el cerebro (TRPV2, TRPV3, TRPV4), la piel (TRPV1, TRPV3, TRPV4), los riñones (TRPV4, TRPV5), los macrófagos (TRPV2) y el tracto gastrointestinal (TRPV6) (Seeböhm & Schreiber, 2021).

Los canales TRPV se encuentran implicados en numerosas patologías, hecho que refuerza su relevancia en el ámbito médico. Por ejemplo, TRPV1 participa en mecanismos de dolor crónico, inflamación y trastornos neurológicos; TRPV4 se asocia con enfermedades respiratorias, musculoesqueléticas y nefropatías; TRPV6 ha sido relacionado con la progresión de cánceres como el de mama y el de próstata (Fernandes et al., 2012; Nilius & Szallasi, 2014; Stewart, 2020; Xiao et al., 2023). Estas asociaciones han provocado que la comunidad científica tenga interés en estudiar los canales TRPV como potenciales dianas terapéuticas.

1.2.1 TRPV1

En 1997 se clonó y aisló con éxito el primer receptor sensible a la capsaicina, TRPV1, del ganglio de la raíz dorsal de rata (Caterina et al., 1997). Tres años después, se aisló su ortólogo humano, el cual mostraba alta similitud en secuencia y función (Schumacher et al., 2000). No obstante, no fue hasta 2013 cuando se determinó su estructura en alta resolución gracias a los avances en criomicroscopía electrónica (Liao et al., 2013). Se trata de un receptor iónico no selectivo, que permite el paso de iones monovalentes, como Na^+ o K^+ , y divalentes, como el Ca^{2+} , por el cual muestra una mayor permeabilidad.

Como se ha comentado en secciones previas, TRPV1 es un homotetrámero, y cada una de sus subunidades consta de seis segmentos transmembrana (S1-S6), siendo S5 y S6 los que forman el poro. Este poro tiene dos compuertas: una externa (filtro de selectividad) y otra interna (ubicada en la hélice S6). La activación del canal implica cambios estructurales significativos, especialmente en la compuerta inferior (Abbas, 2020). El dominio N-terminal contiene múltiples sitios de fosforilación y seis repeticiones de anquirina que permiten su unión a la CaM y al ATP (adenosín trifosfato). Tras dicha unión, estas moléculas son las responsables de la modulación de la sensibilidad y función de TRPV1. Por su parte, el dominio C-terminal contiene una región TRP conservada y varios sitios de unión a la CaM y al PIP_2 (Fernández-Carvajal et al., 2022; Xiao et al., 2023). Además, existen dos residuos ácidos en la zona del poro (E600 y E648) que son claves para la detección del pH y cationes divalentes (Abbas, 2020) (Figura 2).

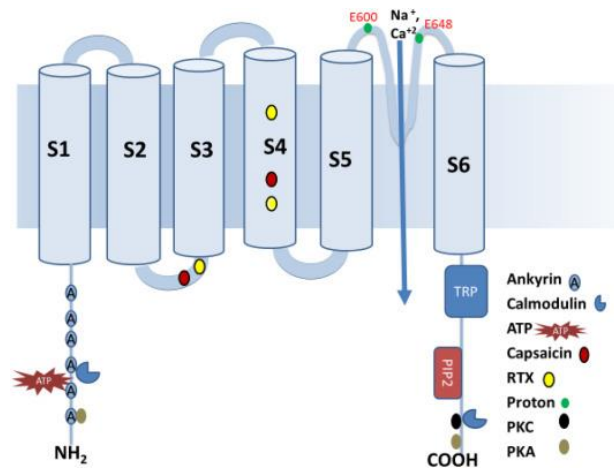


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del canal iónico TRPV1 y sus sitios de interacción. Cada subunidad del tetrámero muestra seis segmentos transmembrana (S1–S6), con una región del poro situada entre S5 y S6 que permite el paso de cationes como Na^+ y Ca^{2+} . El extremo N-terminal contiene seis repeticiones de anquirina (A), mientras que el C-terminal alberga el motivo TRP conservado y el sitio de interacción con PIP_2 . Además, se indican sitios de unión funcionales relevantes para la modulación del canal, incluidos ligandos como capsaicina, protones, ATP, y moduladores intracelulares como calmodulina y proteínas quinasas (PKA y PKC) (Abbas, 2020).

TRPV1 es un canal polimodal, es decir, puede activarse por diversos estímulos como son el calor nocivo (superior a 42°C), algunos compuestos químicos, cambios de osmolaridad y acidosis (pH inferior a 6,0). Sin embargo, TRPV1 es principalmente conocido por su interacción con diversos productos vegetales picantes, como la capsaicina (el agonista principal), la resiniferatoxina (RTX), la piperina (el ingrediente picante de la pimienta negra) y el gingerol (del jengibre). Por otro lado, dicha activación también puede darse en presencia de numerosos venenos (como las vanillatoxinas de la tarántula) y de algunas sustancias endógenas (como la prostaglandina, un mediador inflamatorio) (Fernández-Carvajal et al., 2022). En el caso de la capsaicina, esta se une a un bolsillo intracelular dentro de los segmentos transmembrana del canal, adoptando una configuración de “cola hacia arriba, cabeza hacia abajo”. Esta unión se media a través de enlaces de hidrógeno específicos con algunos residuos del canal y extensas interacciones de Van der Waals con la cola alifática de la capsaicina (F. Yang & Zheng, 2017) (Figura 3).

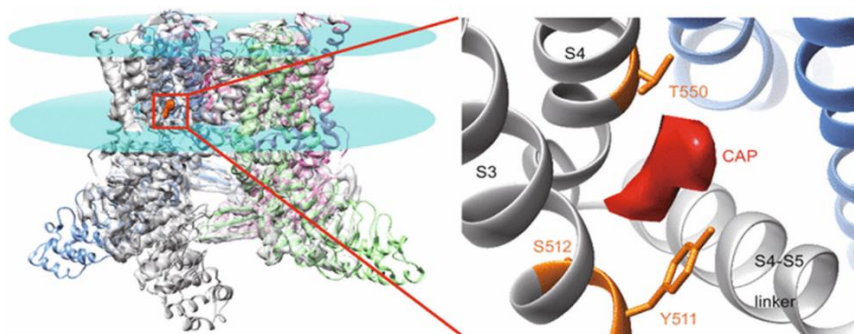


Figura 3. Unión de la capsaicina y TRPV1. A la izquierda se muestra la estructura de alta resolución de TRPV1 de rata determinada por crió-EM. A la derecha se muestra la vista ampliada del bolsillo intracelular al que se une la capsaicina (en naranja se señalan los residuos importantes y en rojo se muestra la densidad electrónica de la capsaicina) (F. Yang & Zheng, 2017).

Uno de los mecanismos de modulación destacados es la fosforilación de residuos específicos en los dominios N- y C- terminales por parte de quinasas como la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC) y la Ca^{2+} /CaM quinasa II (CaMKII). Estas modificaciones aumentan la sensibilidad del canal a estímulos nocivos, facilitando su activación en condiciones inflamatorias (Abbas, 2020). Por otro lado, la CaM, una proteína citosólica que se une al calcio, desempeña un papel crucial en la modulación de TRPV1. En presencia de elevadas concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , la CaM se une a sitios específicos en los extremos N- y C-terminales del canal, promoviendo su desensibilización como mecanismo de retroalimentación negativa (Numazaki et al., 2003). Asimismo, el entorno lipídico de la membrana también influye en la actividad del canal. Fosfolípidos como el PIP_2 son cruciales para la función de TRPV1, y su hidrólisis por parte de fosfolipasas de tipo C, en respuesta a estímulos inflamatorios, conduce a su agotamiento y a la desensibilización del canal (Rosenbaum & Islas, 2023).

Cabe mencionar que esta polimodalidad genera un efecto sinérgico que potencia la sensibilidad del canal. Así pues, la activación por calor presentará umbrales más bajos en presencia de capsaicina o pH ácido extracelular. La capacidad de TRPV1 para responder a una gama tan diversa de estímulos refleja su importancia en la nocicepción, la termorregulación y las respuestas inflamatorias, haciendo de este canal un objetivo clave en la investigación biomédica.

Respecto al patrón de expresión, TRPV1 se identificó inicialmente en los nociceptores aferentes primarios de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), los ganglios trigéminos (TG) y los ganglios vagales. Investigaciones posteriores observaron que su distribución en el sistema nervioso central (SNC) era mucho más amplia, incluyendo a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, el hipotálamo, el hipocampo, la corteza, el cerebelo, la circunvolución dentada y el núcleo accumbens. Además, el canal TRPV1 también se encuentra en células no neuronales, como queratinocitos epidérmicos, hepatocitos, granulocitos polimorfonucleares, células β -pancreáticas, células endoteliales, células del músculo liso arteriolar, preadipocitos, células del urotelio y tejido adiposo (Maximiano et al., 2024).

Dada su importancia en numerosos procesos fisiopatológicos, el canal TRPV1 representa una diana prometedora para nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas, el uso de moléculas tipo PROTAC para su modulación o degradación selectiva.

1.3 Implicación de TRPV1 en condiciones patológicas

TRPV1 desempeña un papel crucial en la fisiopatología de diversas condiciones, principalmente a través de su sobreexpresión o sensibilización, lo que contribuye a la percepción alterada del dolor como la hiperalgesia (aumento de la sensibilidad al dolor) y/o la percepción de dolor ante estímulos no dolorosos (Gao et al., 2024).

En este contexto, TRPV1 está ligado a la señalización nociceptiva y actúa como un receptor clave del dolor y el calor (Andresen, 2019). Durante el daño tisular y la inflamación, una variedad de mediadores inflamatorios endógenos (como la prostaglandina E2, la bradicinina, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el TNF- α) pueden actuar directamente sobre el canal o sensibilizarlo a través de segundos mensajeros y modificaciones proteicas, hecho que aumenta la percepción del dolor. Esta sensibilización es facilitada por quinasas como la PKA, la PKC y la CaMKII (Gao et al., 2024).

En cuanto al dolor neuropático, TRPV1 posee un papel dual funcionando como un “interruptor del dolor” mediante procesos de sensibilización y desensibilización. El canal ha sido vinculado a la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN), en la que su sensibilización en las neuronas del DRG contribuye al desarrollo de la patología. De forma análoga, en la neuropatía periférica diabética (DPN), TRPV1 participa en la modulación nociceptiva mediante rutas asociadas a especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de citoquinas inflamatorias. Además, la hiperglucemia puede inducir una sobreexpresión de TRPV1, hecho que intensifica los efectos nocivos de su activación (Gao et al., 2024). Más allá del ámbito del dolor neuropático, se ha observado que los antagonistas de TRPV1 poseen efectos analgésicos en modelos animales de dolor relacionados con el cáncer o la osteoartritis. Así mismo, se han identificado variantes genéticas del canal que podrían influir en la susceptibilidad de desarrollar osteoartritis de rodilla (Valdes et al., 2011).

Por otro lado, TRPV1 se expresa ampliamente en las fibras nerviosas que inervan órganos viscerales. Su sobreexpresión se ha asociado de manera significativa con la intensidad del dolor visceral en múltiples sistemas, incluidos el tracto urinario, el aparato digestivo (esófago, estómago, intestinos y páncreas), el sistema respiratorio y el aparato reproductor. Por ejemplo, en casos de cistitis o lesiones medulares, el aumento en los niveles de TRPV1 se ha vinculado con hiperactividad vesical y percepción del dolor (Frias & Merighi, 2016). En el ámbito de la dermatología, la modulación de TRPV1 ha mostrado eficacia en modelos preclínicos como tratamiento tópico para afecciones como el prurito, la dermatitis atópica y la psoriasis (Andrei et al., 2023; Fernández-Carvajal et al., 2022).

Un aspecto importante de la implicación de TRPV1 en patologías es su papel en la regulación de la temperatura corporal. TRPV1 es un sensor de calor crucial y está implicado directamente en la termorregulación. De hecho, los intentos de desarrollar antagonistas de TRPV1 como analgésicos se han visto limitados en el ámbito clínico debido al efecto secundario de la hipertermia, lo que subraya el papel de las aferencias vagales de TRPV1 a esta respuesta termorreguladora (Andresen, 2019; Garami et al., 2020).

Además de su papel en la nocicepción y la termorregulación, TRPV1 se encuentra también en células no neuronales, como células inmunes, células β -pancreáticas, células musculares y adipocitos

(Maximiano et al., 2024). Su activación en neuronas somatosensoriales y viscerosensoriales craneales puede controlar funciones vitales como el control gastrointestinal, la presión arterial y la respiración (Andresen, 2019). Además, la activación crónica de TRPV1 por la capsaicina dietética puede mejorar la vasorrelajación dependiente del endotelio y prevenir la hipertensión, lo que sugiere que el TRPV1 endotelial es un objetivo terapéutico para el control de esta enfermedad (D. Yang et al., 2010).

En síntesis, la naturaleza polimodal y la amplia distribución de TRPV1 lo posicionan como un elemento clave en la fisiopatología de diversas afecciones, abarcando desde múltiples tipos de dolor crónico hasta trastornos gastrointestinales, respiratorios y dermatológicos. Estos hechos resaltan la necesidad de ampliar la comprensión de su funcionamiento para futuras estrategias terapéuticas.

1.4 Estrategias de degradación dirigida de proteínas (DDP)

Los fármacos convencionales dirigidos a la familia TRP poseen ciertas dificultades debido a que estos canales son sensores polimodales y, además, se encuentran ampliamente distribuidos en el cuerpo. A diferencia de los inhibidores enzimáticos tradicionales, los fármacos dirigidos a TRP pueden ser agonistas o antagonistas, y la falta de selectividad a menudo conduce a efectos secundarios no deseados que limitan su potencial terapéutico (por ejemplo, la hipertermia) (Garami et al., 2020). Dada esta complejidad en la modulación convencional, las estrategias de degradación dirigida de proteínas (DDP) suponen un enfoque de gran potencial terapéutico que están ganando popularidad (Li et al., 2023)

La DDP tiene como objetivo reducir los niveles de la proteína responsable de la patología mediante ligandos químicos que inducen la proximidad molecular entre una ligasa de ubiquitina E3 y la proteína de interés. De este modo se consigue la ubiquitinación y posterior degradación de dicha proteína (Hanzl & Winter, 2020). Otro mecanismo de acción sería el uso de ligandos que permitan la unión con los receptores LTR o LC-3 induciendo la degradación lisosomal (Figura 4) (Song et al., 2023)

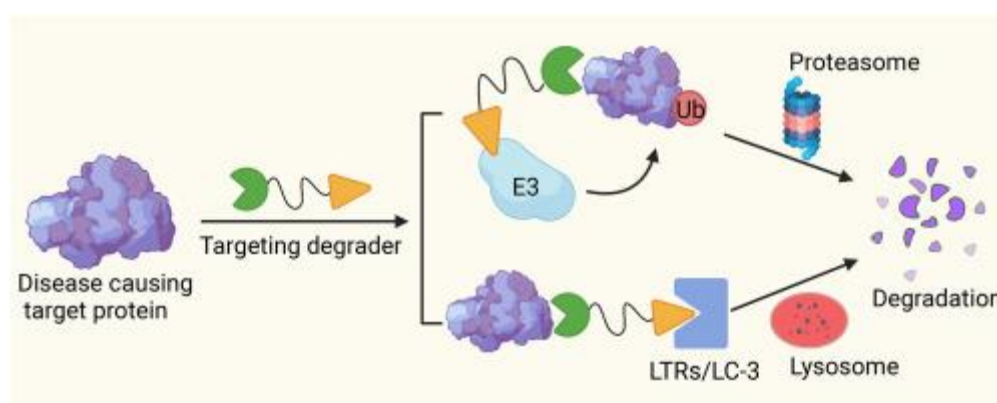


Figura 4. Esquema representativo de los mecanismos DDP. Se muestra de forma general la vía de degradación por parte del sistema ubiquitina – proteasoma y la lisosomal (Song et al., 2023).

En los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias TPD que emplean el sistema ubiquitina – proteasoma. Estas serían los *Proteolysis Targeting Chimera* (PROTACs), pegamentos moleculares, Trim – Away, etiquetas de degradación (dTAGs), *specific and nongenetic inhibitor of apoptosis protein – dependent protein erasers* (SNIPERs) y fármacos inmunomoduladores de estructura imida (IMIDs) (Li et al., 2023).

1.4.1 Compuestos PROTAC

La historia de los PROTACs comienza en 2001 con la síntesis del primer PROTAC, llamado Protac-1, que demostró la degradación de la metionina aminopeptidasa-2 (MetAP-2) *in vitro* (Sakamoto et al., 2001). La primera generación de PROTACs eran péptidos que poseían un alto peso molecular, por lo que su permeabilidad celular, estabilidad y potencia se veían limitadas (J. Liu et al., 2020). Este problema impulsó el desarrollo de los PROTACs de segunda generación, que eran moléculas pequeñas. Al disminuir el peso molecular se consiguió una mejora en la penetración celular y permitieron el uso de un abanico más amplio de E3 ligasas, como MDM2, IAPs , VHL y CRBN (J. Liu et al., 2020). Recientemente, ya en la tercera generación, se han conseguido PROTACs controlables por luz y los primeros ensayos clínicos, como el de la Bavdegalutamida para el receptor de andrógenos, han demostrado resultados prometedores en cánceres resistentes (J. Liu et al., 2020; Snyder et al., 2025).

El funcionamiento de los PROTACs se basa en el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS), que es el principal mecanismo celular para la degradación de proteínas. El UPS implica una cascada enzimática con ligasas E1, E2 y E3, donde la E3 es clave para la especificidad al reconocer y unir la ubiquitina a la proteína de interés (POI). Los PROTACs “secuestran” este sistema al unir al mismo tiempo la POI y una ligasa E3, induciendo la formación de un complejo ternario (POI:PROTAC:ligasa E3). Esta proximidad permite la poliubiquitinación de la POI, marcándola para su degradación por el proteasoma 26S (J. Liu et al., 2020) (Figura 5).

Una característica fundamental de los PROTACs es su naturaleza catalítica: una sola molécula puede mediar la degradación de múltiples copias de la POI, pues el PROTAC se recicla. Esto permite que sean efectivos a dosis mucho más bajas (nanomolares) y superen la resistencia a fármacos causada por la sobreexpresión de la POI al eliminar el exceso de proteína en lugar de únicamente inhibir su función (Sasso et al., 2023). La respuesta farmacodinámica de los PROTACs puede ser prolongada, ya que la célula debe volver a sintetizar la proteína para recuperarse. Sin embargo, a altas concentraciones puede ocurrir un “efecto gancho” donde el PROTAC se une por separado a la ligasa E3 y a la POI, impidiendo la formación del complejo ternario (Ocaña & Pandiella, 2020).

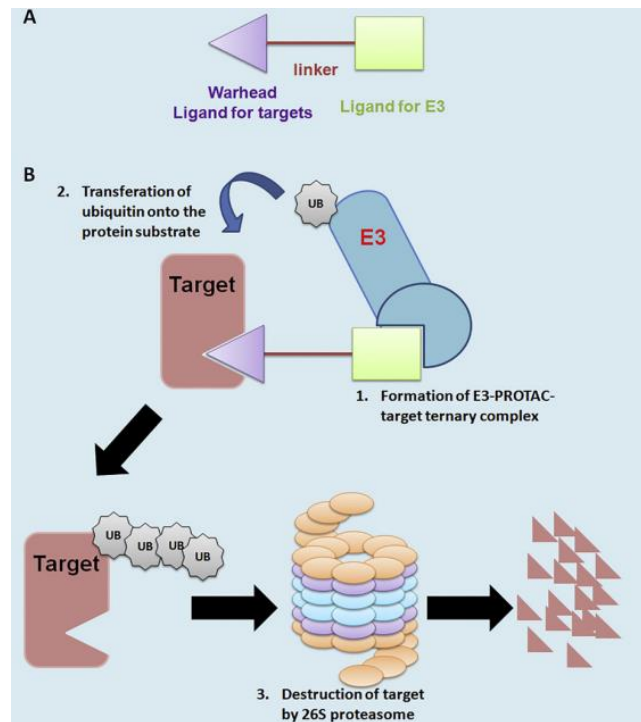


Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de los PROTACs. (A) Estructura general de una molécula PROTAC, compuesta por un ligando para la proteína diana (warhead), un ligando para la ligasa E3 y un conector (linker) que los une. (B) Se representa el mecanismo de degradación mediado por PROTAC. (1) Formación del complejo ternario POI-PROTAC-E3. (2) Transferencia de la ubiquitina a la POI. (3) Reconocimiento y degradación por el proteosoma 26S. (J. Liu et al., 2020)

Los PROTACs son moléculas heterobifuncionales compuestas por un ligando de la POI, un ligando de la ubiquitina ligasa E3 y un conector químico (Figura 5). El ligando de la POI solo necesita unirse con alta selectividad, no necesariamente inhibir su actividad. El conector es esencial, y sus propiedades (longitud, hidrofiliidad, rigidez) deben optimizarse para mejorar la estabilidad y la permeabilidad (Gharbi & Mercado, 2024). Aunque existen cientos de ligasas E3, solo unas pocas se utilizan habitualmente, como CRBN, VHL, MDM2 e IAP (Sasso et al., 2023). Los PROTACs pueden dirigirse a una amplia gama de proteínas que pueden ser difíciles dianas, incluyendo quinasas, factores de transcripción y factores epigenéticos, abriendo nuevas vías terapéuticas.

Los compuestos PROTAC representan una innovadora estrategia terapéutica basada en la degradación dirigida de proteínas. Su evolución ha permitido mejorar su eficacia y perfil farmacológico, posicionándolos como prometedoras herramientas en el tratamiento de enfermedades complejas.

2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Actualmente, la comprensión de los canales iónicos es fundamental debido a que representan dianas terapéuticas cruciales para una amplia gama de enfermedades. Dentro de los canales iónicos, la familia de los TRP ha adquirido un gran protagonismo en la industria farmacéutica debido a su implicación en numerosas enfermedades. De los 11 miembros de esta familia, solo los compuestos contra seis de ellos han llegado a la fase de ensayos clínicos. La mayoría de ellos se encuentran dirigidos a TRPV1, seguidos de TRPM8, TRPA1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4 (Fernández-Carvajal et al., 2020).

A pesar de su enorme potencial como diana terapéutica, el desarrollo de moduladores farmacológicos de TRPV1 ha enfrentado diversos desafíos. Los agonistas de TRPV1, como la capsaicina, inducen analgesia mediante la desensibilización del canal, un proceso que implica su internalización y degradación lisosomal tras una exposición prolongada (Sanz-Salvador et al., 2012). Sin embargo, su uso clínico está limitado por la pungencia, la irritación local y los problemas de adherencia del paciente, hecho que restringe su uso a formulaciones tópicas como parches transdérmicos (Fernández-Carvajal et al., 2020, 2022; Treat et al., 2022). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado análogos de capsaicina con menor pungencia que mantienen la eficacia analgésica, como los compuestos YB-11 e YB-16, que han demostrado reducir el comportamiento asociado al dolor en modelos animales sin provocar una sensación de ardor significativa (Treat et al., 2022). Además, antagonistas tópicos como el ACF440 han mostrado eficacia en la reducción del dolor evocado en voluntarios sanos, sin los efectos secundarios sistémicos asociados a la administración oral (Segerdahl et al., 2024).

Hasta la fecha, no existen estudios publicados de degradación dirigida de proteínas (DDP) mediada por moléculas pequeñas (incluidas PROTACs) aplicadas al canal TRPV1. Sin embargo, estudios recientes han mostrado una prueba de concepto para la degradación de otros canales iónicos. Por ejemplo, se ha demostrado que los canales de sodio voltaje-dependientes (NaVs) etiquetados con degrones son degradados de forma potente y rápida por degradadores de moléculas pequeñas que aprovechan las ligasas E3 CRBN y VHL (Chameesian et al., 2025). Además, investigaciones previas habían indicado que la interrupción de la asociación de Sig-1R con TRPV1 por antagonistas sintéticos o naturales puede conducir a la degradación de la proteína TRPV1 a través de una vía dependiente del proteasoma (Ortíz-Rentería et al., 2018).

En este contexto, la identificación y caracterización de nuevos moduladores del canal iónico TRPV1 basados en la técnica PROTAC representa una dirección de investigación altamente innovadora y que puede tener un gran impacto. Por todo ello, los principales objetivos establecidos del presente Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- Poner en práctica los conocimientos teóricos adquiridos durante el Grado en un laboratorio de investigación.
- Analizar la actividad de TRPV1 en presencia de compuestos PROTAC y seleccionar aquellos que son agonistas y no permeabilizan la membrana.
- Evaluar la citotoxicidad de los compuestos seleccionados.
- Estudiar la actividad de los compuestos seleccionados como moduladores PROTAC de TRPV1 mediante Western Blot.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron diferentes ensayos fluorimétricos con el objetivo de comprobar la actividad de TRPV1 en presencia de los compuestos PROTAC y realizar un cribado inicial. Además, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular para analizar la posible citotoxicidad y se comprobó la actividad de los compuestos seleccionados mediante Western Blot. Por tanto, en este capítulo se detallan los protocolos empleados para el desarrollo de cada técnica, así como los diferentes reactivos, volúmenes y concentraciones empleados.

3.1 Cultivos celulares

La línea celular empleada para desarrollar el presente trabajo es HEK-hTRPV1, la cual se trata de células embrionarias de riñón humano que expresan de forma estable el canal TRPV1 humano. Estas han sido cultivadas en monocapa empleando medio de cultivo DMEM GlutaMAX (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, suplemento GlutaMAX) enriquecido con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino), 1% de Penicilina-Estreptomicina y 1% de Geneticina.

Las células crecen en *flask* T25 (25 cm²) a 37°C con un 5% de CO₂, realizándose cada 2 - 3 días el cambio de medio de cultivo para optimizar su crecimiento. Una vez alcanzada una confluencia del 80 - 90% se tripsinizan las células con el fin de realizar un pase o bien para sembrar en placa multipocillo. Para ello, se retira el medio, se realiza un lavado con 2 mL de PBS 1X y se añade 1 mL de Tripsina - EDTA 0,25% durante 2 minutos. Por último, se debe inactivar la Tripsina añadiendo 5 mL de medio de cultivo y disgregar las células.

Para la siembra en placas multipocillo, estas se tratan previamente con *Poly-L-Lysine*, la cual se deja actuar durante 30 minutos en el incubador. Esta asegura la adherencia de las células al fondo del pocillo. Finalmente, se retira la *Poly-L-Lysine* y se realizan dos o tres lavados con PBS 1X.

3.2 Compuestos ensayados

En los ensayos de actividad del canal TRPV1, se utilizó la capsaicina (agonista) como control positivo. La disolución *stock* a 50 mM fue diluida en 10 mL de *buffer* de ensayo para obtener una concentración de 100 µM de capsaicina. Esta disolución se utilizó en los ensayos fluorimétricos, logrando una concentración final de 10 µM de capsaicina en cada pocillo.

El rojo rutenio (antagonista) se empleó como control negativo. Se utilizó una solución a 1 mM a partir de la disolución *stock* a 10 mM, utilizando DMSO como diluyente. Así pues, la concentración final de rojo rutenio en cada pocillo fue de 10 µM.

En este proyecto se probaron los compuestos GG93, GG94, GG83, GG252, GG256, CF34, CF36 Y CF26. Estos compuestos son derivados de la capsaicina a los que se les ha añadido distintos *linkers* para que se unan a la ligasa E3. Todos fueron resuspendidos en DMSO a 100 mM excepto GG83, que se preparó a 50 mM. Para los ensayos fluorimétricos se prepararon diluciones seriadas, de modo que la concentración final en cada pocillo fuera de 50 μ M, 5 μ M y 0,5 μ M.

Cabe destacar que el DMSO es un disolvente orgánico que puede presentar efectos citotóxicos a concentraciones superiores al 1%, aspecto que debe tenerse en cuenta para no superar nunca dicha concentración en los ensayos.

3.3 Ensayos fluorimétricos

Para medir la eficacia de los compuestos frente a la actividad de TRPV1 se han llevado a cabo ensayos basados en la detección de fluorescencia mediante la sonda sensible a iones de calcio Fluo 4NW. Además, se utilizó un detergente de baja toxicidad, el probenecid, que facilita la entrada de la sonda al interior de la célula e inhibe la salida del interior celular del indicador. La activación del canal aumentará la concentración de calcio citosólico, de modo que se producirá la unión de este ion a la sonda, incrementando así la intensidad de la fluorescencia.

Esta técnica requiere el uso de placas oscuras de 96 pocillos tratadas previamente con *Poly-L-Lysine*, las cuales se sembraron a una concentración de 50.000 células/pocillo y un volumen final de 100 μ L por pocillo. De este modo se consigue alcanzar al día siguiente el 100% de confluencia para poder realizar el ensayo fluorimétrico.

El día del experimento se prepara la sonda añadiendo 10 mL de tampón y 100 μ L de probenecid al recipiente opaco, que contiene el indicador Fluo-4 NW liofilizado. Tras ello, se retira el medio de los pocillos, con el objetivo de eliminar posibles contribuciones a la fluorescencia inicial, y se añaden 100 μ L de sonda por pocillo. La placa con la sonda se deja incubar 1 h a 37°C.

La medición se lleva a cabo en un lector de placas CLARIOstar Plus, que realiza 20 ciclos de lectura a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm. Tras 3 ciclos de lectura de la fluorescencia basal, se añade 1 μ L de cada compuesto a las distintas concentraciones, 1 μ L de rojo rutenio (control negativo) y 1 μ L de DMSO 1% (vehículo) de forma manual. En el ciclo 10, el equipo inyecta 10 μ L de capsaicina en toda la placa. Por lo tanto, el control positivo corresponde a aquellos pocillos que únicamente contienen capsaicina.

Esta técnica se empleó para los siguientes experimentos:

- Obtener la curva de dosis – respuesta de los controles. Se prepararon 15 diluciones de capsaicina y de rojo rutenio en un rango de concentraciones de 100 μ M - 0,01 nM en pocillo.

- Comprobar la potencia de los compuestos, empleando tres concentraciones diferentes: 50 μM , 5 μM y 0,5 μM .
- Comprobar el efecto de los compuestos en presencia de rojo rutenio. Para este experimento se añade el antagonista antes de comenzar la medición y después se lleva a cabo el protocolo detallado previamente.

Los datos obtenidos se analizaron mediante Microsoft Excel. El ensayo se valida realizando el cálculo del factor Z, valor que debe encontrarse entre 0,5 y 1 para que el ensayo pueda considerarse fiable. Este parámetro se calcula mediante la expresión siguiente:

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

Donde μ es el promedio de los valores de intensidad de fluorescencia de los controles positivos (μ_p) y negativos (μ_n) y σ es la desviación estándar.

El efecto de los compuestos sobre la actividad de TRPV1 se determinó normalizando su efecto respecto a la máxima fluorescencia observada con la capsaicina. A continuación, se muestra la expresión empleada para el cálculo de la actividad, expresada en porcentaje de activación:

$$\% \text{ Activación} = \frac{\sum \left(\frac{IF_{\max} - IF_{\min}}{\mu_p} \right)}{N_c} \times 100$$

Donde $IF_{\max}$ es el valor de intensidad de fluorescencia máxima entre los ciclos 4 y 9 (antes de la inyección de capsaicina); $IF_{\min}$ es el valor del ciclo 3, es decir, previo a la adición de los compuestos (fluorescencia basal), y N_c es el número de valores obtenidos para un mismo compuesto.

El ensayo se realiza con tres concentraciones diferentes de cada compuesto para determinar la potencia. Para ello, se realiza una representación gráfica del porcentaje de activación frente a la concentración del compuesto y se calcula el valor de la EC_{50} mediante el programa Graphpad Prism 8. Para ello, el programa emplea la siguiente ecuación:

$$E = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - C)}}$$

Donde $E_{\min}$ es la respuesta mínima; $E_{\max}$ la respuesta máxima; C el logaritmo en base 10 de la concentración y $\log EC_{50}$ el logaritmo en base 10 de la concentración de agonista que produce la mitad de actividad entre los valores máximo y mínimo.

Asimismo, se realizó un análisis estadístico *Unpair t-test* con la corrección de Welch para comprobar posibles diferencias significativas empleando el programa Graphpad Prism 8.

3.4 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se ha medido empleando la técnica del MTT, ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – ilo) – 2,5 – difeniltetrazol (MTT) realizada por la succinato-deshidrogenasa en un compuesto azul, el formazán. Así pues, se determina la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células HEK – hTRPV1 se siembran en placas transparentes de 96 pocillos tratadas previamente con *Poly-L-Lysine*, a una concentración de 30.000 células/pocillo y se incuban a 37°C durante 24 horas. Los compuestos diluidos en DMSO se preparan a las concentraciones deseadas (100 µM, 50 µM y 10 µM) en el medio de cultivo empleado en el mantenimiento.

Al día siguiente, se tratan las células con vehículo (DMSO 1%); con detergente SDS, como control negativo; con medio de cultivo, como control positivo, y con los compuestos a las diferentes concentraciones. Se realizan triplicados de cada tratamiento, de modo que se emplean 3 pocillos para cada uno. Tras ello, se incuba la placa durante 24 horas a las mismas condiciones que anteriormente.

El tercer día, se añaden 5 µL de MTT y se dejan incubar durante 2 horas aproximadamente. Una vez formados los cristales de formazán, se retira el sobrenadante, se añaden 100 µL de DMSO y se resuspenden los cristales. Por último, se lleva a cabo la lectura de la densidad óptica (DO) mediante el espectrofotómetro CLARIOstar Plus a una longitud de onda de 570 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

El análisis de los datos se realiza mediante Microsoft Excel y se calcula el porcentaje de viabilidad celular:

$$\% Viabilidad\ celular = \frac{DO_t}{DO_c} \times 100$$

Donde DO_t es el valor de la densidad óptica de las células tratadas y DO_c es el de las células control (vehículo), las cuales representan el 100% de la viabilidad celular. Las diferencias significativas de viabilidad entre el control positivo y los pocillos con compuesto se determinan realizando un análisis estadístico *One – Way ANOVA* con el programa Graphpad Prism 8.

3.5 Ensayos de detección y cuantificación proteica: Western Blot

Se sembraron las células HEK-hTRPV1 en placas de doce pocillos a una concentración de 300.000 células/pocillo. Se realizaron tratamientos con los compuestos seleccionados (a 100 µM y 10 µM) y con vehículo (DMSO 1%) durante 24 horas. Como control, se emplearon células sin tratar. Tanto los compuestos como el vehículo y el control se testaron por duplicado.

Tras el tratamiento, se tripsinizaron las células con el objetivo de obtener las muestras. Para ello, se retira el medio, se realiza un lavado con 300 µL de PBS 1X, se retira completamente y se añade 150 µL de Tripsina - EDTA 0,25% durante 2 minutos. Por último, se debe inactivar la Tripsina añadiendo 850 µL de medio de cultivo y disgregar las células. Posteriormente, se realizó un conteo de las células de cada pocillo con la cámara de Neubauer para estimar el volumen de *buffer* RIPA (50 mM Tris-base pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 0.5% deoxicolato de sodio) con inhibidor de proteasa a una concentración de 1:100. Esta estimación se realiza siguiendo la siguiente ecuación:

$$V_{buffer} = \frac{N^{\circ} \text{ células} \cdot 100\mu L}{1.000.000 \text{ células}}$$

Dado que el número de células varía ligeramente en cada pocillo, se empleó la media de los pocillos para el cálculo del volumen de *buffer* (entre 100 y 200 µL).

Seguidamente, las células se sedimentaron mediante centrifugación (7 minutos a 1.000 rpm) y el sedimento se resuspendió con *buffer* RIPA para llevar a cabo la extracción proteica. Posteriormente, se ultracongelaron a -80 °C durante 24 horas.

Al día siguiente, tras descongelarlas en un baño a 37 °C, se mantuvieron en agitación vigorosa (125 rpm) durante 40 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos. Tras ello, se retiró el pellet y se guardó el sobrenadante para poder llevar a cabo la cuantificación proteica. Esta se realizó para cada muestra mediante el método Bradford usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific). La absorbancia se midió a 562 nm en el lector de placas CLARIOstar.

Conocida dicha concentración, se prepararon las muestras con 20 µg de proteína total en *Loading Buffer* 10X (0,6 M Tris-HCl pH 6,8; 1% Bromofenol; 50% Glicerol; 400 mM DTT; 20% SDS) y agua destilada hasta llegar al volumen final de 30 µL. Se mezcló con el vortex y se calentaron las muestras a 70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 rpm durante un minuto y se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para su separación por tamaño. Para ello, se cargaron 30 µL de muestra y 10 µL de marcador de peso molecular, se añadió *Running Buffer* 1X (25 mM Tris-base pH 8,3; 190 mM glicina; 0,1% SDS) y se aplicó un voltaje de 100 V durante 10 min, incrementándolo a 150 V hasta su finalización. La transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF se realizó empleando el sistema Tank Blotting, aplicando un voltaje de 40 V a 4 °C durante la noche.

Al día siguiente, las membranas se incubaron con leche al 5% en TBST *Buffer* 1X (100 mM Tris-base pH 7,5; 750 mM NaCl; 0,5% Tween 20) en el caso de TRPV1 y en BSA 3% en TBST *Buffer* 1X en el caso de la actina durante 1 hora en agitación suave y a temperatura ambiente para bloquear posibles

interacciones inespecíficas. Después, fueron lavadas cinco veces empleando 10 mL de TBST *Buffer* 1X. Con el objetivo de detectar la proteína diana (TRPV1) y control (Actina), las membranas se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo primario *Rabbit* anti-TRPV1 (dilución 1:500 con BSA 5% en TBST *Buffer* 1X) o anti-Actin (dilución 1:1.000 con BSA 3% en TBST *Buffer* 1X). Tras ello, se realizaron cinco lavados de 10 mL con TBST *Buffer* 1X y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (*Anti-Rabbit* IgG-HRP) diluido en leche 5% (en el caso de TRPV1) y en BSA 3% (en el caso de la actina) en TBST *Buffer* 1X a una concentración de 1:20.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, se volvieron a realizar cinco lavados de 10 mL con TBST *Buffer* 1X. Tanto los lavados como la incubación con el anticuerpo primario se llevaron a cabo empleando el sistema BLOT Holder Snap.

Finalmente, el revelado se realizó empleando un sustrato quimioluminiscente, señal detectada por el fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System. Los resultados se analizaron con los programas ImageLab y Microsoft Excel.

3.5.1 Análisis cuantitativo

Para realizar el análisis cuantitativo, se emplearon los resultados numéricos obtenidos con el fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System. Para ello, se parte de los volúmenes ajustados (obtenidos con el programa ImageLab 6.1; representan la suma de la señal de todos los píxeles de la banda una vez eliminado el fondo) de la actina y del TRPV1 de cada muestra y cada repetición, y se calcula la relación entre ambos, de tal forma que se realiza la primera normalización de los datos:

$$R_{(TRPV1/Actina)} = \frac{Volumen\ ajustado_{TRPV1_j}}{Volumen\ ajustado_{Actina_j}}$$

Siendo *j* la calle de la membrana correspondiente. Seguidamente, se deben normalizar los resultados anteriores con respecto al vehículo empleado de la membrana correspondiente. En este caso, la relación se hace con los valores normalizados anteriormente, es decir:

$$R_{final} = \frac{R_{(TRPV1/Actina)_i}}{R_{(TRPV1/Actina)_{vehiculo}}}$$

Siendo *i* cada una de las muestras empleadas. Estos cálculos se realizan para cada repetición. Posteriormente se calcula la media y la desviación estándar de todas las repeticiones para representar gráficamente los resultados con GraphPad Prism 8.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos fluorimétricos

Previo a la evaluación de la efectividad de los compuestos frente a la actividad de TRPV1, se deben establecer los controles adecuados que permitan interpretar correctamente los resultados de los experimentos posteriores. Para ello se realizan ensayos a diferentes concentraciones de los controles positivo y negativo y se obtiene la curva de dosis – respuesta.

Como control positivo se utilizará la capsaicina, un agonista conocido de TRPV1 que provoca la activación del canal. Se espera, por tanto, que el equipo detecte un aumento de la intensidad de fluorescencia a medida que incrementa la concentración de capsaicina. Por otro lado, se empleará el rojo rutenio como control negativo, de manera que, a mayores concentraciones, la fluorescencia se verá reducida. Ambos compuestos se prueban a 15 concentraciones, incluidas en un rango de 100 μM a 0,01 nM (Figura 6).

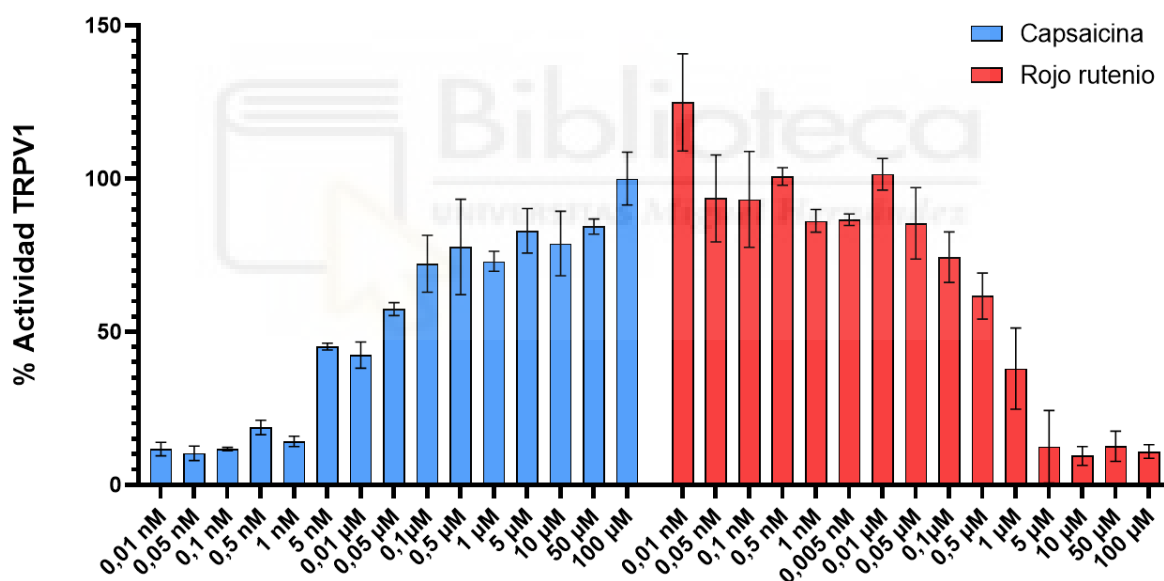


Figura 6. Representación de la actividad del canal TRPV1 en presencia de capsaicina y rojo rutenio. Se evalúa el efecto del agonista (capsaicina) y del antagonista (rojo rutenio) de referencia a diferentes concentraciones. N=2, n=3, Z>0,5.

En el caso de la capsaicina se evidencia esa disminución gradual de la actividad del canal a medida que se reduce la concentración. Este resultado confirma el papel de la capsaicina como agonista de TRPV1. Tal y como se esperaba, el rojo rutenio presenta el caso contrario, ya que las concentraciones más altas son las que producen una mayor inhibición.

Posteriormente, se realizaron las curvas dosis – respuesta tanto del control positivo como del control negativo (Figura 7). De esta forma se obtienen los valores EC_{50} e IC_{50} respectivamente.

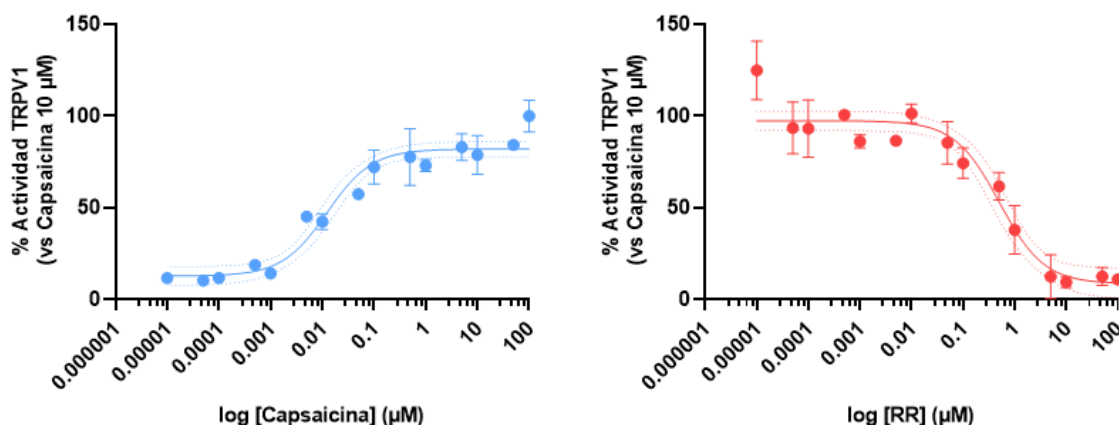


Figura 7. Curvas dosis-respuesta de la capsaicina y el rojo rutenio sobre el canal TRPV1. Se representan los valores del porcentaje de actividad del canal TRPV1 normalizados para el control positivo de capsaicina 10 μM frente a las diferentes concentraciones empleadas. Cada punto representa el promedio del porcentaje de actividad y la desviación estándar. Las líneas discontinuas representan las sigmoides ajustadas por la ecuación de Hill con un intervalo de confianza del 95%.

Para la capsaicina el valor de EC_{50} (concentración a la que se observa la mitad de la activación máxima) es de $12,41 \pm 4,32$ nM. Para el rojo rutenio el valor de IC_{50} (concentración a la que se observa la mitad de la inhibición máxima) es de $0,51 \pm 0,15$ μM . Para conseguir el máximo efecto, se empleará como control positivo la capsaicina a una concentración de 10 μM y como control negativo el rojo rutenio a una concentración de 10 μM .

4.1.1 Cribado de compuestos

Se realizó un cribado de ocho compuestos PROTAC, con el objetivo de identificar nuevos compuestos que puedan tener efecto sobre la actividad del canal TRPV1 en células HEK-hTRPV1 empleando técnicas fluorimétricas, tal y como se explica en el Apartado 3.3. Este cribado se realizó a diferentes concentraciones de cada compuesto, siendo estas 50, 5 y 0,5 μM , y se comparó la actividad del canal frente al agonista de TRPV1 (CPS 10 μM) y al antagonista (RR 10 μM). Los compuestos empleados se encuentran detallados en el Apartado 3.2.

Los compuestos se trataron como agonistas, ya que se observa un aumento de la fluorescencia en el ciclo cuatro tras la adición de los compuestos. Esto provoca que el nivel basal se encuentre elevado durante todo el registro y que la respuesta a la capsaicina sea menor, dando como resultado una falsa inhibición. Además, este hecho coincide con el perfil de fluorescencia de CF26, un compuesto agonista de TRPV1 conocido. En la Figura 8 se muestra un ejemplo comparativo de los perfiles de fluorescencia de los compuestos GG83 (Figura 8A) y CF26 (Figura 8B).

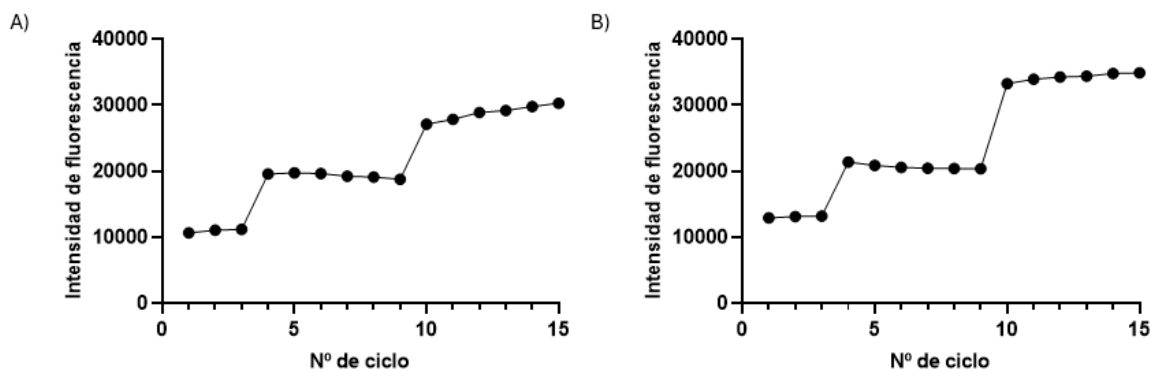


Figura 8. Representación del incremento de la fluorescencia en el cuarto ciclo. Se representan los valores de la intensidad de fluorescencia de los compuestos A) GG83 a 5 μ M B) CF26 a 50 μ M.

A continuación, en la Figura 9 se observan los resultados de activación de TRPV1 por parte de los compuestos, comparándolos con el agonista de referencia (CPS 10 μ M).

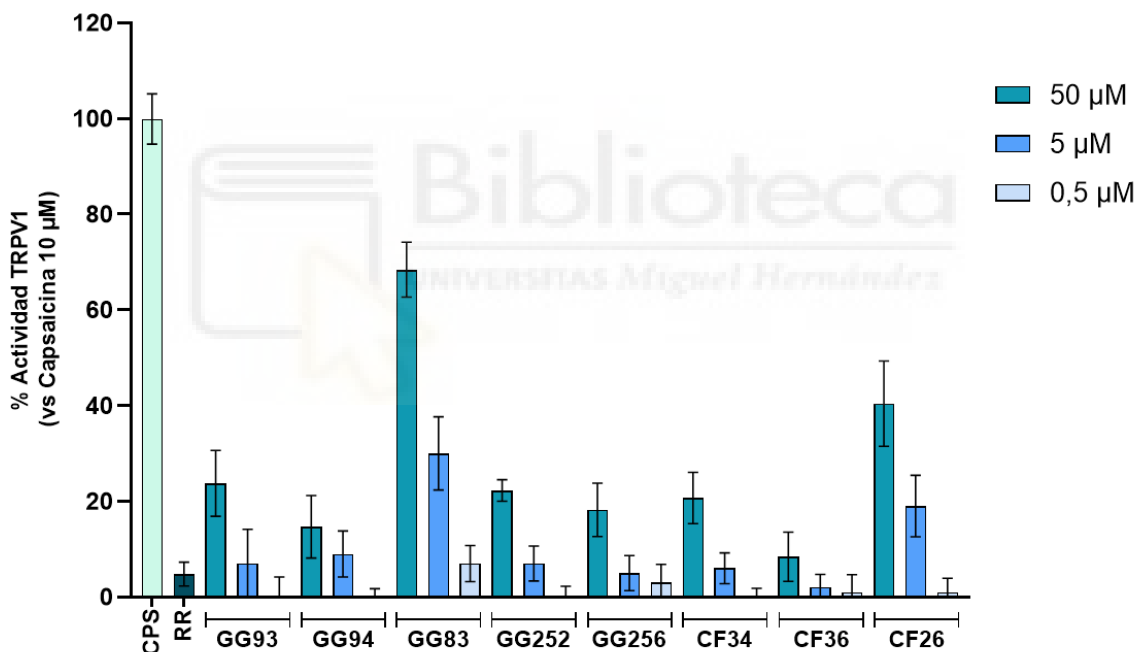


Figura 9. Cribado de compuestos en TRPV1. Representación de la media y la desviación estándar de los resultados de los ensayos fluorimétricos de los ocho compuestos a tres concentraciones (50, 5 y 0,5 μ M). A la izquierda se encuentran los controles de capsaicina y rojo rutenio (ambos a 10 μ M). N=4, n=3, Z>0,5.

Como se puede apreciar, existe una mayor activación en las concentraciones 50 y 5 μ M de los compuestos GG83 y CF26. Además, como ya se ha comentado previamente, se puede observar que en el caso de GG83, la actividad de TRPV1 es mayor que la producida por CF26, nuestro agonista conocido. Por otro lado, se observan cuatro compuestos que también activan a 50 μ M (GG93, GG252, GG256 y CF34). Sin embargo, existen dos compuestos (GG94 y CF36) cuya activación del canal es inferior en

comparación con el resto en las tres concentraciones ensayadas, siendo, por tanto, los de menor eficacia como agonistas.

No obstante, otras posibles causas de esta activación podrían ser que los compuestos permeabilizan la membrana o producen citotoxicidad. Estas hipótesis fueron evaluadas en experimentos que se comentarán en apartados posteriores.

4.1.2 Evaluación de compuestos como agonistas

Con el objetivo de corroborar que el aumento de fluorescencia es realmente debido a la activación de TRPV1 por estos compuestos, se realizó un ensayo en presencia del antagonista de referencia (RR 10 μ M), tal y como se detalla en el Apartado 3.3.

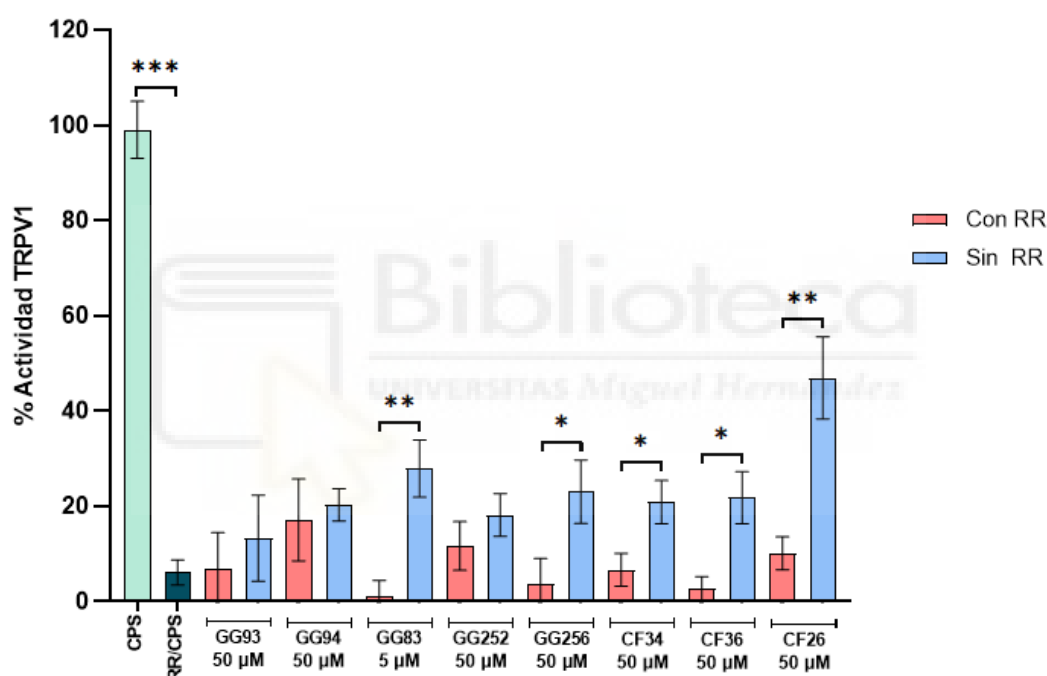


Figura 10. Actividad del canal TRPV1 en presencia de los compuestos candidatos y rojo rutenio. Se muestra el porcentaje de activación del canal TRPV1 tras la aplicación de capsaicina (CPS, control positivo) y diversos compuestos (GG93, GG94, GG83, GG252, GG256, CF34, CF36 y CF26), en presencia (barras rojas) o ausencia de rojo rutenio (barras azules). Los datos representan la media y la desviación estándar. Análisis estadístico Unpair t-test con la corrección de Welch. Los datos significativamente estadísticos se encuentran marcados con *** si el p-valor es inferior a 0,001; ** si el p-valor es inferior a 0,01 y * si el p-valor es inferior a 0,1. N=3, n=3, Z>0,5.

Al comparar la respuesta del canal en presencia y ausencia de rojo rutenio (Figura 10), se observa que ciertos compuestos como GG83, GG252, GG256, CF34, CF36 y CF26, inducen una activación significativa del canal en ausencia del inhibidor, mientras que dicha activación se ve notablemente reducida en su presencia. Estos resultados sugieren que la activación inducida por dichos compuestos es dependiente del canal TRPV1 y no se debe a efectos de alteración de la permeabilidad de la membrana. Por tanto, se puede determinar que estos compuestos actúan como agonistas de TRPV1, destacando GG83 y CF26 como los candidatos con mayor potencial aparente.

Aquellos que no mostraron una diferencia significativa en la activación del canal tanto en presencia como en ausencia de rojo rutenio (GG93, GG94 y GG252), fueron descartados como agonistas del canal TRPV1.

Por otro lado, los resultados mostrados en la Figura 10 sugieren que los compuestos generalmente no permeabilizan la membrana plasmática, ya que la actividad permanece baja en presencia de rojo rutenio. Sin embargo, en el caso de GG94, esto no se puede confirmar con exactitud debido a la alta variabilidad de los datos.

Finalmente, los compuestos escogidos fueron GG83, GG256 y CF26. Su elección se debe a que mostraron tener un mayor efecto agonista (Figura 9) y, además, en el ensayo con rojo rutenio hubo diferencias significativas (Figura 10). Por tanto, estos tres compuestos fueron empleados para realizar el ensayo de viabilidad celular.

4.2 Ensayo de viabilidad celular

Tal y como se explica en el Apartado 3.4, se empleó el ensayo del MTT para evaluar la posible toxicidad de los compuestos seleccionados en la línea celular HEK-hTRPV1. Para ello, se probaron varias concentraciones de cada uno de ellos, a partir de valores superiores a los empleados en el cribado de compuestos: 100, 50 y 10 μ M para GG83 y CF26; y 100, 50 y 20 μ M para GG256 (Figura 11).

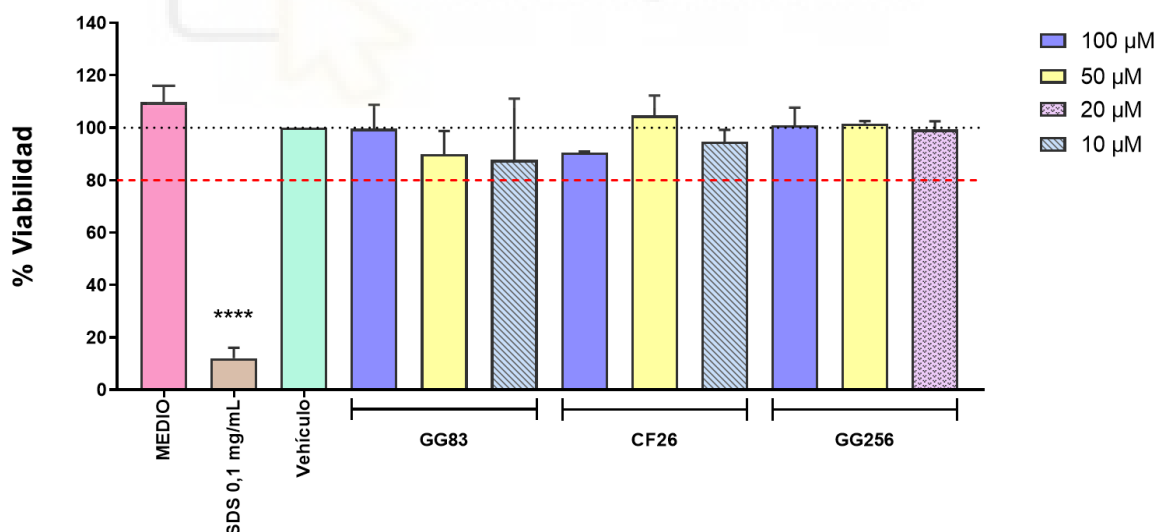


Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular (MTT) en células HEK-hTRPV1. Como controles, se emplearon el medio de cultivo, SDS (0,1 mg/mL) y vehículo (DMSO 1%). La viabilidad fue calculada con respecto al vehículo (100%). La línea discontinua roja determina el umbral del 80%. Para cada compuesto y concentración, se representa la media y la desviación estándar. Se empleó el análisis One Way ANOVA, donde se representa con **** aquellos valores de p-valor inferiores a 0,0001. N=2, n=3.

Estos resultados están normalizados respecto al vehículo, que contiene DMSO 1%. Como control negativo se emplea el detergente SDS, cuyos resultados muestran una viabilidad celular alrededor del

12%. En la Figura 11 se puede observar que tanto el control positivo como el vehículo, muestran una viabilidad celular cercana al 100%. Esto permite corroborar que el DMSO 1%, empleado para la disolución de los compuestos, no produce toxicidad en las células, por lo que cualquier posible disminución observada se deberá exclusivamente a los efectos tóxicos del compuesto.

Estos resultados indican que los compuestos seleccionados no muestran toxicidad a ninguna de las concentraciones empleadas, ya que la viabilidad celular se mantiene por encima del 80%, umbral aceptado para considerar un determinado tratamiento como no citotóxico (López-García et al., 2014).

4.3 Ensayo de detección y cuantificación proteica: Western Blot

Tras determinar que los compuestos escogidos no mostraban citotoxicidad, se realizó un primer Western Blot según el protocolo del Anexo 1 para la detección y cuantificación proteica. Tal y como se puede apreciar, las bandas de actina (Figura 12B) se encuentran bien definidas. Sin embargo, en el caso de TRPV1 (Figura 12A), aparecieron bandas inespecíficas. Este hecho podría deberse a un bloqueo ineficiente, a una alta concentración de anticuerpo primario dirigido a TRPV1, a una baja especificidad de este o a lavados insuficientes. Debido a estos resultados, fue necesario llevar a cabo una optimización de las condiciones y modificar el protocolo.

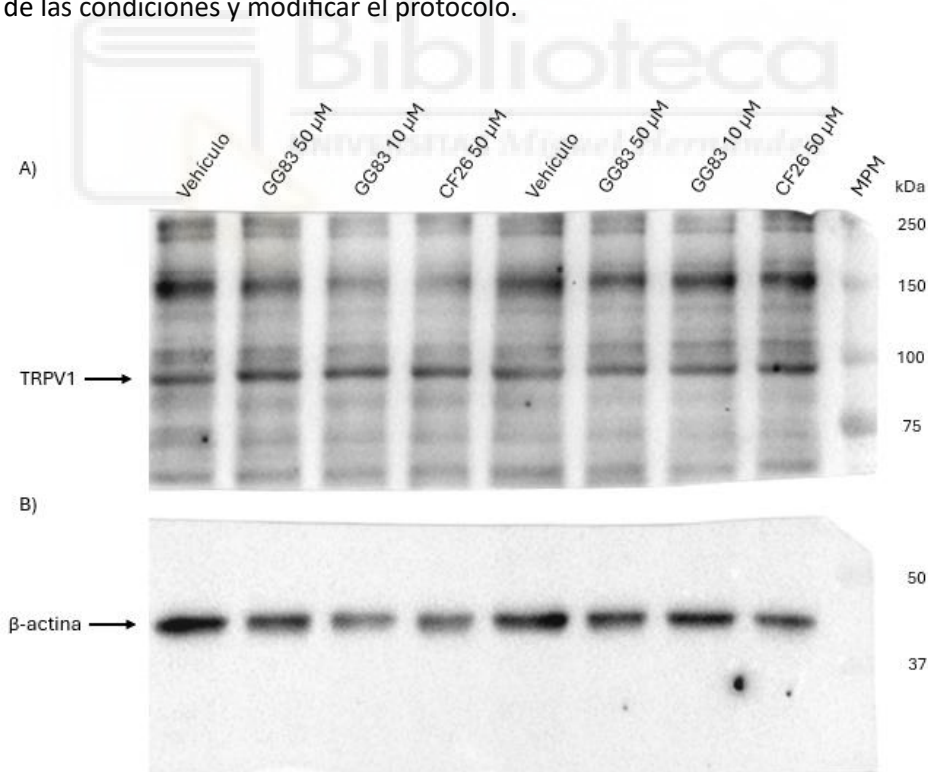


Figura 12. Revelado del Western Blot realizado con el protocolo inicial. El vehículo corresponde a DMSO 1%. A) Resultados de TRPV1. B) Resultados de la actina.

En primer lugar, para optimizar las condiciones del protocolo, se decidió incrementar (del 1% al 3%) la concentración de BSA empleada para el bloqueo y, por otro lado, se utilizó leche al 3%. Asimismo,

de forma paralela, se probó otro protocolo que empleaba BSA 3% pero con el sistema BLOT Holder Snap debido a que disminuye el tiempo de incubación de los anticuerpos y de los lavados. Además, también se disminuyó la concentración del anticuerpo primario (anti-TRPV1) de 1:200 a 1:500 en los tres casos. Los resultados obtenidos de esta primera fase se encuentran en la Figura 13.

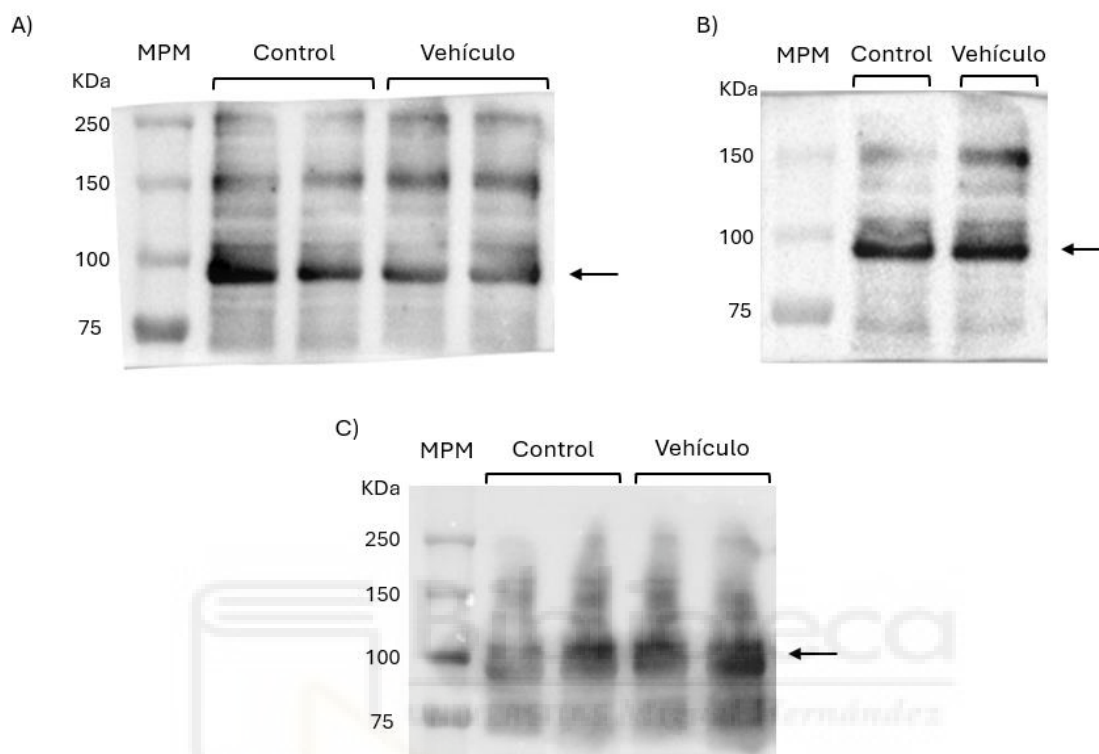


Figura 13. Resultados del Western Blot de TRPV1 tras la modificación del protocolo inicial. El control y el vehículo corresponden a medio de cultivo y DMSO 1%, respectivamente. A) Resultados del protocolo inicial modificado, empleando BSA 3% como agente bloqueador. B) Resultados del protocolo inicial modificado, empleando leche 3% como agente bloqueador. C) Resultados del protocolo alternativo, empleando el sistema BLOT Holder Snap y BSA al 3% como agente bloqueador.

Como se puede apreciar, tras estas modificaciones siguen apareciendo bandas inespecíficas, siendo más notorias en el caso del BSA 3%. Por todo ello, se decide descartar la opción del bloqueo con BSA e incrementar la concentración de leche (del 3% al 5%) en ambos protocolos. Sin embargo, el sistema BLOT Holder Snap no admite la leche a concentraciones superiores al 0,5%. Es por ello por lo que se decidió juntar ambos protocolos, estableciendo así el empleado finalmente para probar los compuestos (ver Apartado 3.5). En la Figura 14 se puede ver el resultado tras optimizar el protocolo, donde se aprecia la banda específica de TRPV1.

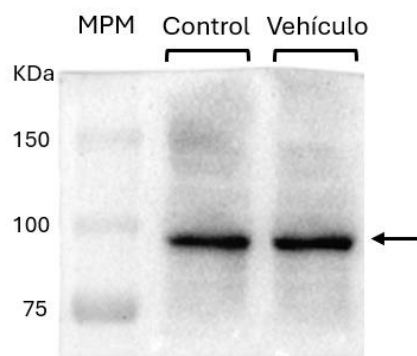


Figura 14. Resultados del Western Blot de TRPV1 tras la optimización. Se aprecia la banda de TRPV1 a la altura del peso molecular de 100 kDa. El control y el vehículo corresponden a medio de cultivo y DMSO 1%, respectivamente.

Sin embargo, en el caso de la actina, esta mostró problemas de visualización durante el revelado, debido probablemente al aumento de la concentración del agente bloqueante. Por tanto, y dado que la actina se apreciaba correctamente en el protocolo inicial, se decidió tratarla con BSA 3%.

Finalmente, se realizaron varios Western Blot con los compuestos GG256 y CF26 (Figura 15). El compuesto GG83 no pudo ser empleado debido a que se había agotado y no había posibilidad de sintetizar más cantidad. Tras realizar el ensayo, se midió la intensidad para poder estimar la ausencia o presencia de TRPV1. Los resultados del porcentaje de la cantidad de TRPV1 se encuentran en la Figura 16, y fueron calculados tal y como se explica en el Apartado 3.5.1.

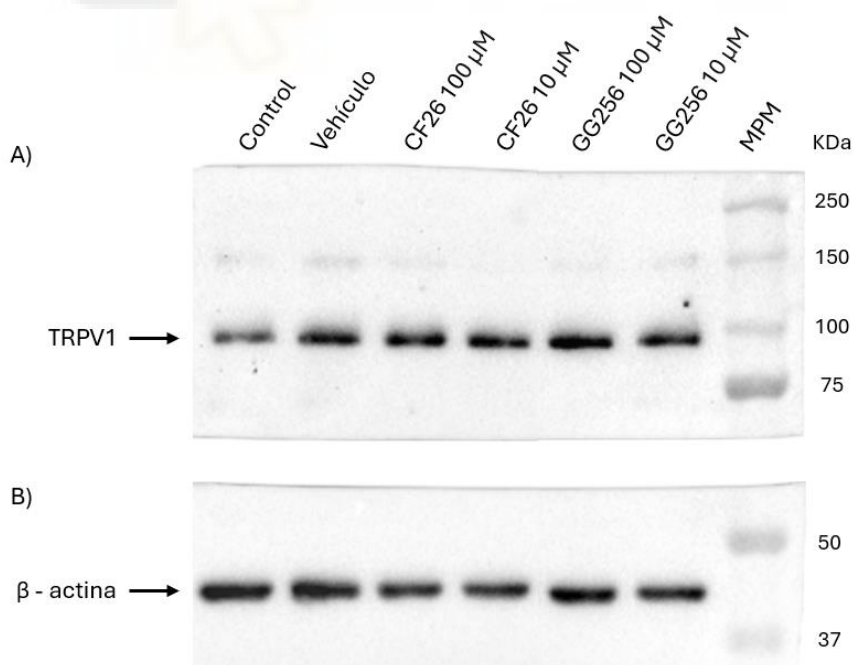


Figura 15. Revelado del Western Blot realizado con el protocolo final. Se muestra el resultado de una de las membranas realizadas. El control y el vehículo corresponden a medio de cultivo y DMSO 1%, respectivamente. A) Resultados de TRPV1. B) Resultados de la actina.

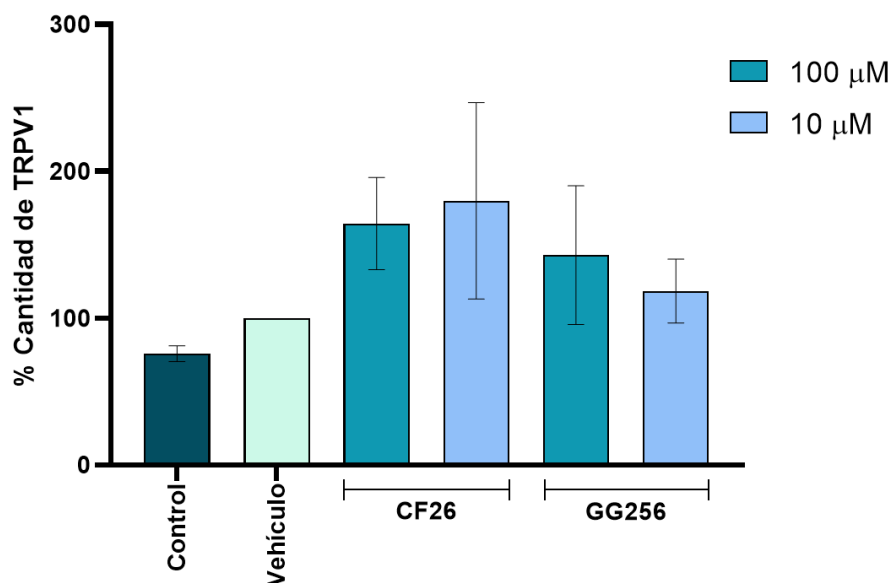


Figura 16. Porcentaje de la cantidad de TRPV1 tras el tratamiento con los compuestos. Los datos representan el porcentaje de la cantidad de proteína normalizada frente a la actina y al vehículo. Se emplearon dos compuestos (CF26 y GG256) a concentraciones de 100 y 10 μ M. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar. N=3, n=2.

En el gráfico se observa el porcentaje de cantidad de proteína TRPV1 en células tratadas con los compuestos analizados a dos concentraciones, normalizada frente a la actina y posteriormente frente al vehículo. Debido a la naturaleza de los compuestos, se esperaba observar una reducción significativa de la señal de TRPV1 como indicativo de que se está promoviendo su degradación por parte del proteasoma.

Sin embargo, en ninguna de las condiciones ensayadas se observa disminución en los niveles de TRPV1, de hecho, los niveles de proteína se vieron incrementados. De igual modo, no se observa diferencia alguna en la intensidad de las bandas de la Figura 15. Esto sugiere que, bajo las condiciones ensayadas, no se puede determinar que los compuestos estén induciendo eficazmente la degradación de TRPV1. Cabe destacar que, en algunos compuestos como CF26 a 10 μ M, la variabilidad observada es bastante elevada. Esto podría explicarse por la formación de agregados o saturación del compuesto. Además, estos compuestos podrían estar modulando la función del canal sin llegar a promover su degradación, lo que podría explicarse si el diseño del PROTAC no logra una ubiquitinación eficiente o si la maquinaria del proteasoma no accede adecuadamente al canal. Otra posible explicación sería que al emplear una línea transfectada, la expresión de TRPV1 se produce de forma excesiva y constante, por lo que no se estaría observando la degradación del canal.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras la realización de los ensayos explicados previamente, los resultados han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. A partir de los ensayos fluorimétricos, se pudo determinar la EC_{50} de la capsaicina y la IC_{50} del rojo rutenio, siendo $12,41 \pm 4,32$ nM y $0,51 \pm 0,15$ μ M respectivamente.
2. La mayoría de los compuestos presentan efecto agonista sobre TRPV1, siendo GG83 el que induce una mayor actividad del canal, efecto observado en los ensayos de actividad.
3. La actividad del canal mostró una disminución significativa en presencia de rojo rutenio en el caso de los compuestos GG83, GG256, CF34, CF36 y CF26, confirmando así su efecto agonista.
4. Los compuestos seleccionados (GG83, GG256 y CF26) no mostraron toxicidad a las concentraciones ensayadas.
5. En el análisis del Western Blot no se observó efecto sobre la degradación de TRPV1 por parte de los compuestos ensayados (GG256 y CF26).

Ante la posibilidad de que la línea celular HEK-hTRPV1 sobreexpresa TRPV1 de forma continua y nos impida ver el efecto real de los compuestos ensayados, como perspectivas futuras, sería interesante emplear otra que produzca el canal de forma fisiológica o hacer uso de compuestos como la cicloheximida para bloquear la síntesis de proteínas y, de este modo, poder observar si los compuestos degradan TRPV1. Por otro lado, podría realizarse otro tipo de ensayos como la microscopía de inmunofluorescencia, citometría de flujo o un ensayo de ubiquitinación seguido de un Western Blot para comprobar si existe realmente degradación por parte del proteasoma, ya que el análisis del Western Blot realizado no ha resultado ser determinante. Además, podría ser útil explorar un rango más amplio de concentraciones y se deberían incluir estudios de selectividad de los compuestos al canal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, M. A. (2020). Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chemico-Biological Interactions*, 330, 109178. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>
2. Andrei, C., Zanzfirescu, A., Nițulescu, G. M., Olaru, O. T., & Negreș, S. (2023). Natural Active Ingredients and TRPV1 Modulation: Focus on Key Chemical Moieties Involved in Ligand–Target Interaction. *Plants*, 12(2), 339. <https://doi.org/10.3390/plants12020339>
3. Andresen, M. (2019). Understanding diverse TRPV1 signaling – an update. *F1000Research*, 8, 1978. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20795.1>
4. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824. <https://doi.org/10.1038/39807>
5. Chameassian, A., Payne, M., Gordon, I., Zhou, M., & Gereau, R. (2025). *Small molecule-mediated targeted protein degradation of voltage-gated sodium channels involved in pain*. <https://doi.org/10.1101/2025.01.21.634079>
6. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant. *Nature*, 224(5216), 285-287. <https://doi.org/10.1038/224285a0>
7. Diver, M. M., Lin King, J. V., Julius, D., & Cheng, Y. (2022). Sensory TRP Channels in Three Dimensions. *Annual Review of Biochemistry*, 91(1), Article 1. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-105738>
8. Fernandes, E., Fernandes, M., & Keeble, J. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 510-521. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x>
9. Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2022). TRPV1 in chronic pruritus and pain: Soft modulation as a therapeutic strategy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 930964. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.930964>

10. Fernández-Carvajal, A., González-Muñiz, R., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2020). Investigational drugs in early phase clinical trials targeting thermotransient receptor potential (thermoTRP) channels. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29(11), 1209-1222. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1825680>
11. Frias, B., & Merighi, A. (2016). Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules*, 21(6), 797. <https://doi.org/10.3390/molecules21060797>
12. Gao, N., Li, M., Wang, W., Liu, Z., & Guo, Y. (2024). The dual role of TRPV1 in peripheral neuropathic pain: Pain switches caused by its sensitization or desensitization. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 17, 1400118. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1400118>
13. Garami, A., Shimansky, Y. P., Rumbus, Z., Vizin, R. C. L., Farkas, N., Hegyi, J., Szakacs, Z., Solymar, M., Csenkey, A., Chiche, D. A., Kapil, R., Kyle, D. J., Van Horn, W. D., Hegyi, P., & Romanovsky, A. A. (2020). Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacology & Therapeutics*, 208, 107474. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107474>
14. Gharbi, Y., & Mercado, R. (2024). A comprehensive review of emerging approaches in machine learning for *de novo* PROTAC design. *Digital Discovery*, 3(11), 2158-2176. <https://doi.org/10.1039/D4DD00177J>
15. Hanzl, A., & Winter, G. E. (2020). Targeted protein degradation: Current and future challenges. *Current Opinion in Chemical Biology*, 56, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.012>
16. Huang, J., Korsunsky, A., Yazdani, M., & Chen, J. (2024). Targeting TRP channels: Recent advances in structure, ligand binding, and molecular mechanisms. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1334370. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1334370>
17. Kalia, J., & Swartz, K. J. (2013). Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Scientific Reports*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep01523>

18. Kärki, T., & Tojkander, S. (2021). TRPV Protein Family—From Mechanosensing to Cancer Invasion. *Biomolecules*, 11(7), 1019. <https://doi.org/10.3390/biom11071019>
19. Koivisto, A.-P., Belvisi, M. G., Gaudet, R., & Szallasi, A. (2022). Advances in TRP channel drug discovery: From target validation to clinical studies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(1), 41-59. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>
20. Li, Z., Ma, S., Zhang, S., Ma, Z., Du, L., & Li, M. (2023). Degradation of extracellular and membrane proteins in targeted therapy: Status quo and quo vadis. *Drug Discovery Today*, 28(9), 103716. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103716>
21. Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107-112. <https://doi.org/10.1038/nature12822>
22. Liu, J., Ma, J., Liu, Y., Xia, J., Li, Y., Wang, Z. P., & Wei, W. (2020). PROTACs: A novel strategy for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 67, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.006>
23. Liu, Y., Gong, X.-Y., Qiao, P.-Y., Wu, Z.-W., Li, R., & Zhang, L.-Y. (2023). Exploring the TRP channel superfamily: Research hotspots and development trends from function to disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27(20), 9478-9498. https://doi.org/10.26355/eurev_202310_34122
24. López-García, J., Lehocık, M., Humpolíček, P., & Sába, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 43-57. <https://doi.org/10.3390/jfb5020043>
25. Maximiano, T. K. E., Carneiro, J. A., Fattori, V., & Verri, W. A. (2024). TRPV1: Receptor structure, activation, modulation and role in neuro-immune interactions and pain. *Cell Calcium*, 119, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2024.102870>

26. Minke, B., Wu, C.-F., & Pak, W. L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*, 258(5530), 84-87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>
27. Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313-1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)
28. Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
29. Nilius, B., & Szallasi, A. (2014). Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 676-814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>
30. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., & Tominaga, M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 8002-8006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1337252100>
31. Ocaña, A., & Pandiella, A. (2020). Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01672-1>
32. Ortiz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I., Simon, S. A., Hiriart, M., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1715972115>
33. Peng, G., Shi, X., & Kadowaki, T. (2015). Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 84, 145-157. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.016>
34. Petersen, C. C., Berridge, M. J., Borgese, M. F., & Bennett, D. L. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: Expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of

- vertebrate homologues. *Biochemical Journal*, 311(1), 41-44.
<https://doi.org/10.1042/bj3110041>
35. Pumroy, R. A., Fluck, E. C., Ahmed, T., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2020). Structural insights into the gating mechanisms of TRPV channels. *Cell Calcium*, 87, 102168.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102168>
36. Rohacs, T. (2014). Phosphoinositide Regulation of TRP Channels. En B. Nilius & V. Flockerzi (Eds.), *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (Vol. 223, pp. 1143-1176). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_18
37. Rosenbaum, T., & Islas, L. D. (2023). Molecular Physiology of TRPV Channels: Controversies and Future Challenges. *Annual Review of Physiology*, 85(1), 293-316.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030222-012349>
38. Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C. M., & Deshaies, R. J. (2001). Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8554-8559. <https://doi.org/10.1073/pnas.141230798>
39. Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., & Planells-Cases, R. (2012). Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19462-19471.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>
40. Sasso, J. M., Tenchov, R., Wang, D., Johnson, L. S., Wang, X., & Zhou, Q. A. (2023). Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic. *Biochemistry*, 62(3), 601-623. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00245>
41. Schumacher, M. A., Moff, I., Sudanagunta, S. P., & Levine, J. D. (2000). Molecular Cloning of an N-terminal Splice Variant of the Capsaicin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2756-2762. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2756>

42. Seebohm, G., & Schreiber, J. A. (2021). Beyond Hot and Spicy: TRPV Channels and their Pharmacological Modulation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 55(S3), Article S3. <https://doi.org/10.33594/000000358>
43. Segerdahl, M., Rother, M., Halldin, M. M., Popescu, T., & Schaffler, K. (2024). Topically applied novel TRPV1 receptor antagonist, ACD440 Gel, reduces evoked pain in healthy volunteers, a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *European Journal of Pain*, 28(10), 1656-1673. <https://doi.org/10.1002/ejp.2299>
44. Snyder, L. B., Neklesa, T. K., Willard, R. R., Gordon, D. A., Pizzano, J., Vitale, N., Robling, K., Dorso, M. A., Moghrabi, W., Landrette, S., Gedrich, R., Lee, S. H., Taylor, I. C. A., & Houston, J. G. (2025). Preclinical Evaluation of Bavdegalutamide (ARV-110), a Novel PROteolysis TARgeting Chimera Androgen Receptor Degradar. *Molecular Cancer Therapeutics*, 24(4), 511-522. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-23-0655>
45. Song, J., Hu, M., Zhou, J., Xie, S., Li, T., & Li, Y. (2023). Targeted protein degradation in drug development: Recent advances and future challenges. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 261, 115839. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115839>
46. Stewart, J. M. (2020). TRPV6 as A Target for Cancer Therapy. *Journal of Cancer*, 11(2), 374-387. <https://doi.org/10.7150/jca.31640>
47. Treat, A., Henri, V., Liu, J., Shen, J., Gil-Silva, M., Morales, A., Rade, A., Tidgewell, K. J., Kolber, B., & Shen, Y. (2022). Novel TRPV1 Modulators with Reduced Pungency Induce Analgesic Effects in Mice. *ACS Omega*, 7(3), 2929-2946. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05727>
48. Valdes, A. M., De Wilde, G., Doherty, S. A., Lories, R. J., Vaughn, F. L., Laslett, L. L., Maciewicz, R. A., Soni, A., Hart, D. J., Zhang, W., Muir, K. R., Dennison, E. M., Wheeler, M., Leaverton, P., Cooper, C., Spector, T. D., Cicuttini, F. M., Chapman, V., Jones, G., ... Doherty, M. (2011). The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(9), 1556-1561. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.148122>

49. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
50. Xiao, T., Sun, M., Zhao, C., & Kang, J. (2023). TRPV1: A promising therapeutic target for skin aging and inflammatory skin diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1037925. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1037925>
51. Yang, D., Luo, Z., Ma, S., Wong, W. T., Ma, L., Zhong, J., He, H., Zhao, Z., Cao, T., Yan, Z., Liu, D., Arendshorst, W. J., Huang, Y., Tepel, M., & Zhu, Z. (2010). Activation of TRPV1 by Dietary Capsaicin Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation and Prevents Hypertension. *Cell Metabolism*, 12(2), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.015>
52. Yang, F., & Zheng, J. (2017). Understand spiciness: Mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein & Cell*, 8(3), 169-177. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>
53. Zhang, M., Ma, Y., Ye, X., Zhang, N., Pan, L., & Wang, B. (2023). TRP (transient receptor potential) ion channel family: Structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 261. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
54. Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M., & Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila trp* gene. *FEBS Letters*, 373(3), 193-198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01038-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01038-G)

ANEXOS

1. Protocolo Western Blot inicial

Se sembraron las células HEK-hTRPV1 en placas de 6 pocillos a una concentración de 740.000 células/pocillo. Se realizaron tratamientos con los compuestos seleccionados (a 10 μ M y 50 μ M) y con vehículo (DMSO 1%) durante 6 y 24 horas. Tanto los compuestos como el vehículo se testaron por duplicado. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con 500 μ L de *buffer* RIPA (50 mM Tris-base pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 0,5% deoxicolato de sodio) con inhibidor de proteasa a una concentración de 1:100. Para separarlas de la superficie del pocillo se empleó la técnica de raspado.

Una vez recogidas las muestras en tubos Eppendorf, se llevó a cabo la extracción de proteínas. Para ello, se mantuvieron en agitación vigorosa (125 rpm) durante 40 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos.

Por otro lado, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de proteína contenida en cada muestra mediante el método Bradford usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific). La absorbancia se midió a 562 nm en el lector de placas POLARstar.

Conocida dicha concentración, se prepararon las muestras con 20 μ g de proteína total en *Loading Buffer* 10X (0,6 M Tris-HCl pH 6,8; 1% Bromofenol; 50% Glicerol; 400 mM DTT; 20% SDS) y se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para su separación por tamaño. La transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se realizó empleando el sistema Tank Blotting, aplicando un voltaje de 40 V a 4°C durante la noche.

Las membranas se incubaron con BSA al 5% en TBST *Buffer* 1X (100 mM Tris-base pH 7,5; 750 mM NaCl; 0,5% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear posibles interacciones inespecíficas. Posteriormente, con el objetivo de detectar las proteínas diana y control (Actina), las membranas se incubaron con el anticuerpo primario *Rabbit* anti-TRPV1 o anti-Actin en agitación a 4°C durante la noche. Tras ello, se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBST *Buffer* en agitación suave y se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (*Anti-Rabbit* IgG-HRP) a una concentración de 1:25.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron de nuevo las membranas como anteriormente.

Finalmente, el revelado se realizó empleando un sustrato quimioluminiscente, señal detectada por el fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System. Los resultados se analizaron con los programas ImageLab y Microsoft Excel.