



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología y Terapéutica

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE BLOQUEO DE  
CANALES DE CALCIO NEURONALES  
DE COMPUESTOS ORGÁNICOS AISLADOS DE  
ESPECIES DEL *PHYLUM PORIFERA***

**TESIS DOCTORAL**

**ROCÍO MARINA ÁLVAREZ VILLALOBOS**

Director

Dr. Luis Gandía Juan

**Madrid, noviembre de 2007**

---

# ÍNDICE GENERAL

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Abreviaturas y acrónimos

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Marco del estudio .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Los compuestos naturales de organismos marinos.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Ecología de los compuestos naturales de origen marino .....	3
1.2.2 El <i>phylum Porifera</i> .....	6
Características generales .....	6
Definición y morfología .....	7
Clasificación.....	10
Fisiología .....	12
1.2.3 Importancia biomédica de los compuestos aislados de organismos marinos: relevancia del <i>phylum Porifera</i> .....	13
1.2.4 La esponja marina <i>Aplysina cavernicola</i> .....	16
Compuestos aislados de <i>Aplysina cavernicola</i> .....	18
1.2.5 La esponja marina <i>Leucetta primigenia</i> .....	19
Compuestos aislados de <i>Leucetta primigenia</i> .....	19
<b>1.3 Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV).....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Estructura molecular de los CCDV .....	22
1.3.2 Biología molecular de los CCDV: nomenclatura estructural .....	22
1.3.3 Propiedades biofísicas y farmacología de los CCDV.....	25
1.3.4 Farmacología molecular de los CCDV y mecanismos de bloqueo .....	29
1.3.5 Distribución y función de los CCDV .....	32
1.3.6 Los CCDV como diana terapéutica.....	33
<b>1.4 La célula cromafín de la médula suprarrenal.....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Las glándulas suprarrenales.....	35
1.4.2 La célula cromafín de la médula adrenal: un modelo de neurosecreción.....	36
1.4.3 Canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín bovina (CCB) y su farmacología.....	38

---

<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Compuestos .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Aislamiento y cultivo primario de células cromafines bovinas .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Registros electrofisiológicos .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 La técnica de <i>patch-clamp</i> .....	47
3.3.2 Medición de corrientes totales a través de canales de $Ca^{2+}$ en la configuración de célula entera y en modo de fijación de voltaje .....	50
<b>3.4 Materiales y reactivos.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Estadística .....</b>	<b>52</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Aislamiento y determinación del perfil de la corriente de bario (<math>I_{Ba}</math>)         control .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 Efecto de los compuestos naturales sobre la magnitud de las <math>I_{Ba}</math>.....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Efecto de los derivados de bromotirosina sobre la magnitud de la $I_{Ba}$ en función de la concentración.....	63
<b>4.3 Efecto de los compuestos naturales marinos sobre la relación corriente-         voltaje.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4 Efecto de los compuestos naturales marinos sobre la <math>I_{Ba}</math> remanente tras         la aplicación de nifedipino .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5 Efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la magnitud de las <math>I_{Ba}</math>         en células cromafines de ratón .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6 Efecto del derivado de síntesis NP04634 sobre la magnitud de la <math>I_{Ba}</math> en         CCB.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7 Efecto de NP04634 sobre la relación <math>I-V</math> .....</b>	<b>71</b>
<b>4.8 Efecto de NP04634 sobre los CCDV no-L .....</b>	<b>72</b>
4.8.1 Efecto del nifedipino sobre la $I_{Ba}$ tras la aplicación de NP04634.....	72
4.8.2 Efecto del NP04634 sobre la $I_{Ba}$ remanente tras la aplicación de nifedipino .....	72
<b>4.9 Disección farmacológica de los CCDV tipo P/Q y tipo-N en las CCB .....</b>	<b>74</b>

4.9.1 Efecto de NP04634 sobre el pico de la $I_{Ba}$ tras la aplicación de nifedipino y $\omega$ -conotoxina GVIA .....	74
4.9.2 Efecto de NP04634 sobre la $I_{Ba}$ tras la aplicación de nifedipino y $\omega$ -agatoxina IVA.....	76
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## **Ilustración de una esponja.....6**

*Pheronema giganteum* (Hexactinellidae) A glass sponge  
The Challenger Reports, Volumen XXI, lámina XLIV.

## **INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 1.</b> Estrategias de defensa química de las esponjas marinas.....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema de la morfología general de los espongiarios .....	7
<b>Figura 3.</b> Esquema de los tipos estructurales fundamentales de los espongiarios.....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de un coanocito y de la cámara flagelada.....	9
<b>Figura 5.</b> Micrografías de espículas .....	11
<b>Figura 6.</b> Micrografía electrónica de bacterias presentes en el tejido de la esponja <i>Aplysina cavernicola</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Derivados de bromotirosina y biotransformación de compuestos en esponjas del género <i>Aplysina</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Esponjas marinas y algunos de sus principales metabolitos secundarios .....	21
<b>Figura 9.</b> Estructura esquemática de los CCDV .....	23
<b>Figura 10.</b> Poro iónico y sensor de voltaje de los CCDV.....	24
<b>Figura 11.</b> Moléculas orgánicas antagonistas de los CCDV .....	26
<b>Figura 12.</b> Posibles interacciones farmacológicas de los antagonistas de CCDV con el canal.....	30
<b>Figura 13.</b> Glándulas adrenales y células cromafines .....	37
<b>Figura 14.</b> Sinápsis esplácnico-cromafín.....	39

---

**MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Figura 15.</b> <i>Patch-clamp</i> .....	49
--	----

**RESULTADOS**

<b>Figura 16.</b> Corrientes globales en presencia de 2 mM de $\text{Ca}^{2+}$ extracelular.....	56
<b>Figura 17.</b> Corrientes globales en 2 mM de $\text{Ca}^{2+}$ y 10 mM de $\text{Ba}^{2+}$ extracelular .....	58
<b>Figura 18.</b> Inhibición de la $I_{\text{Ba}}$ inducida por los compuestos homólogos aerotionina y homoaerotionina en las CCB.....	60
<b>Figura 19.</b> Inhibición de la $I_{\text{Ba}}$ inducida por la 11,19-dideoxifistularina .....	61
<b>Figura 20.</b> Inhibición de la $I_{\text{Ba}}$ inducida por leucetamol B .....	62
<b>Figura 21.</b> Inhibición concentración-dependiente de la $I_{\text{Ba}}$ inducida por los compuestos de la esponja marina <i>Aplysina cavernicola</i> .....	63
<b>Figura 22.</b> Efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la relación <i>I-V</i> .....	65
<b>Figura 23.</b> Inhibición de la $I_{\text{Ba}}$ por los derivados de bromotirosina en presencia de nifedipino.....	66
<b>Figura 24.</b> Inhibición de las $I_{\text{Ba}}$ por leucetamol B en presencia de nifedipino .....	67
<b>Figura 25.</b> Efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la $I_{\text{Ba}}$ en células cromafines de ratón.....	68
<b>Figura 26.</b> Efecto del NP04634 sobre la $I_{\text{Ba}}$ en CCB.....	69
<b>Figura 27.</b> Inhibición concentración-dependiente del pico de la $I_{\text{Ba}}$ inducida por la 11,19- dideoxifistularina y su derivado de síntesis NP04634.....	70
<b>Figura 28.</b> Efecto del NP04634 sobre la relación <i>I-V</i> en CCB.....	71
<b>Figura 29.</b> Efecto del NP04634 sobre los CCDV no-L en CCB .....	73
<b>Figura 30.</b> Efecto del NP04634 sobre los CCDV tipo-P/Q y tipo-N .....	75
<b>Figura 31.</b> Gráfica comparativa del efecto del NP04634 sobre CCDV no-L.....	76

**TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Principales productos naturales marinos en desarrollo clínico.....	14
<b>Tabla 2.</b> Diversidad estructural y de bioactividad de los compuestos aislados de esponjas marinas .....	15
<b>Tabla 3.</b> Antecedentes de las esponjas marinas con compuestos en estudio .....	17
<b>Tabla 4.</b> Canales Ca <sub>v</sub> 1 .....	27
<b>Tabla 5.</b> Canales Ca <sub>v</sub> 2 y Ca <sub>v</sub> 3 .....	28
<b>Tabla 6.</b> Importancia farmacológica de los distintos canales Ca <sub>v</sub> .....	34
<b>Tabla 7.</b> Compuestos en estudio .....	45

---

## Abreviaturas y acrónimos

<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AgaIVA</b>	$\omega$ -Agatoxina-IVA
<b>CCB</b>	Células cromafines bovinas
<b>CCDV</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E</b>	Potencial de membrana
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol-bis- ( $\beta$ -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraacético
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GVIA</b>	$\omega$ -conotoxina-GVIA
<b>HEPES</b>	Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico])
<b>HP</b>	Potencial de fijación
<b>HVA</b>	CCDV de alto umbral de activación (de " <i>high-voltage activated</i> ")
<b><math>I_{Ca}</math></b>	Corriente de calcio
<b><math>I_{Ba}</math></b>	Corriente de bario
<b>LVA</b>	CCDV de bajo umbral de activación (de " <i>low-voltage activated</i> ")
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina



# **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 MARCO DEL ESTUDIO

“Los esfuerzos realizados por mejorar la eficiencia del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, en respuesta al incremento constante de los costos y a la disminución en el número de nuevas estructuras introducidas en el mercado mundial, ha llevado a potenciar la utilización de la química computacional de alto rendimiento y del cribado de alto rendimiento. La aplicación exitosa del cribado aleatorio requiere encontrar un número suficiente de compuestos para estudiar. En este sentido, la mayor ventaja de los productos naturales para el cribado aleatorio es su diversidad estructural, la cual es mayor a la que proveen la mayor parte de las aproximaciones de química combinatoria basadas en compuestos heterocíclicos. Muchos compuestos naturales presentan la ventaja de ser relativamente pequeños (mayores a 1000 Da), y de tener propiedades similares a las de los fármacos ya que pueden ser absorbidos y metabolizados. Además, los productos naturales bioactivos generalmente son parte de una familia de moléculas relacionadas de modo que es posible aislar homólogos y así obtener información de estructura-actividad. Debido a que sólo se ha ensayado la actividad biológica de una pequeña fracción de la biodiversidad estructural existente en el mundo, es posible asumir que los productos naturales continúan ofreciendo nuevos compuestos cabezas de serie para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos” (Harvey, 1999; Garateix, 2005).

Dentro de los productos naturales, los compuestos de origen marino constituyen un amplio grupo de moléculas con una estructura novedosa que hoy son accesibles para el desarrollo de fármacos gracias a las investigaciones multidisciplinarias de la química orgánica, la ecología química marina, la química de productos naturales marinos y la biología molecular, entre otras (Thakur, 2004). Las dificultades técnicas relacionadas con el aislamiento y con la elucidación estructural de los productos naturales marinos se han solucionado gracias a la contribución de muchos y diferentes investigadores de productos naturales (Faulkner, 2002; Mayer y *col.*, 2007). Todas estas disciplinas han ayudado en los últimos 40 años para que la diversidad química que existe en el mar esté hoy más que nunca antes, disponible para el desarrollo biotecnológico, para el descubrimiento de nuevos fármacos y para el estudio de los mecanismos que median su acción.

La compañía bio-farmacéutica española Neuropharma, centrada en la investigación y desarrollo de fármacos novedosos para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas en base a la explotación de todos los recursos de biodiversidad estructural ofrecidos por el mar, se planteó como uno de sus objetivos encontrar fármacos neuroprotectores de naturaleza no peptídica con actividad sobre los canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV) de tipo neuronal, para lo cual desarrolló mediante un cribado, la evaluación biológica de extractos de diversos organismos marinos y de una librería de compuestos aislados de estos extractos sobre la alteración de la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por alto  $\text{K}^{+}$  en la línea celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y.

Tras este cribado inicial, tres compuestos mostraron propiedades neuroprotectoras; los compuestos homólogos aerotionina y homoaerotionina, y la 11,19-dideoxifistularina provenientes de la esponja marina *Aplysina cavernicola*; el leucetamol B aislado de la esponja *Leucetta primigenia* también fue seleccionado (Martinez y col., 2005). Neuropharma realizó la síntesis de derivados de estos compuestos.

Esta Tesis se enmarca en el ámbito de la farmacología marina y de la farmacología de los CCDV y es un estudio electrofisiológico centrado en evaluar y caracterizar la acción de estos cuatro compuestos de naturaleza no peptídica aislados de esponjas marinas, y de sus análogos de síntesis, sobre los CCDV, utilizando como modelo experimental la célula cromafín bovina.

## **1.2 LOS COMPUESTOS NATURALES DE ORGANISMOS MARINOS**

### **1.2.1 Ecología de los compuestos naturales de origen marino**

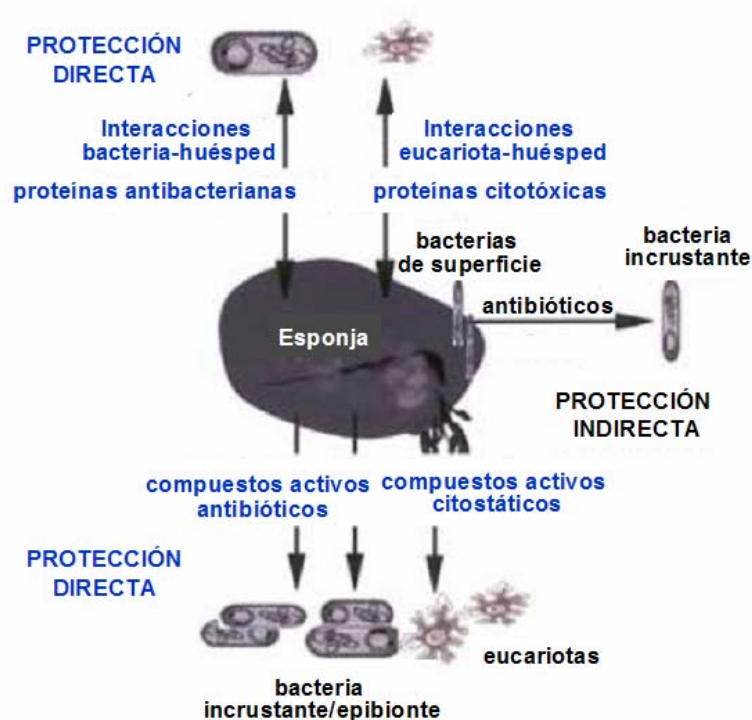
Las propiedades físicas y químicas que presenta el medio ambiente marino, que influyen profundamente en la biología del océano, son muy distintas a las del medio terrestre. Entre las propiedades más importantes encontramos la alta densidad del medio acuático que hace posible la existencia y la comunicación química de una gran

comunidad flotante de plantas y animales (mayoritariamente microscópicos) una baja absorción de la luz, lo cual permite que la fotosíntesis se lleve a cabo sólo en una zona estrecha de la superficie, y la prevalencia entre las especies marinas de material esquelético dominado por proteínas en vez de carbohidratos. Debido a estas propiedades, en el medio ambiente marino existe una gran complejidad en la cadena trófica, en comparación con el medio terrestre. Estas propiedades han dado como resultado una gran abundancia de animales sésiles filtradores, que sirven como un excelente sustrato para organismos simbioses y epibioses, inexistentes o raros en los ecosistemas terrestres (Scheuer, 1990).

Los principales animales sésiles filtradores son las esponjas marinas. Los estudios de ecología química han permitido evidenciar que los animales pertenecientes a los *phyla Porifera* y *Bryozoa* son los que presentan la mayor diversidad en la producción de metabolitos secundarios (Muller y *col.*, 2003) y que la función de estos compuestos en su hábitat natural está ligada a varios aspectos relacionados con la supervivencia de la especie, aceptándose de manera general que el éxito ecológico de las esponjas depende en gran parte de la eficacia de los mecanismos de defensa basados principalmente en la acumulación de compuestos secundarios tóxicos o disuasivos (Bakus y *col.*, 1986). Sólo pocas especies de peces utilizan las esponjas como su dieta principal (Randall y Hartman, 1968), lo cual indica la importancia ecológica de estos metabolitos para los respectivos invertebrados, siendo corroborado por numerosos estudios que describen la acumulación de productos tóxicos naturales con un papel como defensa química para luchar contra potenciales predadores (ej. peces) (Pawlik y *col.*, 1995; Lindel y *col.*, 2000) o para hacer retroceder a especies vecinas compitiendo por el espacio. Las propiedades defensivas de las esponjas basadas en sustancias químicas nocivas (defensa química) son, por tanto, altamente efectivas en disuadir la predación (Proksch, 1994; Abdelgawwad, 2004).

La mayoría de los productos secundarios obtenidos de las esponjas han sido aislados del cuerpo completo de los animales. Sin embargo, se ha observado en ciertos casos que sólo el tejido exterior contiene las sustancias disuasivas (Abdelgawwad, 2004).

Los metabolitos pueden ser obtenidos por medio de la dieta, por “síntesis de novo” (Turon y *col.*, 2000) y también existe una creciente evidencia de que muchos compuestos, en particular poliketidos y péptidos de síntesis no ribosomal, no son producidos por los propios animales sino por una asociación con bacterias simbiotes, que en algunas especies pueden llegar a ocupar entre el 40 al 60% del volumen de tejido de la esponja e involucra a una gran población de procariotas de múltiples especies (Wilkinson, 1984; Taylor y *col.*, 2007). Las más comúnmente identificadas son bacterias heterotróficas y cianobacterias (Usher y *col.*, 2004). Sin embargo, aún no se conocen con certeza los mecanismos por los cuales se establece y se mantiene la asociación entre las esponjas y los microorganismos, y se sabe muy poco sobre la comunicación o intercomunicación química entre ambos (Taylor y *col.*, 2007).



**Figura 1. Estrategias de defensa química de las esponjas marinas.** Contra la invasión de bacterias y de organismos eucariotas las esponjas presentan una protección directa mediante producción de metabolitos secundarios y una protección indirecta con la ayuda de bacterias asociadas productoras de metabolitos secundarios (Thakur, 2004).

Como bien señala Wessjohann (2000), desde el punto de vista aplicado, el campo de estudio de la ecología química de los poríferos tiene un gran potencial beneficioso para los

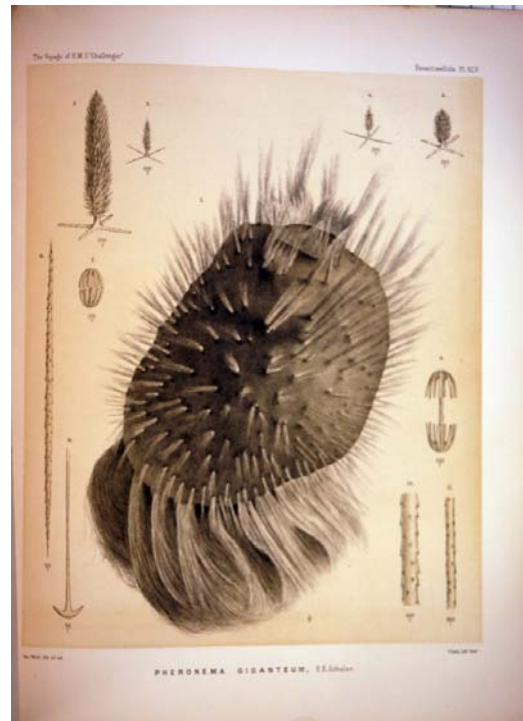
humanos, teniendo en cuenta que la diversidad química de los compuestos naturales bioactivos es mucho mayor que la de los compuestos sintetizados por la química combinatoria estándar y que adicionalmente abarca una impresionante selectividad, el alto valor de los metabolitos secundarios de fuente natural en general, y de las esponjas en particular, sólo puede llegar a ser considerado de manera imperfecta.

### 1.2.2 El *phylum Porifera*

#### Características generales

El *phylum Porifera* (del latín, *porus*, “poros”; *ferre*, “llevar”)(Brusca y Brusca, 2005) reúne a los animales pluricelulares (metazoos) más primitivos conocidos, las esponjas marinas. Abarca una población de aproximadamente 7.000 especies descritas y se estima que este número podría superar las 15.000 (Hooper y col., 2002).

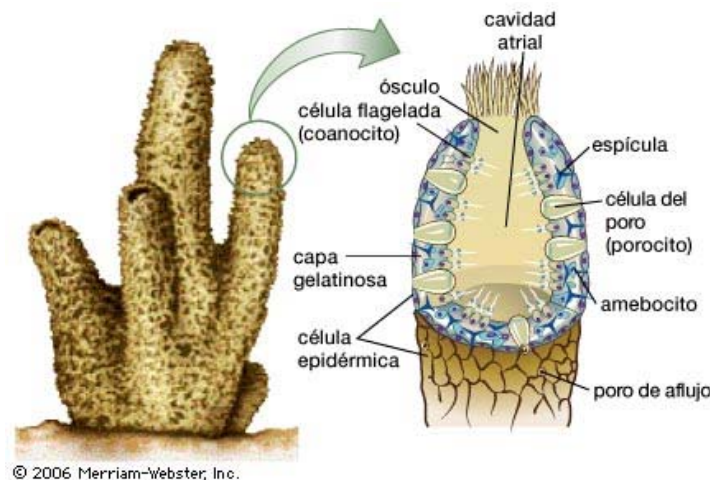
El *phylum Porifera* ha sido muy exitoso durante la historia de la tierra y se ubica entre los más diversos de los 28 *phyla* de invertebrados acuáticos que existen actualmente. Emergió hace unos 600 a 800 millones de años (Muller y col., 2001) y hoy en día está presente en todos los hábitat acuáticos desde aguas someras hasta las zonas marinas abisales (Hooper y col., 2002), incluyendo las zonas templadas y polares, agua dulce y salada, siendo uno de los principales grupos de las comunidades del fondo marino (bentónicas) tanto por su biomasa como por el número de especies existentes (Becerro y col., 2003) así como por su gama de características morfológicas. A pesar de no haber modificado su diseño estructural básico desde el período cámbrico tardío, es decir, durante unos 509 millones de años, los poríferos han demostrando una enorme capacidad de



adaptación y de supervivencia en situaciones de vida poco ventajosas (Hooper y *col.*, 2002).

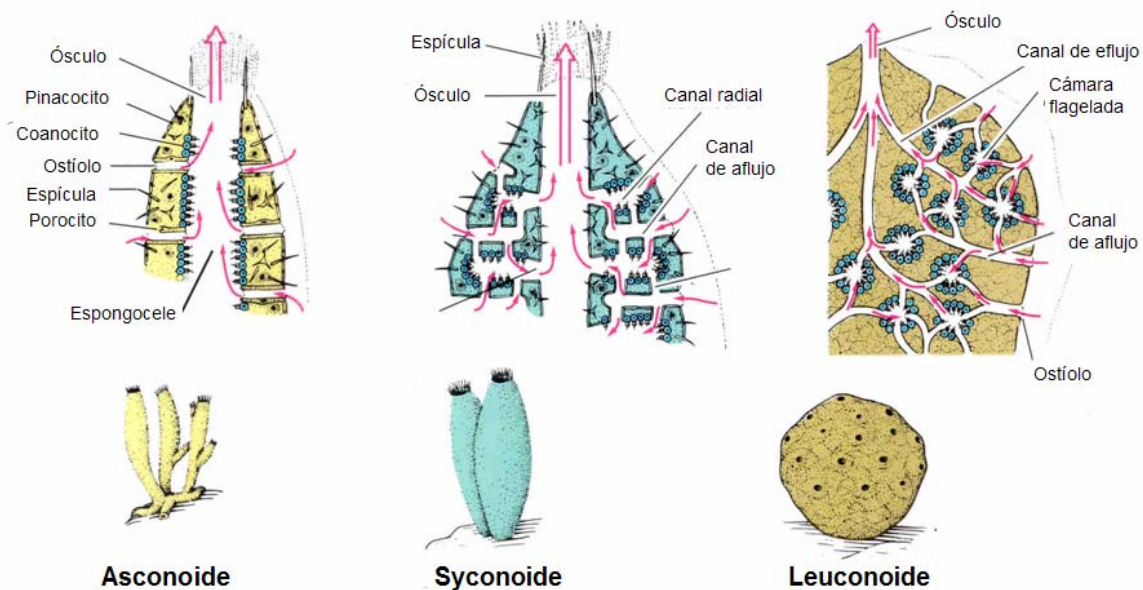
### Definición y morfología

Las esponjas son metazoarios sésiles con un sistema acuífero diferenciado. Las más primitivas tienen forma de vasija y reciben el nombre de esponjas de tipo ascon, en las que aparece una cavidad central, el atrio o espongocele. En este tipo de esponjas, la pared del cuerpo se compone de una capa externa de pinacocitos (pinacodermo), una capa media o mesohilo (también llamada mesoglea) que contiene amebocitos y elementos esqueléticos y una capa interior (coanodermo), que tapiza el atrio, constituida por una capa de células provistas de un collar y un flagelo, denominadas coanocitos. El batido de los flagelos de la capa de coanocitos provoca un flujo inhalante de agua desde el exterior hacia el atrio, a través de unos poros externos de la pared del cuerpo (10-100  $\mu\text{m}$  diámetro), y un flujo exhalante desde el atrio hacia el exterior, a través de una abertura amplia denominada ósculo.



**Figura 2. Esquema de la morfología general de los espongiarios.** Su superficie está perforada por pequeños poros de aflujo (ostíolos) formados por células tubulares (porocitos), que se abren hacia la cavidad atrial. Una capa media gelatinosa (mesohilo) contiene los elementos esqueléticos (espículas y fibras de esponjina) y también amebocitos con una función activa en la digestión, eliminación de residuos y formación de espículas y esponjina. Las células flageladas (coanocitos) revisten la cavidad atrial, crean corrientes para mover el agua, que contiene oxígeno y alimentos al interior de la esponja, y retienen y digieren las partículas de alimento. El ósculo, encargado de expeler el agua y los desechos, es un orificio cuyo tamaño puede modificarse para regular el flujo de agua a través de la esponja, que en el ejemplo corresponde al tipo ascon. Fuente: Online Art. Encyclopedia Britannica Online.

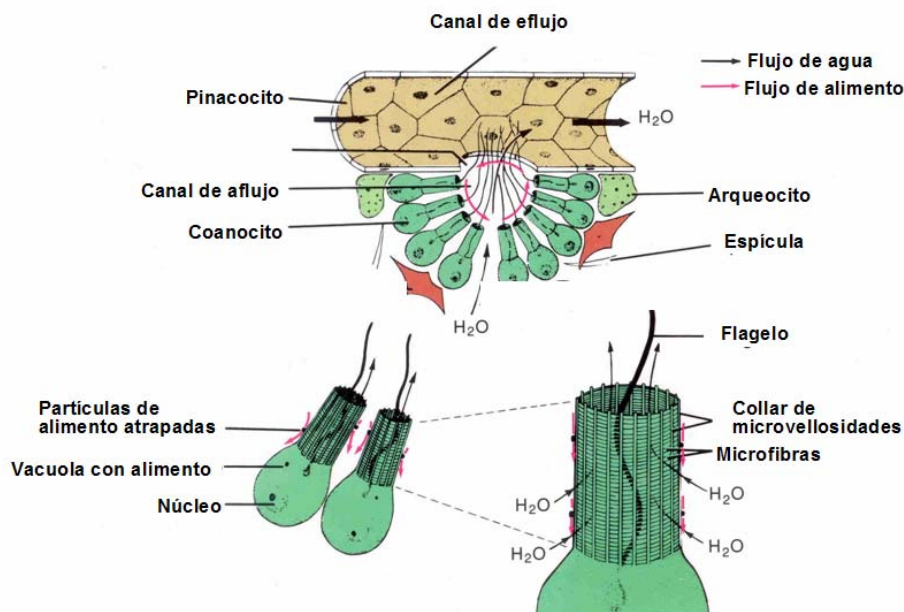
Debido al desigual crecimiento de la superficie con respecto al volumen (en una esfera, la primera crece con el cuadrado del radio, y el segundo con el cubo), el aumento de tamaño de una esponja obliga a la modificación del tipo asconoide, mediante sucesivos pliegues de la pared del cuerpo, para formar un segundo tipo, el siconoide, que consiste en una estructura con múltiples cámaras con coanocitos, comunicadas por un lado con el exterior por canales incurrentes, y por otro con el atrio, que a su vez desemboca y se vacía a través del ósculo. Si aumenta el tamaño, el tipo siconoide (o syconoide) es insuficiente para permitir un adecuado funcionamiento (flujo de agua, alimentación, etc.) y la evolución ha conducido a un tercer tipo de estructura corporal, el leuconoide, en el que aparecen numerosas cámaras de pequeño tamaño en las que se sitúan las células flageladas (coanocitos), y que reciben el nombre de cámaras flageladas, de este modo se puede incrementar la superficie (y por tanto el número) de coanocitos, sin aumentar demasiado el volumen interno de la esponja; más aún, incluso llega a desaparecer el atrio. La mayor parte de las esponjas son del tipo leuconoide (Storch y Welsch, 2001) (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema de los tipos estructurales fundamentales de los espongiarios.** Los poríferos muestran diferentes grados de organización, tipo asconoide, siconoide y leuconoide, siendo considerada la forma elemental de los poríferos el tipo asconoide, con una única cámara vibrátil central grande. Este tipo solamente aparece en algunas esponjas calcáreas, al igual que los tipos siconoides, con las cámaras vibrátiles distribuidas radialmente y un atrio central. Todos los demás poríferos siguen la organización de tipo leuconoide (Storch y Welsch, 2001).



Las corrientes de agua unidireccionales se mantienen por el papel activo de la monocapa de coanocitos contenidos en la cámara. Existen unas 7.000 a 18.000 cámaras por milímetro cúbico, y cada cámara puede bombear aproximadamente 1.200 veces su propio volumen por día. Las partículas de oxígeno son removidas del agua por varios tipos de células, incluyendo los coanocitos. Otras células, como los arqueocitos, células primitivas de tipo ameboide, contribuyen a transportar estos productos respiratorios y de la dieta a través del cuerpo de la esponja, entre otras funciones. La vida de las esponjas depende fundamentalmente de este adecuado flujo de agua a través de sus cámaras flageladas, ya que, además del oxígeno con el agua llega el alimento, salen los productos de desecho, los gametos masculinos (espermatozoides) y los huevos fertilizados. Las esponjas constituyen uno de los grupos animales más eficientes en el filtrado del agua, son capaces de bombear grandes volúmenes de agua, más de 24 m<sup>3</sup>/Kg de esponja/día (Vogel, 1977) de la que extraen diminutas partículas alimenticias que capturan con los *microvilli* del collar de los coanocitos.



**Figura 4. Esquema de un coanocito y de la cámara flagelada.** Los coanocitos son células flageladas que se disponen en monocapa revistiendo una cámara. El movimiento de los flagelos genera un flujo de entrada de agua hacia la cámara. Las partículas de alimento contenidas en el agua quedan atrapadas en el collar de microvellosidades del cuerpo del coanocito, para posteriormente ser almacenadas en vacuolas de su citoplasma. Junto a los coanocitos pueden hallarse espículas y otros tipos celulares como los arqueocitos. (Storch y Welsch, 2001)

En cuanto al tamaño, varían desde formas incrustantes planas y más o menos extensas, con apenas 1 mm de grosor, hasta formas arborescentes de máximamente 3 m de tamaño, de aspecto globular, tubular o con aspecto de cáliz o de tortilla.

Las esponjas carecen de cualquier grado de construcción tisular, pero poseen una gran población de células móviles que se desplazan libremente en el mesohilo confiriendo plasticidad a la organización del cuerpo de la esponja. Entre ellas están los arqueocitos con la característica única de ser células totipotentes, capaces de cambiar sus funciones de acuerdo a los requerimientos de la esponja (secretar el esqueleto, formar la epidermis, convertirse en células reproductivas o de alimento, etc.).

La mayoría de las esponjas son monoicas (es decir, hermafroditas). Los óvulos son fertilizados por el esperma capturado del exterior e introducido en el cuerpo con la corriente acuosa. La fecundación sucede en el mesohilo, y los huevos se desarrollan en el cuerpo de la esponja durante un tiempo, hasta que dan lugar a una larva flagelada, que abandona el cuerpo de la madre (larva parenquímula) y lleva una vida planctónica hasta que se fija al sustrato para dar lugar a una esponja adulta, tras pasar por una fase temprana de tipo ascon denominada olynthus. La mayoría de los grupos tienen una propagación por medio asexual y todas tienen poderes regenerativos que parecen ser vitales para mantener la población local.

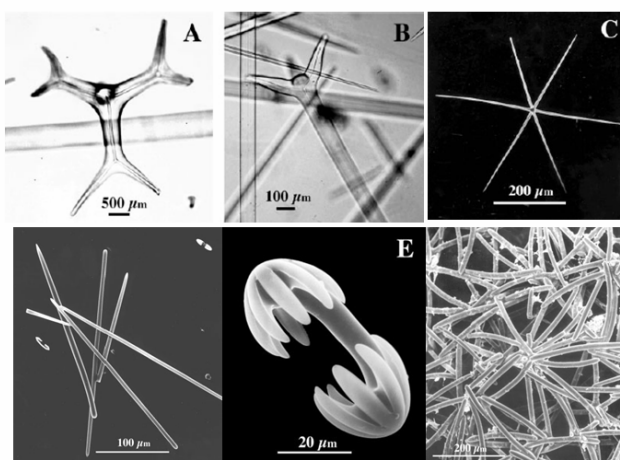
## **Clasificación**

Actualmente se reconocen 4 clases de esponjas, 3 de ellas con especies recientes; Hexactinellidae (Hexactinélida), Demospongiae (Demosponjas) y Calcárea (Hooper y *col.*, 2002).

1. **Clase Hexactinellidae.** A esta clase pertenecen el 7% de las esponjas vivas, aproximadamente unas 500 especies. Son esponjas de aspecto frágil, con coanodermo sincicial, células diferenciadas y pinacodermo, con espículas silíceas de seis puntas (triaxonas). Suelen tener estructura siconoide y pueden alcanzar hasta 1 metro de altura. Normalmente se encuentran a grandes profundidades (de 5 a 6.770 m).

2. **Clase Demospongiae.** Representan el 85 % de las especies de esponjas vivas, aproximadamente 6000 especies. Presentan células diferenciadas, la mayoría tienen un esqueleto de espículas monaxonas o tetraxonas silíceas separadas, aunque algunas tienen fibras de espongina. La estructura es siempre leuconoide.
  
3. **Clase Calcárea.** Con menos de 500 especies esta clase representa menos del 5% de las esponjas. Se trata de esponjas provistas de espículas de carbonato cálcico, normalmente separadas, por lo que el esqueleto no es masivo. Poseen colágeno fibrilar ubicuo y con células diferenciadas. Pueden tener los tres tipos de estructura (asconoide, siconoide o leuconoide). Raramente superan los 10 cm de altura y suelen aparecer a poca profundidad en hábitat crípticos.

Independientemente de la clase a la que pertenezcan, las esponjas secretan minerales o estructuras proteicas que les otorgan diversas formas tridimensionales, permitiéndoles crecer de forma ascendente y facilitando el intercambio de agua con un mínimo coste metabólico (Uriz y col., 2003). El esqueleto mineral está presente en la mayor parte de los grupos, pero no en todos, y está compuesto de carbonato de calcio, dióxido de silicón y/o de fibras colágenas (espongina). La mayoría de las esponjas de las clases Demosponja y Hexactinélida producen esqueletos de sílice que consisten en elementos individualizados llamados espículas cuya longitud va desde micrómetros hasta centímetros y que posteriormente pueden fusionarse o entrelazarse unas con otras (Fig. 5).



**Figura 5. Micrografías de espículas.** Megascleras típicas de Demosponjas y Hexactinélidas:  
 A y B: tetraxonas  
 C: triaxona  
 D: monaxona  
 E: microsclera de unión  
 F: esqueleto reticular de monactinas (demosponja) (Uriz y col., 2003).

Las espículas tienen una gran importancia para la identificación y clasificación taxonómica de las esponjas. Desde el punto de vista de su esqueleto, las clases Demosponja y Hexactinélida difieren en el número de ejes de simetría de sus megascleras (espículas >100 µm) las cuales son monaxonas y tetraxonas en demosponjas y monaxonas y triaxonas en hexactinélidas (Uriz y col., 2003) (Fig. 5).

Junto con el soporte de las células de la esponja, las espículas pueden ayudar a la larva a permanecer flotando en el plancton o alcanzar el fondo para colonizar, aumentar el éxito reproductivo o cazar presas. Por el contrario el papel de las espículas y del esqueleto en la disuasión de la predación no ha sido demostrada y se continúa sosteniendo que las esponjas utilizan la defensa química para disuadir a sus principales predadores (peces, tortugas y estrellas de mar) (Uriz y col., 2003).

### **Fisiología**

En relación a su fisiología, las esponjas están provistas de la mayoría de las vías metabólicas y los elementos genéticos necesarios para construir un organismo pluricelular. Así por ejemplo, en la esponja *Geodia cydonium* se han identificado los genes característicos de los organismos pluricelulares y las proteínas necesarias para la formación de tejido (galectina, colágeno, integrina), la transducción de señales (receptor de tirosina cinasa), la transcripción (homodominios y proteínas que contienen la caja MADS), la reacción inmune (proteínas de shock térmico, proteasoma), y el tejido sensorial (receptor de glutamato) (Muller, 1998). En la demosponja *Chondrilla nucula* se han descrito las enzimas necesarias para la síntesis del ácido gama amino butírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de mamíferos, así como su transporte en vesículas, su liberación tras una despolarización y la presencia de una isoforma funcional del receptor metabotrópico de GABA (B) (Ramoino y col., 2007).

Una nueva aplicación en el campo de los compuestos naturales aislados de esponjas marinas, que seguramente tendrá un considerable impacto tecnológico, es la síntesis recombinante de compuestos bioactivos de bajo peso molecular. Para alcanzar este objetivo se deberán aislar tanto el grupo de genes requeridos para la síntesis de estos compuestos

por la esponja huésped así como de las bacterias simbiotes asociadas para ser expresadas en un sistema heterólogo (Muller y *col.*, 2004).

Debemos agregar a la importancia de las esponjas que el *phylum Porifera* es actualmente un referente en el estudio genético de la evolución de los metazoarios y que, superados los problemas actuales del establecimiento de cultivos celulares permanentes, las esponjas pueden convertirse en un sistema modelo para el estudio de la diferenciación celular y especialmente de la determinación celular (Muller, 1998).

### **1.2.3 Importancia biomédica de los compuestos aislados de organismos marinos: relevancia del *phylum Porifera***

El hallazgo de dos nuevos nucleósidos, espongosina y espongotimidina (cuya pentosa es una arabinosa) de la esponja marina *Cryptotethia crypta* por Walter Bergmann en el año 1951 (Bergmann y Feeney, 1951) dio lugar al desarrollo de los análogos estructurales ara-A (arabinofuranosiladenina, un fármaco antiviral), el primer fármaco obtenido a partir de un compuesto marino procedente de una esponja y ara-C (citosina-arabinósido), cuyo nombre comercial es Cytosar-U<sup>®</sup> (citostático), y que se utiliza actualmente como agente antineoplásico en la leucemia aguda no-linfocítica, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica crónica.

Actualmente, un importante número de compuestos provenientes de organismos marinos se encuentran en distintas fases de desarrollo preclínico y clínico (Newman y Cragg, 2004) (Tabla 1). Dos de ellos han sido recientemente aprobados para su comercialización, el Ziconotide (McGivern y McDonough, 2004; McGivern, 2006) y la Ecteinascidina-743 (Newman y Cragg, 2004), los primeros fármacos cuyas estructuras son de origen estrictamente marino.

De acuerdo a diversos autores la mayoría de los compuestos con importancia biomédica se encontrarían presentes, en esponjas, tunicados y briozoos (Proksch y *col.*, 2003). De estos tres grupos de invertebrados marinos, se afirma que las esponjas marinas constituyen uno de los principales reservorios de fármacos (Sipkema y *col.*, 2005) debido a

que son los productores marinos más prolíficos de compuestos novedosos, con más de 200 nuevos metabolitos descritos cada año (Mayer y *col.*, 2007).

**Tabla 1. Principales productos naturales marinos en desarrollo clínico**

Fuente	Compuesto	Área de aplicación	Mecanismo de acción	Desarrollo clínico
<i>Ecteinascidia turbinata</i> (tunicado)	Ecteinascidina-743	cáncer	Se une al surco menor del ADN	Aprobado
<i>Conus magnus</i> (caracol marino)	Ziconotide	dolor crónico	Bloqueador selectivo de CCDV tipo-N	Aprobado
<i>Dolabella auricularia</i> (liebre de mar)	Dolastatina 10	cáncer	Inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos	E.C.* fase II
<i>Bugula neritina</i> (briozoo)	Briostatina 1	cáncer	Ligando y modulador de la proteína cinasa C	II
<i>Trididemnum solidum</i> (tunicado)	Didemnina B	cáncer	Inhibidor de la síntesis proteica	II
<i>Aplidium albicans</i> (tunicado)	Aplidina	cáncer	Inhibidor del ciclo celular e inductor de apoptosis	II
<i>Amphiporus lactifloreus</i> (gusano marino)	GTS-21	Alzheimer/ esquizofrenia	Agonista selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$	I

\* Ensayo clínico

Las esponjas se encuentran entre los organismos marinos mejor estudiados principalmente debido a su tamaño y su abundancia. El 41% de los productos naturales marinos han sido aislados de esponjas y por lo tanto representan una fuente interesante para el aislamiento de nuevos compuestos (Abdelgawwad, 2004) cuya potencial aplicación médica es muy variada, como también los mecanismos por los cuales podrían interferir en la patogénesis de diversas enfermedades.

En los poríferos se ha descrito la presencia de más de 5.500 compuestos, de los cuales más de 2.000 contienen nitrógeno, característica exclusiva de las esponjas marinas (Faulkner, 2002; Dembitsky y *col.*, 2005). Estos compuestos poseen una gran diversidad química; se han descrito nucleósidos, terpenos bioactivos, esteroides, péptidos cíclicos, alcaloides, ácidos grasos, peróxidos y derivados de aminoácidos (Sipkema y *col.*, 2005). Algunos de estos compuestos muestran una marcada actividad farmacológica y constituyen candidatos interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos en muy diversas áreas de tratamiento (Tabla 1) (Haefner, 2003; D'Incalci y *col.*, 2004; Mayer y Gustafson, 2004; Mayer y

Hamann, 2004; Newman y Cragg, 2004; Dembitsky y *col.*, 2005). Una revisión de la farmacología marina entre los años 2003 y 2004, describe 166 compuestos marinos (más de 66 de ellos provenientes de esponjas marinas) con actividades antihelmínticas, antibacterianas, anticoagulantes, antifúngicas, antiinflamatorias, antimalarías, antiplaquetarias, antiprotozoarias, antituberculosas y antivirales que afectan a los sistemas cardiovascular, inmune y al sistema nervioso, incluyendo otros mecanismos de acción combinados (Mayer y *col.*, 2007).

**Tabla 2. Diversidad estructural y de bioactividad de los compuestos aislados de esponjas marinas**

Eponja	Compuesto (clase)	Mecanismo de acción	Actividad
<i>Halichondria okadaei</i>	Halicondrina B (Poliéter macrólido)	Inhibe la polimerización de tubulina	Antitumoral
<i>Crambe crambe</i>	Crambescidina 1-4 (derivados pentacíclicos de guanidina)	Bloqueador de canales de Ca <sup>2+</sup>	Antitumoral
<i>Agelas oroides</i>	Taurodispacamida A (alcaloide imidazol-pirrólico)	Inhibidor de la interleucina-2	Inmuno-supresor
<i>Callispongia truncata</i>	Ácido callispongínico (poliacetileno)	Inhibidor de la $\alpha$ -glucosidasa	Efecto sobre enfermedades sanguíneas
<i>Xestospongia sp.</i>	Xetospongina C (bis-oxaquinolizidina macrocíclica)	Inhibidor de IP <sub>3</sub>	Relajante muscular
<i>Agelas sp.</i>	Keramadina (alcaloide pirrol-guanidina)	Antagonista del receptor de serotonina	Neurodepresor
<i>Dysidea avara</i>	Avarol (Hidroquinona, sesquiterpeno)	Inhibidor del RNA de transferencia de glutamina, Supresor UAG	Antiviral
<i>Cymbastela hooperi</i>	Manzamine A (alcaloides de manzamina)		Antimalarial
<i>Arenosclera brasiliensis</i>	Arenosclerinas A,B,C. (alcaloides alquilpiperidina)		Antibacteriano
<i>Oceanapia phillipensis</i>	Oceanapiside (glucósido bisaminohidroxilipídico)		Antifúngico
<i>Pseudoceratina purpúrea</i>	Ceratinamida A y B (derivado de bromotirosina)		Antiincrustante ( <i>antifouling</i> )

Una cuestión importante a considerar es que estos compuestos están presentes en los animales marinos en bajas cantidades, lo cual, en la mayoría de los casos, dificulta su desarrollo farmacológico (Costantino y *col.*, 2004). La hipótesis que atribuye el origen de los metabolitos secundarios a los simbiontes bacterianos actualmente atraen gran interés ya que su manejo implicaría que pueden crearse sistemas de producción independientes del animal basados en procesos de fermentación bacteriana (Piel, 2006; König, y *col.*, 2006).

Así pues, podemos finalizar diciendo que, la diversidad de los compuestos químicos producidos por los invertebrados marinos, la potencial bioactividad de estos compuestos en animales y las estrategias para utilizar estos compuestos en humanos representan un interesante campo de estudio con un elevado potencial para el desarrollo de nuevos fármacos en el que las esponjas marinas ocupan un lugar protagónico.

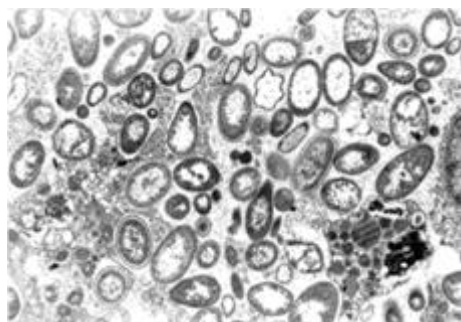
#### **1.2.4 La esponja marina *Aplysina cavernicola***

Las esponjas del género *Aplysina* (Demospongiae, Verongida, Aplysinidae) (Tabla 3) se encuentran frecuentemente en el mar Mediterráneo así como en el mar Caribe. La especie *cavernicola* (Vacelet, 1959) es representativa del mar Mediterráneo en un hábitat bien definido del cual proviene su nombre, zonas poco iluminadas que se pueden encontrar a la entrada de cuevas marinas sumergidas o en aguas relativamente poco profundas (Ciminiello y col., 1997; Thoms y col., 2006b) y es una de las especies protegidas de acuerdo a la Convención de Berna de 1979 (Ramos-Esplá, 2004).

*A. cavernicola* constituye un nicho ecológico que alberga una gran diversidad microbiológica en gran parte hasta ahora no caracterizada, y de forma concomitante representa un potencial metabólico aún sin explotar al igual que el resto de las esponjas marinas (Hentschel y col., 2001; Thoms y col., 2003). Sin embargo, posee metabolitos que ya han sido bien caracterizados y son utilizados como biomarcadores (Thoms y col., 2003), aunque esta aplicación está en discusión en el marco del establecimiento de una sistemática de las esponjas basada en la química de sus compuestos (Erpenbeck y van Soest, 2007). Algunos de los metabolitos de *A. cavernicola* actuarían como elementos de defensa frente a predadores, principalmente peces, mientras que otros actuarían protegiendo a las esponjas de la invasión de patógenos bacterianos (Thoms y col., 2004). Hasta al momento se desconoce si estos compuestos son producto del metabolismo de la esponja o de la síntesis por bacterias asociadas (Imhoff y Stohr, 2003), ya que se han descrito bacterias de diferentes morfologías en el mesohilo de la esponja de distintas especies del género *Aplysina* (Vacelet, 1975) (Fig. 6).



Estudios realizados en otra especie muy similar (*A. aerophoba*) sugieren que el sitio de producción de estos metabolitos secundarios serían los esferulocitos (células excretoras) (Turón y col., 2000), cuya descripción en *A. cavernicola* fue realizada por Vacelet (1967).



**Figura 6. Micrografía electrónica de bacterias presentes en el tejido de la esponja *Aplysina cavernicola*.** Las diversas estructuras ovaladas corresponden a las bacterias con un tamaño aproximado de 2  $\mu\text{m}$  (Thoms y col., 2003).

**Tabla 3. Antecedentes de esponjas marinas con compuestos en estudio**

Especie	<i>Aplysina cavernicola</i>	<i>Leucetta primigenia</i>
<b>Identificación</b>	Vacelet, 1959	Haeckel, 1872
<b>Clasificación</b>		
<b>Reino</b>	Animalia	Animalia
<b>Phylum</b>	Porifera	Porifera
Clase	Demospongiae	Calcarea
Subclase	---	Calcinea
Orden	Verongida	Clathrinida
Familia	Aplysinidae	Leucettidae
Género	<i>Aplysina</i>	<i>Leucetta</i>
Especie	<i>Cavernicola</i>	<i>primigenia</i>
<b>Distribución geográfica</b>	Mar Mediterráneo Mar Caribe	Costas Océano Indo-Pacífico
<b>Compuestos representativos</b>	Aerotionina Homoaerotionina 11,19-dideoxifistularina	Leucetamol B
<b>Actividad</b>	Antibióticos	Antibacteriano, citotóxico

### Compuestos aislados de *Aplysina cavernicola*

El color amarillo azufrado característico de *A. cavernicola* (Thoms y col., 2003), es debido a la presencia del ácido 3,4-dihidroxiquinolina-2-carboxílico (Thoms y col., 2006b) sin embargo su papel, al igual que los demás pigmentos de otros organismos marinos, no está aún bien caracterizado (Bandaranayake, 2006).

Las especies pertenecientes al orden Verongida, como en el caso de *A. cavernicola*, producen una amplia variedad de metabolitos derivados de tirosina (Turon y col., 2000) y citas en este artículo). Los primeros metabolitos secundarios de bromotirosina provenientes de organismos marinos fueron aislados por Morner en 1913. Más tarde, en 1967 Sharma y Burkholder aislaron dos metabolitos secundarios de esponjas del género *Verongia*. Desde entonces hasta hoy, se han aislado más de 280 alcaloides derivados de bromotirosina a partir de invertebrados marinos (Peng y col., 2005).

Los alcaloides de bromotirosina proveen una diversidad estructural química única, así como una bioactividad muy variada que incluye actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiincrustante, antiviral, reguladora de ATPasas y moduladora de canales de calcio. De todas estas actividades las más significativas de los derivados de bromotirosina aislados del orden Verongida son las de antimicrobianos y citotóxicos (Peng y col., 2005). Estos metabolitos generalmente están basados en la 3,5-dibromo-tirosina o, menos frecuentemente, en la 3-bromo,3-cloro-,3,5-dicloro- o 3-bromo-5-cloro-tirosina. En muchos casos, sólo una unidad de tirosina está involucrada, como en la dienona (dibromoverongiaquinol) y en aeroplisinina-1. Otros metabolitos incluyen dos o más unidades de tirosina mediante lazos de amida como en el caso de los compuestos homólogos aerotionina y homoaerotionina los cuales incorporan también aminas biógenas o a través de uniones éter como en las bastadinas o ambos tipos de lazos como en fistularina-3 (Mancini y col., 1993) (Fig. 7 y Fig. 8).

La aeroplisinina-1 ha sido el derivado de bromotirosina más ampliamente estudiado por su actividad como anticancerígeno y ha sido aislado de varias esponjas entre ellas *A. cavernicola* (Peng y col., 2005).

Las especies del género *Aplysina* acumulan alcaloides isoxazolinós bromados en concentraciones que a veces exceden el 10% de su peso seco (Thoms y col., 2006a). El principal metabolito específico de *A. cavernicola* es aerotionina (Thoms y col., 2003). Aerotionina y homoaerotionina, fueron los primeros compuestos aislados de un nuevo grupo dentro de los derivados de bromotirosina, los espirociclohexadienilisoaxazolinós. Tras su aislamiento inicial de las esponjas *Verongia cavernicola* (*A. cavernicola*) y de *Verongia thiona* (Fattorusso, 1970), se obtuvo la estructura de aerotionina, el principal componente de las esponjas (10%) (Minale, 1976), llegando a constituirse en un marcador útil para la identificación de *A. cavernicola*.

Del estudio de los derivados de bromotirosina Minale y Moddy sugirieron que los metabolitos bromados del género *Verongia* serían derivados biogenéticamente a partir de la 3,5-dibromo-tirosina y que probablemente las cadenas centrales C4N2 y C5N2 de aerotionina y de homoaerotionina serían derivadas de ornitina y de lisina, respectivamente (Moody y col., 1972; Peng y col., 2005). La 11,19-dideoxifistularina-3, también presente en *A. cavernicola*, fue aislada inicialmente de la esponja *Pseudoceratina durissima* (Kernan y col., 1990). Los compuestos aerotionina, homoaerotionina y 11, 19-dideoxifistularina-3 han mostrado propiedades antimicrobianas *in vitro*, frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, siendo la 11,19-dideoxifistularina-3 la que presenta mayor actividad (Peng y col., 2005).

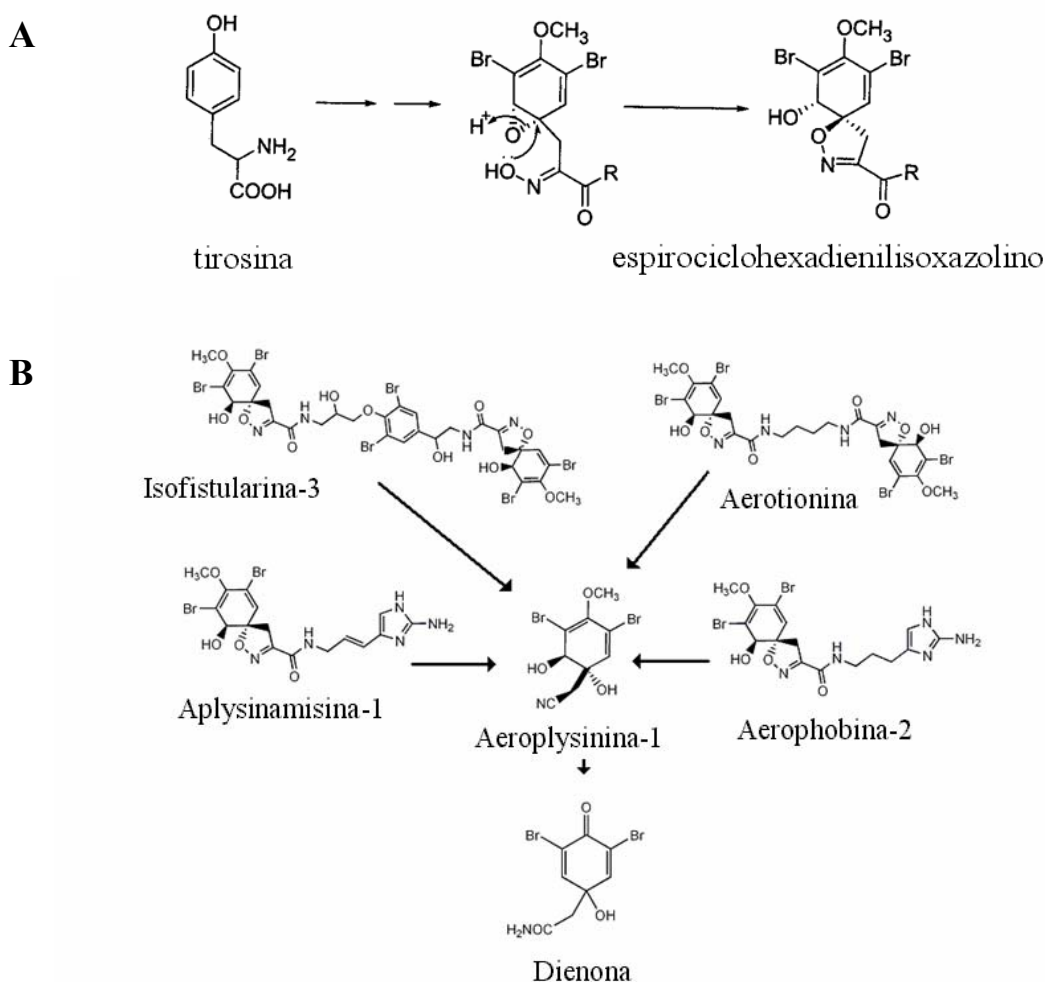
### **1.2.5 La esponja marina *Leucetta primigenia***

La esponja marina *L. primigenia* (Haeckel, 1872; y posterior designación por Dendy & Row 1913) pertenece a la Clase Calcárea (Tabla 3) y presenta un sistema acuífero típicamente leuconoide (Borojevic y Klautau, 2000). Puede formar masas de algunas decenas de centímetros y se caracteriza por poseer grandes espículas.

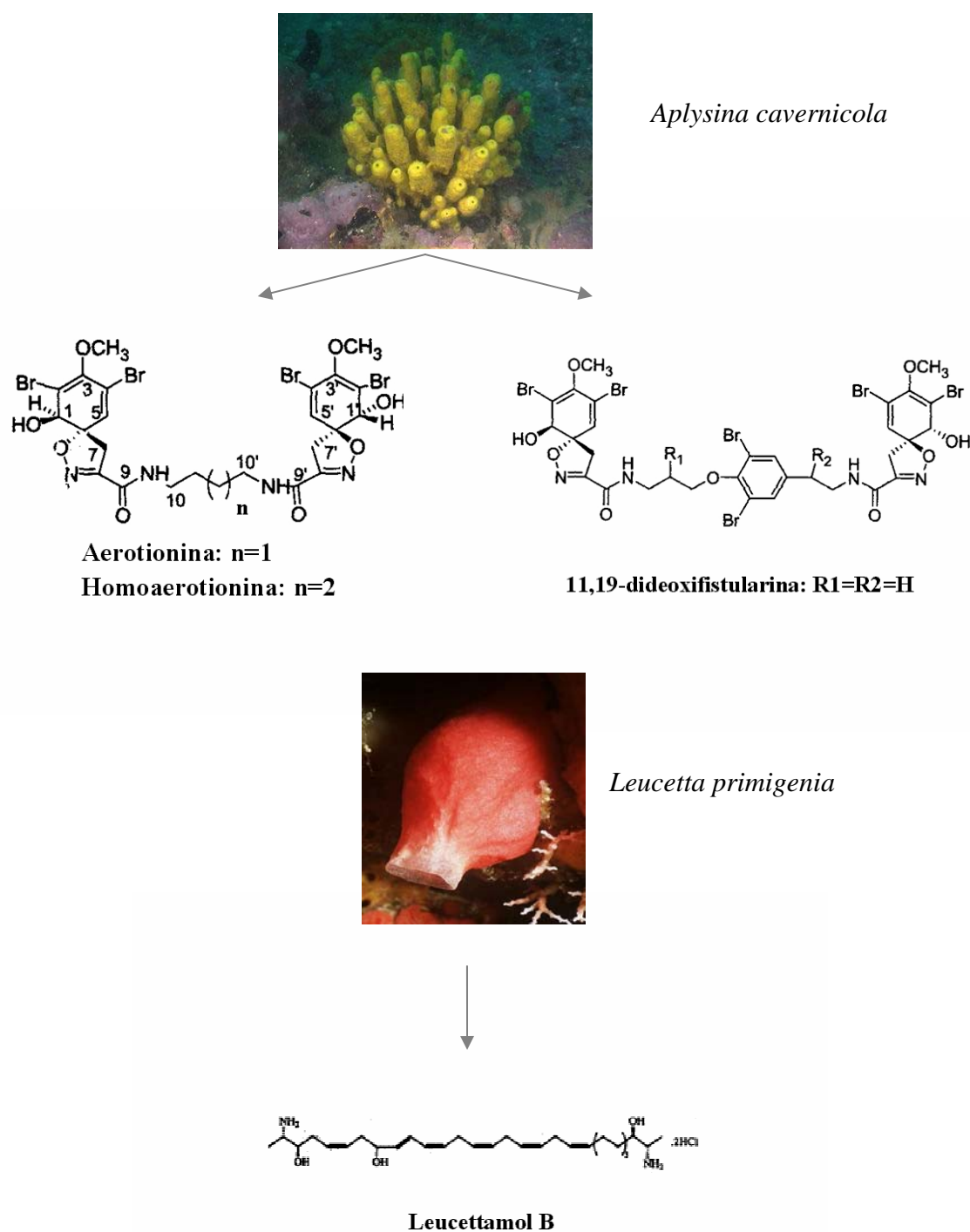
#### **Compuestos aislados de *Leucetta primigenia***

Ciertas esponjas calcáreas, como *L. primigenia*, presentan compuestos lipídicos formados por una larga cadena hidrocarbonada (C28-C30) con extremos 2-amino-3-hidroxi. Dos de estas típicas molécula diméricas son el leucetamol A y B (Fig. 8) que

fueron originalmente descritas en la esponja *Leucetta microraphis* (Kong y Faulkner, 1993). Estos compuestos serían productos del metabolismo de (S)-alanina. Estas moléculas han mostrado una débil actividad antibacteriana y propiedades citotóxicas, estas últimas se vuelven muy potentes al glicosilar los compuestos para formar esfingolípidos.



**Figura 7. Derivados de bromotirosina y biotransformación de compuestos en esponjas del género *Aplysina*.** **A)** En los derivados de bromotirosina espirociclohexadienilisoxazolinones una o más unidades de bromotirosina son transformados en espirociclohexadienilisoxazolinones, estos alcaloides generalmente consisten en una a tres unidades derivadas de bromotirosina y de otros grupos funcionales como histamina (Peng y *col.*, 2005) . **B)** Las esponjas del género *Aplysina* contienen alcaloides isoxazolinones bromados tales como isofistularina-3 o aerophobina-2, los principales metabolitos nitrogenados. Tras sufrir una herida en el tejido se produce una bioconversión rápida de alcaloides por degradación de precursores isoxazolinones y, la formación de los productos aerophysinina-1 y dienona. La reacción descrita ocurre exclusivamente en células heridas y no es sistémica. Mientras que los productos de biotransformación poseen propiedades antibacterianas potentes y probablemente protegen a las esponjas dañadas de la invasión de patógenos, los precursores isoxazolinones bromados son altamente disuasivos de peces y protegen a la esponja de los predadores (<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/PharmBio/>).



**Figura 8. Esponjas marinas y algunos de sus principales metabolitos secundarios.** *Aplysina cavernicola* (fotografía de M. Ponti) se caracteriza por su intenso color amarillo azufrado y por la presencia de aerotionina y de otros derivados de bromotirosina (homoaerotionina y 11,19-dideoxifistularina). La gran esponja Calcárea *Leucetta primigenia* (fotografía de Ginette Allard), la más grande de la región Indo-pacífico contiene el metabolito secundario leucettamol B.

### 1.3 LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DEL VOLTAJE (CCDV)

#### 1.3.1 Estructura molecular de los canales de calcio dependientes de voltaje

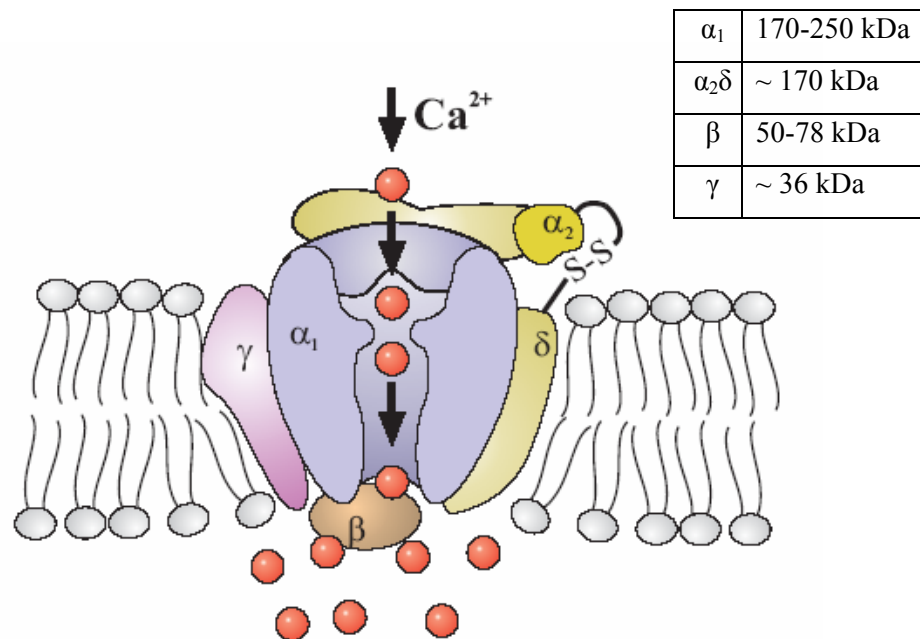
Los CCDV son estructuras proteicas complejas formadas por cuatro subunidades diferentes ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$ ). Para constituir un canal funcional se requiere al menos de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2\delta$  (Fig. 9). La subunidad  $\alpha_1$  es la de mayor tamaño (190-250 kDa) y contiene el poro iónico, el sensor de voltaje, el mecanismo de compuerta y la mayoría de los sitios conocidos de regulación del canal por segundos mensajeros, fármacos y toxinas. La subunidad  $\alpha_1$  está compuesta por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales incluye seis segmentos transmembrana (S1-S6) (Tanabe y *col.*, 1987). Las cargas positivas altamente conservadas del segmento S4 corresponderían al sensor de voltaje (Figs.9 y 10) mientras que el asa que une el segmento S5 y S6 formaría parte del poro iónico de selectividad del canal (Catterall, 2000; Sather y McCleskey, 2003). En los mamíferos, la subunidad  $\alpha_1$  está codificada por al menos 10 genes distintos. La existencia de múltiples subunidades  $\alpha_1$  sería la causa de la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los CCDV (Hofmann y *col.*, 1994).

La subunidad  $\beta$  (1-4) es una subunidad auxiliar esencial ubicada intracelularmente que se coexpresa con la subunidad  $\alpha_1$ ; la subunidad  $\alpha_2\delta$  (1-4) tiene un papel modulador de los CCDV y al igual que la subunidad  $\beta$  modifica la interacción con los bloqueadores; la subunidad  $\gamma$  (1-8) es una proteína integral de membrana que modula los CCDV e interacciona con otras proteínas de membrana (Arikath y Campbell, 2003; Lacinová, 2005).

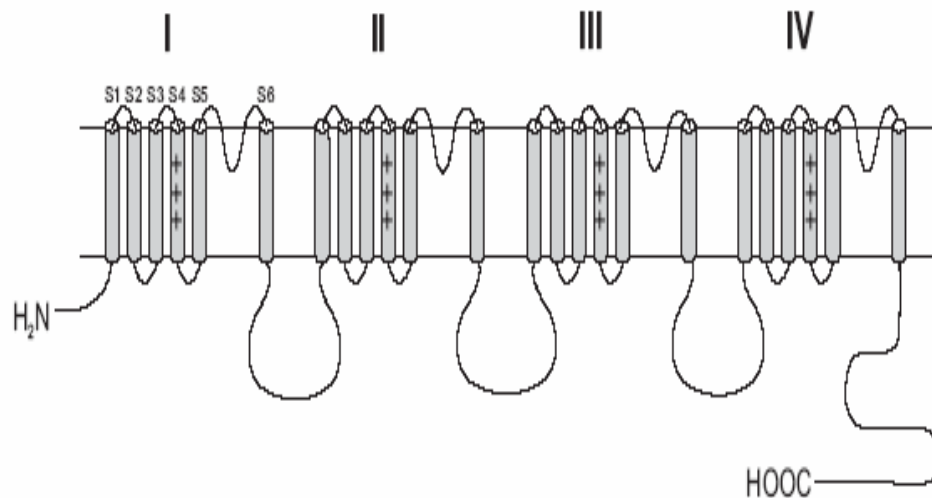
#### 1.3.2 Biología molecular de los CCDV: nomenclatura estructural

La nomenclatura actual, propuesta tras el clonaje de nuevos genes, ha agrupado a los CCDV en tres subfamilias nombrándolas de acuerdo al principal ión permeante (el calcio, Ca), el principal regulador fisiológico (el voltaje, V) y la subfamilia genética de la subunidad  $\alpha_1$  (1-3).

A

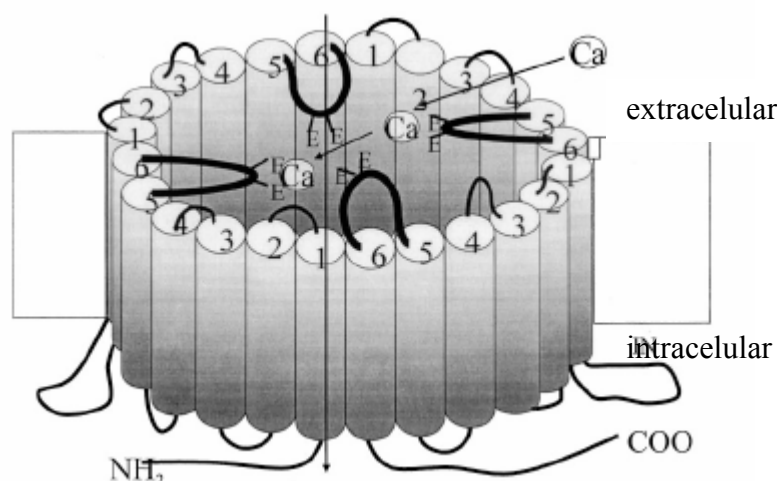


B



**Figura 9. Estructura esquemática de los canales de calcio dependientes del voltaje. A)** Figura esquemática que representa la disposición espacial de las principales subunidades que conforman los CCDV ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$ ). La subunidad  $\alpha_1$  forma el poro iónico del canal. **B)** Estructura molecular de la subunidad  $\alpha_1$  de los CCDV formada por cuatro dominios homólogos (I a IV), cada uno de ellos constituido por seis segmentos transmembrana (S1 a S6). El segmento S4 es el que contiene el sensor de voltaje (Lacinová, 2005).

A



B

	IS4	■S4	▨S4	IVS4
Ca 1.1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRICIRLLRLPKITRYW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	SAFFRLFRVMRLIKLLSRAE
Ca 1.2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRVCVLLRIPEVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 1.3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRVCVLLRIPEVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 1.4	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVFRVCVLLRIPEVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 2.1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLRIPEVTRHW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2.2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLRIPEVTRHW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2.3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLRALRLLRIPEVTRHW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	MSFLKLFRAARLIKLLRQGY
Ca 3.1	PSAVRTVRVLRPLRAINRV	LSVLRTPFELMRVLRVLRVFL	LRVLRLLRTRPLRPLVISRA	IRIMRVLRIRARVLRKLLKMAV
Ca 3.2	LSAIRTVRVLRPLRAINRV	LSVLRTPFELMRVLRVLRVFL	LRVLRLLRTRPLRPLVISRA	IRIMRVLRIRARVLRKLLKMAT
Ca 3.3	LSAIRTVRVLRPLRAINRV	LSVLRTPFELMRVLRVLRVFM	LRVLRLLRTRPLRPLVISRA	IRIMRVLRIRARVLRKLLKMAT

**Figura 10. Poro iónico y sensor de voltaje de los canales de calcio dependientes de voltaje. A)** Representación esquemática de la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes a través de la subunidad  $\alpha_1$  de los CCDV. Las cuatro asas extracelulares que conectan los segmentos S5 y S6 forman el poro del canal. En cada una de las asas existen residuos de glutamato que en conjunto constituirían el poro iónico y el filtro de selectividad. Se cree que los grupos carboxilo de los glutamato interaccionan con una mayor afinidad con los cationes divalentes, en comparación con los monovalentes. Ambos residuos de glutamato unirían los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . La repulencia de cargas entre el ión  $\text{Ca}^{2+}$  entrante y el ión  $\text{Ca}^{2+}$  unido produciría el movimiento de iones hacia otro residuo de glutamato y finalmente su entrada. **B)** Alineación de los segmentos S4 de los CCDV indicando los aminoácidos con carga positiva (en gris) (Atchison, 2003; Lacinová, 2005).



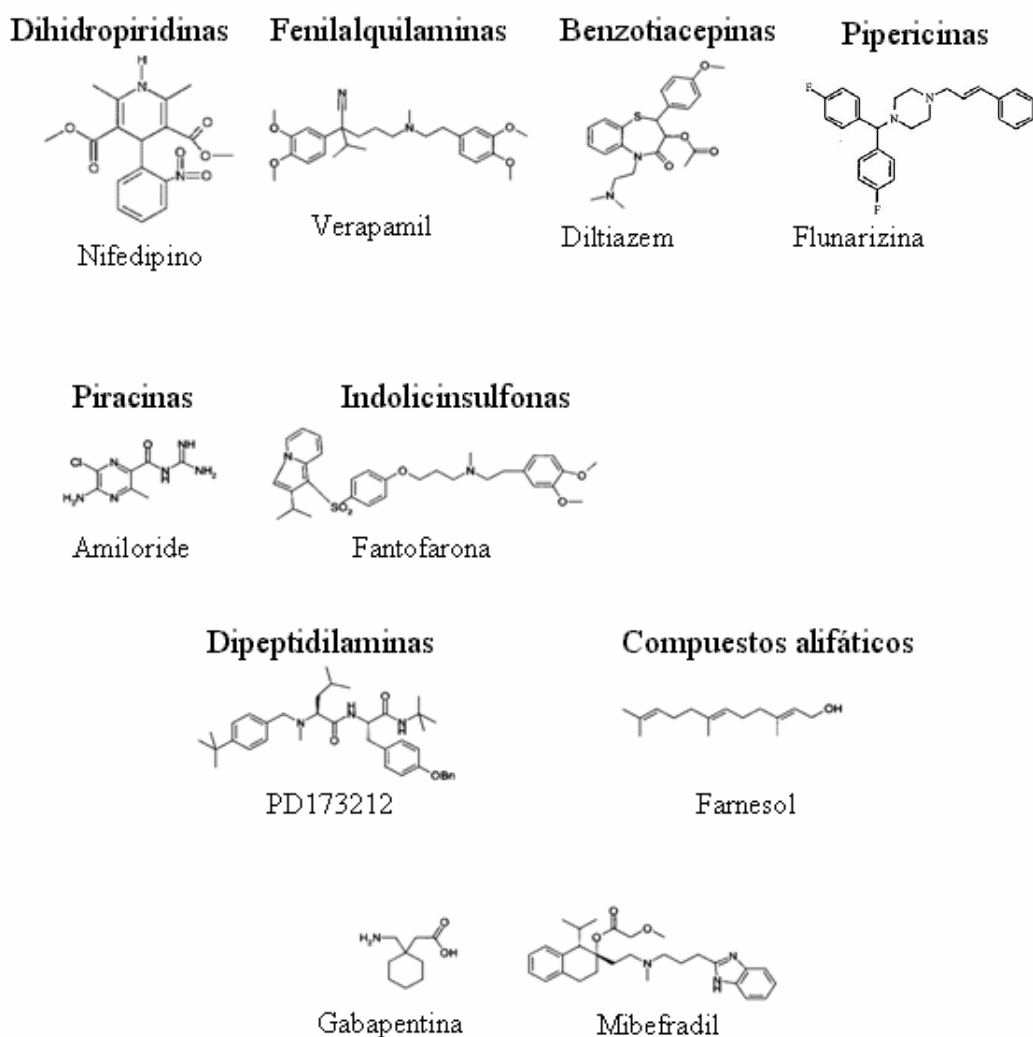
De acuerdo a esta nomenclatura la familia  $Ca_v1$  ( $Ca_v1.1$  a  $Ca_v1.4$ ) incluye los canales que contienen las subunidades  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1F}$  que median las corrientes de calcio tipo-L (Tabla 4). La familia  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$  a  $Ca_v2.3$ ) incluye los canales que contienen las subunidades  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1E}$  que median las corrientes de calcio tipo-P/Q, tipo-N y tipo-R, respectivamente (Tabla 5). La familia  $Ca_v3$  ( $Ca_v3.1$  a  $Ca_v3.3$ ) incluye los canales que contienen las subunidades  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  y  $\alpha_{1I}$  que median las corrientes de calcio tipo-T (Tabla 5) (Ertel y col., 2000; Catterall, 2000; Catterall y col., 2005).

Los CCDV han sido ampliamente caracterizados en relación a sus propiedades fisiológicas y farmacológicas.

### 1.3.3 Propiedades biofísicas y farmacología de los CCDV

La primera caracterización de las corrientes de  $Ca^{2+}$  subyacentes durante un potencial de acción fue realizado en células cromafines bovinas y comunicado en un artículo clásico en 1982 (Fenwick y col., 1982b; Artalejo, 1995), posteriormente y de acuerdo a las propiedades biofísicas los CCDV fueron inicialmente clasificados en dos grandes grupos. (1) Los CCDV de bajo umbral de activación (-70 a -50 mV) o tipo-T, de corrientes transitorias (“tiny and transient”), presentes en una gran variedad de tipos celulares, que participan en la generación del potencial de acción y controlan los patrones de descargas repetitivas; hasta el momento no se han encontrado bloqueantes selectivos para estos canales y (2) los CCDV de alto umbral de activación, principales responsables de la entrada de  $Ca^{2+}$  en neuronas. En este segundo grupo se han descrito cinco subtipos de corrientes de  $Ca^{2+}$ ; las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo-L (“long lasting”) son las principales corrientes registradas en el músculo y en células endocrinas, donde inician la contracción y la secreción respectivamente. Estos canales presentan una lenta inactivación y son sensibles a los bloqueantes orgánicos de los CCDV tipo-L (dihidropiridinas, benzotiazepinas y fenilalquilaminas), las corrientes tipo-L también están presentes en neuronas y en las células marcapaso del corazón; las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo-N (neuronal), tipo-P (Purkinje), tipo-Q y tipo-R se expresan principalmente en neuronas, donde inician la neurotransmisión y son insensibles a los bloqueantes de los CCDV tipo-L. Las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo-N son bloqueadas selectivamente por la  $\omega$ -conotoxina GVIA, aislada del veneno del caracol marino *Conus geographus*, mientras que las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo-P/Q; denominadas así

ya que en muchos tipos celulares el componente individual de la corriente P y de la corriente Q no puede ser separado de forma adecuada; son bloqueadas por la  $\omega$ -agatoxina IVA proveniente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (Olivera y col., 1994; Catterall, 2000; Ertel y col., 2000; Triggle, 2003; Doering y Zamponi, 2005)(Figura 11, Tablas 4 y 5).



**Figura 11. Moléculas orgánicas antagonistas de CCDV**

Tabla 4. Canales Ca<sub>v</sub>1

Canal	Ca <sub>v</sub> 1.1	Ca <sub>v</sub> 1.2	Ca <sub>v</sub> 1.3	Ca <sub>v</sub> 1.4
<b>Nombre alternativo</b>	α1S; L músculo esquelético	α1C; L músculo cardíaco	α1D	α1F
<b>Corriente</b>	tipo-L	tipo-L	tipo-L	tipo-L
<b>Características funcionales</b>	Alto umbral de activación	Alto umbral de activación	Alto umbral de activación	Alto umbral de activación
	Inactivación lenta	Inactivación lenta (dependiente de Ca <sup>2+</sup> )	Inactivación lenta (dependiente de Ca <sup>2+</sup> )	Inactivación lenta (dependiente de Ca <sup>2+</sup> )
<b>Activadores</b>	Bay-K8644 FPL64176	Bay-K8644 FPL64176	Bay-K8644	Bay-K8644
<b>Bloqueantes selectivos</b>	*DHP, FAA, BZP	DHP, FAA, BZP	Baja sens. a DHP  verapamilo	Baja sens. a DHP  verapamilo
<b>Ubicación</b>	Músc. esquelético; Túbulos transversos	Miocitos cardíacos; células musculares lisas; células endocrinas; cuerpos neuronales; dendritas proximales	Células endocrinas; cuerpos neuronales y dendritas; miocitos cardíacos atriales y células marcapaso; células ciliares de la cóclea	Retina y células bipolares; médula espinal; glándula adrenal; mastocitos
<b>Función celular</b>	Acomplamiento excitación-contracción	Acomplamiento excitación-contracción; secreción hormonal; regulación de la transcripción; integración sináptica.	Secreción hormonal; regula transcripción; reg. sináptica; marcapaso cardíaco; audición; liberación de neurotransmisor desde células sensoriales	Liberación de neurotransmisor desde fotorreceptores

\*DHP: dihidropiridinas

FAA: fenilalquilaminas

BZP: benzotiazepinas

(Catterall, 2000; Alexander y col., 2007).

**Tabla 5. Canales Ca<sub>v</sub>2 y Ca<sub>v</sub>3**

Canal	Ca <sub>v</sub> 2.1	Ca <sub>v</sub> 2.2	Ca <sub>v</sub> 2.3
<b>Nombre alternativo</b>	α1A	α1B	α1E
<b>Corriente</b>	tipo-P/tipo-Q	tipo-N	tipo-R
<b>Características funcionales</b>	Bajo umbral de activación Inactivación moderada	Bajo umbral de activación Inactivación moderada	Bajo umbral de activación medio Inactivación rápida
<b>Bloqueantes selectivos</b>	ω-agatoxina IVA (P:CI <sub>50</sub> ~ 1nm) (Q:CI <sub>50</sub> ~ 90nm) ω-agatoxina IVB ω-conotoxina MVIIC	ω-conotoxina GVIA ω-conotoxina MVIIC	SNX482 (puede no ser completamente específico) alto Ni <sup>2+</sup>
<b>Ubicación</b>	Terminales nerviosos y dendritas; células neuroendocrinas	Terminales nerviosos y dendritas; células neuroendocrinas	Cuerpos neuronales y dendritas
<b>Función celular</b>	Liberación de neurotransmisor; transientes de Ca <sup>2+</sup> dendrítico; secreción hormonal	Liberación de neurotransmisor; transientes de Ca <sup>2+</sup> dendrítico; secreción hormonal	Disparos repetitivos; transientes de Ca <sup>2+</sup> dendrítico

Canal	Ca <sub>v</sub> 3.1	Ca <sub>v</sub> 3.2	Ca <sub>v</sub> 3.3
<b>Nombre alternativo</b>	α1G	α1I	α1H
<b>Corriente</b>	tipo-T	tipo-T	Tipo-T
<b>Características funcionales</b>	Bajo umbral de activación inactivación rápida	Bajo umbral de activación inactivación rápida	Bajo umbral de activación Inactivación moderada
<b>Bloqueantes no selectivos</b>	Mibefradil, baja sensibilidad a Ni <sup>2+</sup> kurtoxina SB209712	Mibefradil, alta sensibilidad a Ni <sup>2+</sup> kurtoxina SB209712	Mibefradil, baja sensibilidad a Ni <sup>2+</sup> kurtoxina SB209712
<b>Ubicación</b>	Cuerpos neuronales y dendritas; células musculares lisas y cardíacas	Cuerpos neuronales y dendritas; células musculares lisas y cardíacas	Cuerpos neuronales y dendritas
<b>Función celular</b>	Marcapaso; disparos repetitivos	Marcapaso; disparos repetitivos	Marcapaso; disparos repetitivos

(Catterall, 2000; Alexander y col., 2007).

### 1.3.4 Farmacología molecular de los CCDV y mecanismos de bloqueo

De acuerdo a (Doering y Zamponi, 2003; McDonough, 2004; Doering y Zamponi, 2005), los antagonistas de los CCDV pueden ser clasificados en tres grandes grupos:

- **Iones inorgánicos**
- **Péptidos**
- **Moléculas orgánicas pequeñas**

Los mecanismos de bloqueo por los cuales actúan estos antagonistas son básicamente dos:

- **Oclusión del poro iónico**
- **Modificación de la cinética de apertura y cierre**

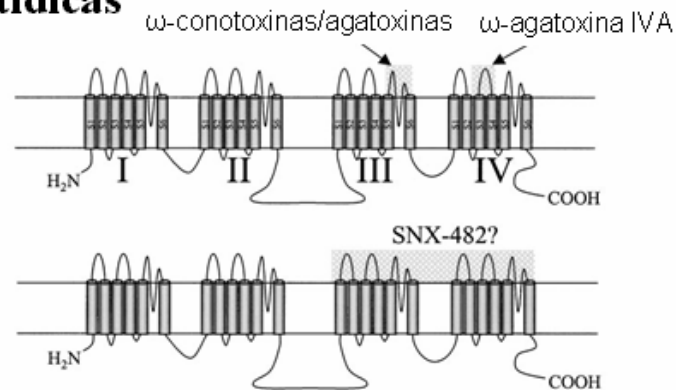
Los iones inorgánicos divalentes y trivalentes bloquean físicamente el poro iónico de manera no selectiva en la mayoría de los subtipos de CCDV ( $\text{Cd}^{2+}$ ) y en ciertos casos modifican la cinética de apertura y cierre del canal ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (Nelson, 1986; Atchison, 2003).

La acción de los péptidos (toxinas) provenientes de arañas, caracoles marinos y víboras generalmente actúan de forma selectiva sobre algún subtipo de canal y, como hemos visto, han servido de herramientas farmacológicas para la caracterización de varios de estos subtipos (Olivera y *col.*, 1994; Olivera, 1997; Uchitel, 1997; Ori y Ikeda, 1998; Lewis y Garcia, 2003). La acción de bloqueo puede producirse por oclusión física del poro del canal ( $\omega$ -conotoxina GVIA, MVIIA, MIIC) o por la modificación de la cinética de apertura y cierre del canal, como en el caso de la  $\omega$ -agatoxina IVA. Se cree que la interacción de esta toxina con la región S4 del dominio 4 en los  $\text{Ca}_v2.1$  sería la responsable de la inhibición de la apertura del canal, ya que se requieren fuertes despolarizaciones para revertir el bloqueo sugiriendo que los movimientos del sensor de voltaje ubicados en el segmento S4 podrían remover la toxina del sitio de interacción (Doering y Zamponi, 2005; McDonough, 2007) (Figura 12).

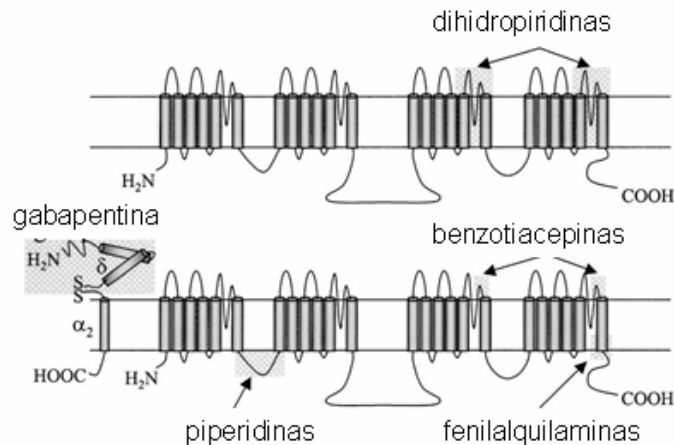
Las moléculas orgánicas pequeñas obtenidas mediante síntesis química, presentan distintas clases de relación estructura-actividad, y pueden mediar efectos tanto selectivos

como no-selectivos sobre subtipos determinados de CCDV mediante la oclusión del poro o reduciendo el número de canales disponibles. Las DHP, están constituidas en base a una piridina e incluye un grupo de compuestos como el nifedipino, el nimodipino, el nitrendipino, la isradipina y el agonista BAYK8644 (Figura 11).

## Toxinas peptídicas



## Moléculas orgánicas pequeñas



**Figura 12. Posibles interacciones farmacológicas de los antagonistas de CCDV con el canal.**

Las toxinas que ocluyen el poro del canal ( $\omega$ -ctxGVIA; MVIIA; MVIIC y  $\omega$ -AgaIIIA) interactúan con la porción extracelular del lazo entre los segmentos S5 y S6 del dominio III, mientras que la  $\omega$ -AgaIVA que modifica la cinética de apertura y cierre del canal interactúa con el lazo entre S3-S4 en el dominio IV de la subunidad  $\alpha 1A$ . SNX-482 al parecer requiere los dominios III y IV. Las DHP interactúan con la región de los segmentos S5-S6 en los dominios III y IV, mientras que las benzotiacepinas lo harían con la porción extracelular del lazo correspondiente. Las fenilalquilaminas actuarían intracelularmente sobre la región S6 del dominio IV y las piperidinas sobre el lazo de unión entre los dominios I y II. La gabapentina interactúa con la subunidad auxiliar  $\alpha 2\delta$  (Doering y Zamponi, 2003).

De forma característica las DHP producen un bloqueo dependiente del voltaje ya que a potenciales de membrana hiperpolarizados los CCDV de tipo-L son poco sensibles a las DHP, sin embargo a potenciales más despolarizados la afinidad aumenta significativamente y con ella el grado de bloqueo. Además se ha sugerido que las DHP inducirían la conformación inactiva del canal, sin embargo se cree que este efecto es debido al bloqueo de canal abierto. Las Fenilalquilaminas, relacionadas estructuralmente con los anestésicos locales, están constituidas por al menos un anillo fenilo unido a una amina por una cadena alquilo e incluyen compuesto como el verapamilo. El bloqueo de los CCDV tipo-L por las FAA es dependiente del potencial de membrana, lo cual tiene una fuerte influencia en el grado de selectividad del fármaco entre distintos tipos de canales. El sitio de unión de las FAA se encontraría cerca de la región citoplasmática del canal por lo cual se piensa que las FAA difundirían a través de la membrana para alcanzar el sitio de bloqueo. En el grupo de las Benzotiazepinas encontramos al diltiazem y la tetrandina, utilizados en el tratamiento de la angina de pecho. Aunque pareciera existir una superposición en los sitios de unión al canal entre las DHP y las BZP, los datos electrofisiológicos y bioquímicos indican que se trataría de sitios muy próximos pero distintos. Los sitios de unión propuestos para las moléculas orgánicas se muestran en la figura 12.

Existe otro amplio grupo de compuestos orgánicos, tanto de síntesis como de origen natural, con efectos selectivos y no selectivos por distintos tipos de CCDV. La flunarizina, una difenilalquilamina, junto al lubeluzol y a la dotarizina tienen un efecto potente sobre los canales de tipo-L, pero este efecto no es selectivo y son considerados bloqueadores de canales de calcio de amplio espectro; lo mismo sucede con las Indolicinsulfonas como la fantofarona y el Benzimidazol mibefradil. Una serie de moléculas alifáticas de estructura simple, entre ellas el farnesol, un alcohol sesquiterpeno de origen natural presente en varios aceites esenciales (citronela, neroli, etc) se encuentra dentro del grupo de los inhibidores alifáticos de los CCDV tipo-L. Se utiliza para potenciar el aroma de los perfumes florales, es utilizado como pesticida, y es una feromona para varios tipos de insectos además de un aditivo de los cigarrillos. Otras moléculas alifáticas simples como el dodecanol y la dodecilamina también se incluyen en este grupo (Triggle, 2004). El farnesol también bloquea los CCDV tipo-N en el rango concentraciones nanomolares, de manera selectiva entre los CCDV de alto umbral de activación, al igual que los demás compuestos alifáticos

de cadena larga que inhiben de manera potente este tipo de canales. Las Dipeptidilaminas son una clase de bloqueantes de CCDV tipo-N identificados tras realizar una criba a una librería de compuestos. El PD173212, formado por el acoplamiento entre una leucina N,N-di-sustituída y una tirosin amina, bloquea los CCDV tipo-N a concentraciones de 40 nM, siendo el compuesto orgánico con mayor afinidad por los CCDV tipo-N.

La gabapentina, un anticonvulsivante, bloquea los CCDV tipo-N, tipo-L y tipo-P/Q posiblemente a través de la interacción directa con la subunidad  $\alpha 2\delta$ .

El mibefradil bloquea CCDV de bajo y de alto umbral de activación así como canales de  $K^+$ . El amiloride interacciona preferentemente con los CCDV tipo-T, sin embargo también bloquea los CCDV tipo-L y carece de selectividad (Doering y Zamponi, 2003).

### 1.3.5 Distribución y función de los CCDV

Como ya se ha mencionado, los CCDV presentan una amplia distribución encontrándose presentes en la membrana plasmática de células nerviosas, musculares, cardíacas, endocrinas, células  $\beta$ -pancreáticas y células inmunológicas, entre otras (Tablas 4 y 5). Los CCDV constituyen una de las principales vías de entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Los cambios en la concentración del  $Ca^{2+}$  citosólico regulan una variedad de importantes funciones celulares como la neurotransmisión (Katz y Miledi, 1967; Miledi, 1973; Dunlap y *col.*, 1995), la contracción muscular (Beam y *col.*, 1989), la secreción hormonal (Ashcroft y *col.*, 1994), la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Fabiato, 1983), la expresión génica (Finkbeiner y Greenberg, 1998) y participan también como una señal en la fecundación y en la muerte celular o apoptosis (Carafoli, 2004). El  $Ca^{2+}$  que entra a la célula por los CCDV constituye por tanto una señal de transducción única y esencial entre la despolarización y las actividades no eléctricas controladas por la excitabilidad en la célula (Hille, 1992).

Hallazgos recientes han mostrado además la posibilidad que los CCDV regulen directamente la transcripción genética. El canal  $Ca_v1.2$  es clivado proteolíticamente para formar un fragmento C-terminal de 75 kDa llamado regulador transcripcional asociado a un



canal de calcio o CCAT, este fragmento se trastoca al núcleo alterando la transcripción endógena de una amplia variedad de genes incluyendo Myc, el promotor de muerte asociado a Bcl (Bad) y artemina. Los niveles de la proteína CCAT en el núcleo aumentan o disminuyen en respuesta a bajas o altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. Este es el primer estudio que describe un mecanismo de control de la expresión génica por un canal de calcio y que no incluye el transporte de calcio (Monteith y *col.*, 2007).

### 1.3.6 Los CCDV como diana terapéutica

Durante más de dos décadas los CCDV han sido una importante diana en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Abernethy y Schwartz, 1999) mediante la utilización de compuestos bloqueadores, tradicionalmente llamados antagonistas del calcio (Fleckenstein y *col.*, 1984). Sin embargo, el conocimiento de nuevas y múltiples isoformas de CCDV en distintos tejidos (Striessnig y *col.*, 2006) así como el hallazgo de la implicación de los CCDV en patologías como la epilepsia (Jones, 2002), el dolor crónico (McGivern, 2006), el cáncer (Monteith y *col.*, 2007) y en las enfermedades neurodegenerativas (Triggle, 1999; Kochegarov, 2003; Verkhatsky y Toescu, 2003) ha evidenciando su importancia como diana terapéutica (Tabla 6).

La mayor parte de los iones inorgánicos son tóxicos, por esta razón y principalmente por su carácter inespecífico los iones inorgánicos no han sido utilizados como agentes terapéuticos. La aplicación terapéutica de las toxinas basada en sus propiedades selectivas ha sido extensamente revisada (Livett y *col.*, 2004; Gandía y *col.*, 2007). La  $\omega$ -conotoxina MVIIA o Ziconotide, mencionada anteriormente como uno de los dos productos naturales de organismos marinos aprobados para su uso en terapéutica, es actualmente aplicado con éxito en el tratamiento del dolor crónico intratable y postoperatorio (McGivern y McDonough, 2004).

Hasta el momento, las DHP han sido los antagonistas del calcio más ampliamente utilizados en clínica, y por esta razón, han sido los más estudiados tanto desde el punto de vista del compuesto como del canal (Doering y Zamponi, 2005).

Tabla 6. Importancia farmacológica de los distintos canales  $Ca_v$ 

Canal	Importancia farmacológica
<b>Ca<sub>v</sub>1.1</b>	No establecida
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	Media los efectos cardiovasculares de los antagonistas del $Ca^{2+}$ utilizados en la clínica. DHP a altas concentraciones produce efectos antidepresivos a través de este canal.
<b>Ca<sub>v</sub>1.3</b>	Supuesta diana farmacológica para la modulación del ritmo cardíaco, antidepresivos, desórdenes de la audición
<b>Ca<sub>v</sub>1.4</b>	No establecida
<b>Ca<sub>v</sub>2.1</b>	Las toxinas selectivas de este canal bloquean la neurotransmisión en el CNS de mamíferos. El bloqueo de $Ca_v2.1$ inhibe el dolor inflamatorio, pero no la alodinia mecánica o la hiperalgesia térmica. Los ratones que carecen del gen de $Ca_v2.1$ funcional presentan atrofia cerebelar, espasmos musculares severos y ataxia, muriendo a las 3-4 semanas de edad postnatal. Epilepsia, migraña?
<b>Ca<sub>v</sub>2.2</b>	La administración intratecal de $\omega$ -conotoxina GVIA o de $\omega$ -conotoxina MVIIA produce un potente efecto en el dolor inflamatorio, el dolor postoperatorio, la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica. En humanos la administración intratecal de SNX-111 (Ziconotide/ Prialt, $\omega$ -conotoxina MVIIA sintética) a pacientes resistentes a opiáceos intratecales, reduce significativamente el grado de dolor y en casos particulares produce el alivio tras muchos años de dolor continuo. Los efectos no deseados de la administración intratecal de Ziconotide incluyen nistagmo, sedación, confusión, alucinaciones auditivas y visuales, agitación severa, comportamiento rebelde. La administración intravenosa administración intravenosa de Ziconotide en humanos produce hipotensión ortostática significativa.
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	Este sería un nuevo tipo de canal con propiedades intermedias entre los CCDV de bajo y de alto umbral de activación o un tipo de canal resistente a DHP, $\omega$ -agatoxina IVA y $\omega$ -conotoxina GVIA y es llamado de tipo R o "residual" cuya importancia farmacológica no ha sido establecida aún. Posiblemente involucrado en la diabetes.
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	Puede mediar los efectos de fármacos antiepilépticos (ausencia) como etosuximida y otras disritmias talamocorticales.
<b>Ca<sub>v</sub>3.2</b>	Puede mediar los efectos de fármacos antiepilépticos (ausencia) como etosuximida y otras disritmias talamocorticales. Potencial diana terapéutica en hipertensión y angina de pecho. Arritmias.
<b>Ca<sub>v</sub>3.3</b>	No establecida

(Catterall y *col.*, 2005; Triggle, 2007)

Sin embargo, debido a que aún se desconoce la estructura de los CCDV, se desconoce la naturaleza exacta de los mecanismos moleculares que regulan la acción de los bloqueantes clásicos de los canales de calcio (DHP, benzotiazepinas, fenilalquilaminas y toxinas) haciendo difícil la síntesis de compuestos eficaces (Triggle, 2003; Triggle, 2007).

En este sentido, resulta de gran importancia comprender la acción de las moléculas orgánicas pequeñas sobre los CCDV tipo-N que han emergido como una diana en el tratamiento del dolor (Doering y Zamponi, 2005), así como la búsqueda de nuevos bloqueantes selectivos o moduladores de subtipos específicos de CCDV que puedan eventualmente ser utilizados como herramientas en alguna de las diversas patologías en las que estos canales están involucrados (Gandía y *col.*, 2007).

## **1.4 LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA MÉDULA SUPRARRENAL**

### **1.4.1 Las glándulas suprarrenales**

La glándula suprarrenal (glándula adrenal) está encerrada en una cápsula de tejido conjuntivo vascularizado. Posee una corteza y una médula, que a pesar de tener un origen filogenético diferente y funciones diversas, forman un órgano homogéneo. La rica irrigación vascular de la glándula es conducida hacia el interior a través de los elementos de tejido conectivo derivados de la cápsula.

La glándula suprarrenal está envuelta por una cápsula de tejido conjuntivo con fibras abundantes. La corteza, derivada del epitelio mesodérmico, está subdividida en tres regiones o zonas concéntricas; la zona glomerular, la más externa y angosta ubicada justo por debajo de la cápsula; la zona fasciculata, la más extensa, cuyas células parenquimáticas habitualmente denominadas espongocitos, se ubican por debajo de la zona glomerular y se organizan en cordones o columnas y la zona reticular, la más interna, se dispone en cordones anastomosados de células formando un tejido laxo en forma de malla que limita con la médula. La corteza suprarrenal produce tres tipos de hormonas, mineralocorticoides (zona glomerular), glucocorticoides (zona fasciculata y parte de la zona reticular) y andrógenos (zona fasciculata y zona reticular) (Fig. 13).

La médula de la glándula suprarrenal deriva del neuroectodermo embrionario, específicamente de simpatoblastos y, por lo tanto, es un paraganglio simpático. Las células de la médula suprarrenal son poliédricas, exhiben una granulación muy fina y están distribuidas en cordones rodeados por redes capilares. A causa de su afinidad por las sales de cromo, las células con frecuencia reciben el nombre de células cromafines o feocrómicas. Debido a que estas células están inervadas por fibras nerviosas simpáticas

preganglionares, se considera que las células cromafines están relacionadas con las neuronas simpáticas postganglionares.

Existen dos tipos principales de células cromafines, uno produce adrenalina y el otro noradrenalina, las dos hormonas de la médula suprarrenal. Las aglomeraciones celulares medulares están entremezcladas con venas musculares grandes. Todas las células de la médula tienen acceso inmediato a capilares y a vénulas.

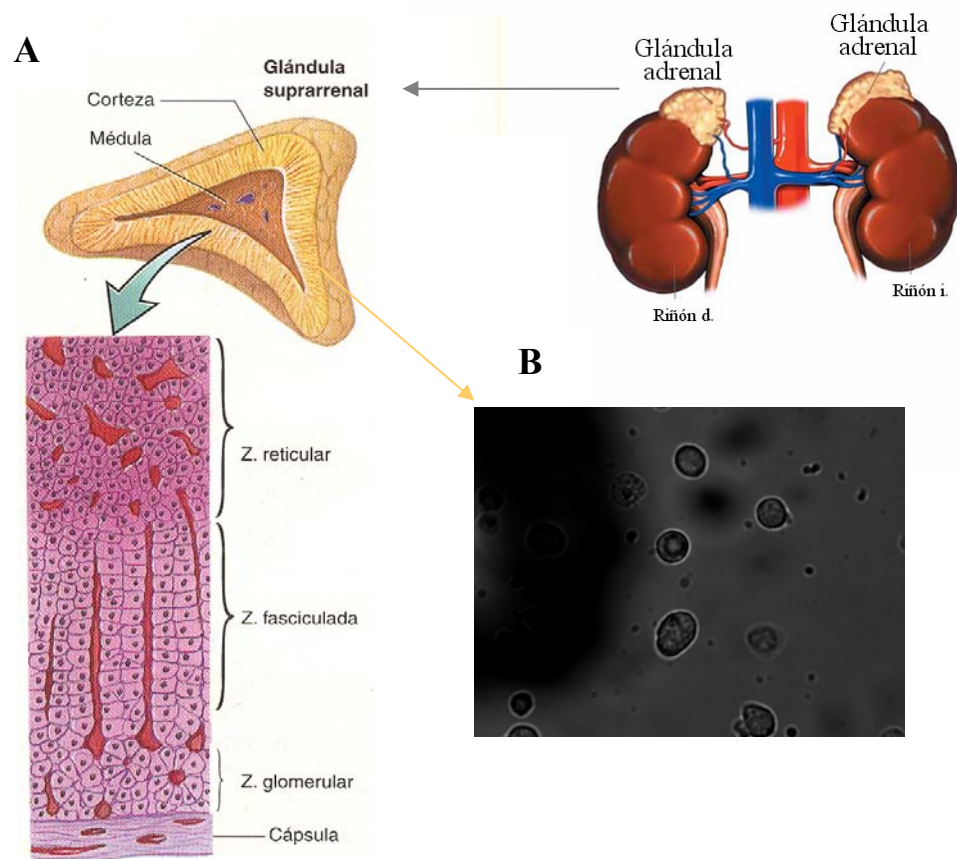
La médula, además, contiene neuronas ganglionares autónomas (simpáticas) multipolares, tanto solitarias como en grupos. La mayor parte del parénquima medular suprarrenal consiste en células cromafines. También hay neuronas ganglionares simpáticas multipolares con prolongaciones celulares largas y células satélite (Garnter y Hiatt, 2003; Kühnel, 2005).

#### **1.4.2 La célula cromafín de la médula adrenal: un modelo de neurosecreción**

Las glándulas adrenales participan en una de las respuestas fisiológicas más importantes para la supervivencia, la respuesta de “lucha o huida” descrita por el fisiólogo Walter B. Cannon en 1925. Esta respuesta es el resultado final de la secreción de catecolaminas que tiene lugar en la médula adrenal por parte de las células cromafines.

Las células cromafines han sido ampliamente utilizadas como modelo general de secreción neuroendocrina y de neurona noradrenérgica. Su amplio uso en neurobiología se debe en parte a la habilidad de obtener células cromafines razonablemente homogéneas en cultivo con sus respuestas secretorias características (Kilpatrick y *col.*, 1980; Burgoyne, 1992). Mucho de lo que hoy sabemos acerca de la estructura de los gránulos de secreción neuroendocrinos deriva de las preparaciones de gránulos cromafines de la médula adrenal (O'Connor y *col.*, 2007).

Las células cromafines, al igual que las neuronas simpáticas, tienen su origen embrionario en la cresta neural (Fujita, 1977; Patterson, 1990). Las células adrenales son típicamente paraneuronas debido a su origen, a la secreción de catecolaminas y a su excitabilidad siendo capaces de generar potenciales de acción (Kobayashi, 1977).



**Figura 13. Glándulas adrenales y células cromafines.** A) Esquema de la ubicación de las glándulas adrenales y sección de la glándula donde puede observarse en posición más externa la cápsula, a continuación la corteza y en ella la disposición de las células en tres zonas. La médula se ubica en posición central y en ella se encuentran las células cromafines. B) Micrografía de células cromafines en cultivo (400X).

La actividad eléctrica de la célula influye en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto en la liberación de catecolaminas. Los primeros estudios revelaron que el disparo de potenciales de acción continúa tras el bloqueo de las corrientes de  $\text{Na}^+$  con TTX o tras remover los iones  $\text{Na}^+$  del medio extracelular, por tanto, en adición al componente de  $\text{Na}^+$ , los potenciales de acción en la célula cromafín de rata son dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Brandt y *col.*, 1976).

Tras estudiar el potencial de acción en células cromafines adrenales de rata en cultivo y registrar las corrientes de entrada  $\text{Na}^+$  que median esta respuesta (Kidokoro y Ritchie, 1980), el estudio directo de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  como prerequisite para entender la función secretora se realizó en las células cromafines bovinas mediante la

técnica de *patch-clamp*, lográndose su caracterización (Fenwick y col., 1982a; Fenwick y col., 1982b) y como se mencionó al revisar los CCDV, el registro de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en este trabajo constituyó la primera caracterización de estos canales en mamíferos. En la figura 14B se resume el modelo de acoplamiento estímulo-secreción descrito para la célula cromafín, en cuya respuesta participan los CCDV (García y col., 2006; Tapia, 2007).

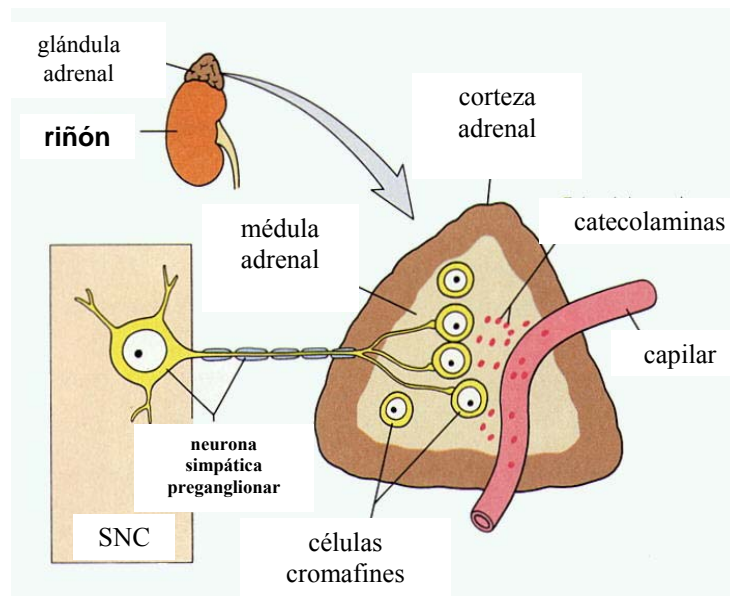
### **1.4.3 Canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín bovina y su farmacología**

En la célula cromafín se han identificado más de 15 tipos distintos de canales iónicos (Artalejo, 1995), entre ellos los CCDV constituyen la principal vía de entrada del calcio extracelular al interior de la célula. Su apertura permite la entrada en la célula de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al gran gradiente electroquímico existente para el  $\text{Ca}^{2+}$  a uno y otro lado de la membrana plasmática.

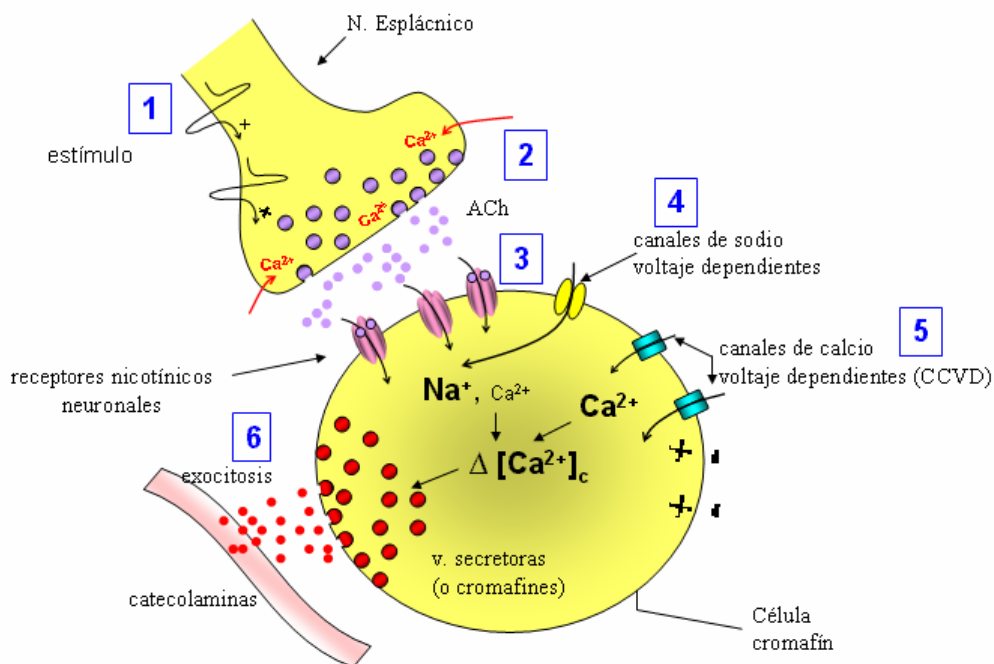
Los CCDV de las CCB han sido exhasutivamente caracterizados. Los estudios electrofisiológicos, sustentados en el uso de las herramientas farmacológicas descritas anteriormente como bloqueadores selectivos de los CCDV, principalmente DHP, conotoxinas y anatoxinas, han demostrado que las células cromafines de médula adrenal bovina expresan CCDV de tipo-L (Bossu y col., 1991a; Bossu y col., 1991b), tipo-N (Albillos y col., 1993) y tipo-P/Q (Albillos y col., 1993; Gandía y col., 1993). Además se ha descrito la presencia del ARNm para la subunidad  $\alpha_{1E}$  de los CCDV (Albillos y col., 2000; García-Palomero y col., 2000) implicada en la formación del poro iónico de este subtipo de canal. Las CCB presentan una fracción de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  total que no se bloquea por ninguno de los bloqueantes selectivos para el resto de subtipos de canales de calcio, la cual se atribuye a canales R.

El aislamiento de esta corriente de tipo R es posible cuando se usa la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado, pero no en la de célula entera (Albillos y col., 2000; García-Palomero y col., 2000), por lo que se especula que este subtipo de canal requiera de un factor citosólico soluble para mantener su actividad en la célula cromafín.

A



B Sinapsis espláncnico-cromafín



**Figura 14.** A) Esquema representativo de la inervación de las células cromafines en el interior de la médula adrenal y de cómo sus productos de secreción (catecolaminas) son vertidos al torrente sanguíneo. B) Esquema de la sinapsis espláncnico-cromafín y de la secuencia de procesos que median la liberación de catecolaminas. La llegada de un estímulo despolarizante al terminal del nervio espláncnico (1) produce la entrada de  $Ca^{2+}$  al terminal y la secreción de acetilcolina (2). La ACh activa los receptores nicotínicos de la célula cromafín produciendo la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (en menor cantidad) a su través (3). La entrada de  $Na^+$  produciría una leve despolarización suficiente para activar los CCVD (4), la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  por estos canales desencadena finalmente la exocitosis de catecolaminas (6)(Tapia, 2007).

Por último, la caracterización de los CCDV presentes en las células cromafines de diferentes especies de mamíferos ha demostrado que existe una similitud importante entre la proporción de los subtipos de CCDV expresados en las células cromafines humanas y las CCBs, con una presencia predominante de los CCDV tipo-P/Q. Los registros de corrientes totales de  $\text{Ca}^{2+}$  muestran que los CCDV de tipo-L, N y P/Q en las células cromafines humanas estarían presentes en una proporción de 20:20:60 y en las CCB en una relación de 20:30:50 (García y *col.*, 2006).



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Después de más de cien años de investigación por las industrias farmacéuticas, aún hoy, existe una gran necesidad de fármacos innovadores ya que sólo un tercio de las enfermedades existentes pueden ser tratadas de manera eficiente. Esto significa que existe una gran necesidad de nuevos fármacos que permitan innovaciones terapéuticas. En este sentido, los compuestos naturales aislados de esponjas marinas constituyen una fuente privilegiada para el hallazgo de nuevos fármacos (Hassan, 2004). Por otra parte, existe un profundo desconocimiento acerca de los efectos específicos y de los mecanismos implicados en la acción de la gran mayoría de los numerosos compuestos de origen marino que se continúan aislando. Muchos de los metabolitos secundarios aislados de esponjas marinas tienen mecanismos de acción aún desconocidos debido a que, por una parte, la relación entre su estructura química y la bioactividad desplegada, frecuentemente, no es obvia y a que generalmente se realizan estudios de actividad muy limitados que dan una mirada incompleta de las propiedades actuales de los metabolitos (Sipkema y *col.*, 2005).

Los CCDV neuronales son una importante diana terapéutica para la cual el potencial que tienen las toxinas de convertirse en fármacos es grande (Newman y Cragg, 2004), sin embargo es necesario encontrar moléculas orgánicas con una mayor selectividad que no presenten los inconvenientes de las moléculas de naturaleza peptídica.

Los compuestos orgánicos aerotionina, homoaerotionina, 11,19-dideoxifistularina y leucetamol B aislados de tres especies de poríferos han mostrado tener, entre otros, efectos neuroprotectores en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y que podrían estar mediados por un efecto de bloqueo sobre los CCDV neuronales.

Las CCBs, utilizadas clásicamente como modelo de neurosecreción, presentan CCDV bien caracterizados que pueden ser disecados selectivamente mediante herramientas farmacológicas. Las células cromafines *in situ* adoptan una forma esférica, por lo cual no habría regionalización en la distribución de los canales y por tanto todos los tipos de canales expresados en la célula endocrina adulta pueden ser accesibles (Bossu y *col.*, 1991b).

## **Objetivo general**

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio electrofisiológico en célula única para conocer el efecto directo de compuestos orgánicos aislados de poríferos y de sus análogos de síntesis sobre los CCDV neuronales en la célula cromafin bovina.

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar el efecto de los compuestos naturales, aerotionina, homoaerotionina, 11,19-dideoxifistularina y leucetamol B sobre los CCDV en células cromafines bovinas.

2. Determinar la posible selectividad de los compuestos aerotionina, homoaerotionina, 11,19-dideoxifistularina y leucetamol B por alguno de los subtipos de CCDV presentes en las células cromafines bovinas mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas y herramientas farmacológicas.

3. Determinar el efecto de compuestos análogos derivados de síntesis de los compuestos naturales estudiados, sobre los CCDV en células cromafines bovinas y su posible selectividad mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas y herramientas farmacológicas.

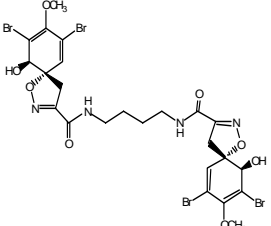
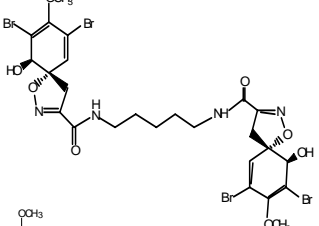
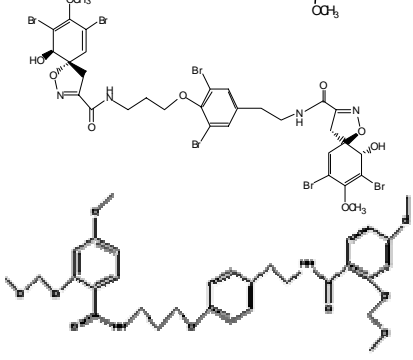

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Compuestos

Tanto los compuestos naturales como los derivados de síntesis evaluados en este estudio han sido aislados, caracterizados estructuralmente y desarrollados como cabezas de serie para la síntesis de análogos con propiedades mejoradas como bloqueadores de CCDV, por los Laboratorios Neuropharma. SAU. (Tres Cantos, Madrid).

En el estudio sobre CCDV se realizaron experimentos con 25 compuestos, incluyendo productos naturales y de síntesis. En esta tesis se presentan los resultados obtenidos tras el estudio de cinco de ellos, cuyas estructuras químicas aparecen a continuación.

Tabla 7.

Compuesto natural/ Análogos	PM	Estructura química
1. Aerotionina	818	
2. Homoaerotionina	832	
3. 11,19-dideoxifistularina  3.1 NP04634	1082  582,26	
4. Leucetamol B	488,75	

### **3.2 Aislamiento y cultivo primario de células cromafines bovinas**

Las células cromafines de la médula adrenal se aislaron a partir de glándulas adrenales de terneros, extraídas de los animales en un matadero local y transportadas hasta el laboratorio en una solución de Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  conteniendo (en mM): 154 NaCl; 5,6 KCl; 3,6  $\text{NaHCO}_3$ ; 5,6 glucosa; 5 HEPES; pH 7,2; además de antibióticos (50  $\text{UI ml}^{-1}$  de penicilina y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomina).

El protocolo de cultivo que se siguió fue el de digestión de la médula adrenal con colagenasa descrito por Livett en 1984 (Livett, 1984) con las modificaciones introducidas por Moro (Moro y *col.*, 1990). Se realiza en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Una vez en la unidad de cultivos, se retira el tejido graso periadrenal y se lava la glándula inyectándole Locke con una jeringa a través de la vena adrenolumbar (o medular central). El lavado se repite varias veces y sirve para eliminar los eritrocitos del sistema vascular de la glándula. A continuación se inyectan, también a través de la vena adrenolumbar, unos 3,5 ml de solución enzimática de colagenasa (colagenasa al 0,25% + albúmina sérica bovina al 0,5%, disueltas en Locke) y se incuba la glándula a 37°C para que la colagenasa actúe en condiciones óptimas. La inyección de colagenasa se repite hasta un total de 3 veces, a intervalos de 20 min.

Finalizada la digestión enzimática, se secciona la glándula longitudinalmente y se extrae la médula ya digerida, que se lava de la colagenasa mediante la adición de grandes volúmenes de Locke. Con un pequeño par de tijeras el tejido de la médula es troceada en pequeñas piezas (menos de 1 mm cúbico), de acuerdo al autor, se recomienda este método porque causa el mínimo daño a las células (Livett y *col.*, 1987).

La suspensión así obtenida se filtra a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 217  $\mu\text{m}$ , que permite eliminar fragmentos de médula no digeridos. La suspensión filtrada se centrifuga (120xg, 10 min T<sup>a</sup> amb) para sedimentar las células.

Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en Locke, tras lo cual se obtiene una nueva suspensión celular que se filtra a través de una malla de nylon con un tamaño de poro menor, de 82  $\mu\text{m}$ , que permite la eliminación de grasa y de fibras.

A continuación se separan y purifican las células mediante un gradiente de Percoll, para lo cual se añade Percoll estéril a la suspensión celular y se centrifuga (20.000xg, 20 min, 20-25°C). Tras esta centrifugación se observan varias bandas en el gradiente, entre las que destacan una superior con una mezcla de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas y una inferior de cromafines principalmente adrenérgicas. Se recogen las células contenidas en estas dos capas y se realiza un primer lavado del Percoll, añadiendo grandes cantidades de Locke y centrifugando (120xg, 10 min, T<sup>a</sup> amb). Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (se realiza así un segundo lavado del Percoll). Finalmente, la suspensión celular se centrifuga de nuevo (120xg, 10 min, T<sup>a</sup> amb) y el precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspende en un DMEM al que se le han añadido: 5% de suero bovino fetal, y antibióticos (50 UIml<sup>-1</sup> de penicilina y 50  $\mu\text{gml}^{-1}$  de estreptomina). Puede revisarse un protocolo muy completo y detallado en O'Connor, 2007.

Para el registro de las corrientes iónicas (experimentos de *patch-clamp*) las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (previamente tratados con polilisina para facilitar la adhesión de las células) a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por cubreobjeto. Las células se mantuvieron de dos a seis días a 37°C en un incubador con atmósfera saturada en agua y 5% de CO<sub>2</sub>. En los experimentos se utilizaron células de 1 a 4 días de cultivo.

### **3.3 Registros electrofisiológicos**

#### **3.3.1 La técnica de *patch-clamp***

En este estudio, las corrientes totales a través de los CCDV fueron medidas mediante la técnica de *patch-clamp* (Hamill y col., 1981).

El desarrollo de la electrofisiología (Verkhatsky y col., 2006), con la aparición de las técnicas de registro intracelular y de fijación de voltaje, contribuyó al avance en el

conocimiento de los mecanismos de membrana que permiten la comunicación neuronal y la transducción de señales. Pero fue la aparición de la electrofisiología moderna, con el desarrollo de la denominada técnica de *patch-clamp*, lo que revolucionó este campo de estudio, hasta el punto de permitir estudiar las proteínas que controlan los flujos iónicos a través de las membranas, y con una sensibilidad tal que incluso permitía estudiar la actividad biológica de una única proteína (Hamill y col., 1981; Hille, 1992).

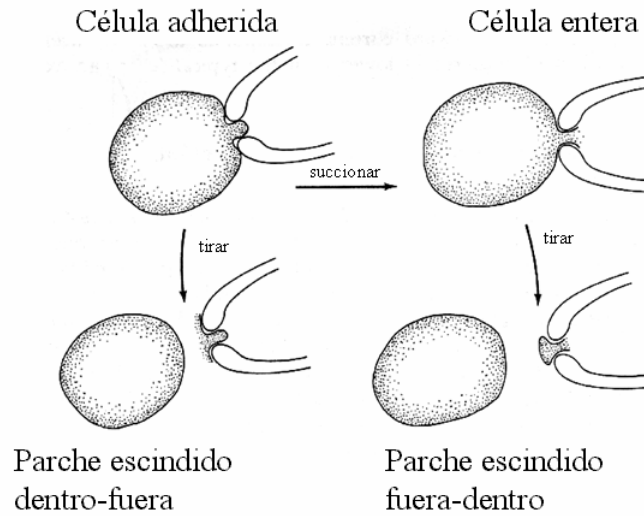
La técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño trozo (o parche) de membrana de la célula con ayuda de un amplificador (Fig. 15); de este modo, si en respuesta a un determinado estímulo, se produce alguna corriente de entrada o de salida de iones a través de los canales y/o receptores presentes en dicho parche de membrana, la medición de la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana será equivalente al flujo de iones que se ha producido a través del parche de membrana de la célula.

Esta técnica emplea un único electrodo que simultánea a elevada frecuencia el registro de voltaje (para mantenerlo fijo en el parche de membrana) y el registro de corriente (la inyectada para mantener fijo el potencial de membrana). Sus ventajas con respecto a la clásica de fijación de voltaje con dos electrodos (desarrollada en los años 50 para el estudio de potenciales de acción), son que se puede aplicar a células pequeñas, en las que sería imposible introducir dos electrodos, y que presenta una buena relación señal-ruido, por lo que permite el registro de corrientes del orden de picoamperios (pA). El electrodo de registro es de plata (Ag) recubierta de Ag/AgCl; estos iones son los que se utilizarán para estabilizar y fijar el potencial de membrana.

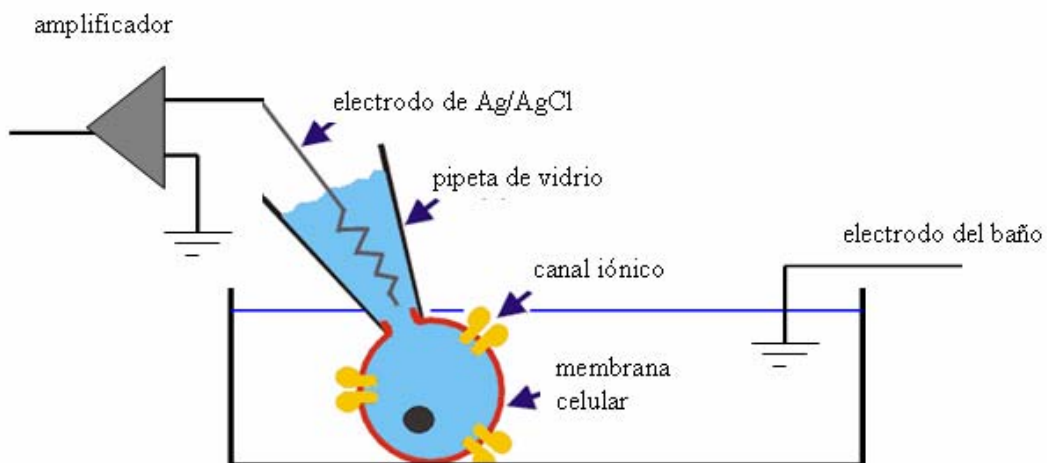
El primer paso para ejecutar esta técnica es formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una pipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, con lo que se forma un sello eléctrico de alta resistencia (de unos 50  $\text{M}\Omega$ ) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente.



A



B



**Figura 15. Patch-clamp.** A) Representación de las distintas configuraciones posibles de realizar con la técnica de *patch-clamp*. B) Esquema del sistema de registro en la configuración de célula entera.

Si la punta de la pipeta mantiene limpia su superficie, la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de 10-100 G $\Omega$ , conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, por lo que se puede fijar el potencial del parche de membrana. Se adquiere así la configuración de célula adherida (o *cell attached*).

Estos sellos son además mecánicamente muy estables, por lo que permiten diversas manipulaciones mecánicas que originarán las distintas configuraciones de la técnica (célula adherida, célula entera, parche escindido dentro-fuera, parche escindido fuera-dentro; Fig. 15).

La configuración de célula entera se obtiene a partir de la de célula adherida, cuando la aplicación de una succión o presión negativa adicional al interior de la pipeta consigue romper el parche de membrana que hay bajo los bordes de la misma, con lo que todo el interior de la pipeta entra en contacto eléctrico con todo el interior de la célula y se podrán registrar las corrientes que fluyen a través de los canales y/o receptores abiertos en la totalidad de la membrana celular. Es la configuración más sencilla de obtener y permite el control de la composición intracelular ya que tras la ruptura del parche la solución intracelular se equilibra con la solución del interior de la pipeta.

### **3.3.2 Medición de corrientes totales a través de canales de $\text{Ca}^{2+}$ en la configuración de célula entera y en modo de fijación de voltaje.**

Todos los registros presentados en esta tesis se realizaron a temperatura ambiente ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ). El cubreobjeto con las células adheridas en su superficie, se colocó en la cámara de experimentación de metacrilato y ésta, a su vez, sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot, Japón). La cámara se perfundió continuamente con una solución control que contenía (en mM): 137 NaCl; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 2  $\text{CaCl}_2$ ; 10 HEPES/NaOH; pH 7,4. Para los registros de corrientes se utilizó 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  en lugar de 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  como ión transportador de carga y se suprimieron las corrientes de  $\text{Na}^+$  adicionando 1-2  $\mu\text{M}$  de TTX. Las células se dializaron con la solución intracelular que contenía (en mM): 10 NaCl; 100 CsCl; 20 tetraetilamonio.Cl; 5 MgATP; 14 EGTA; 20 HEPES/CsOH; 0.3 Na.GTP; pH 7,2.

La aplicación aguda de soluciones se realizó mediante un sistema de válvulas con solenoide miniatura excluyentes, operado manualmente (The Lee Company, Westbrook, CT, USA) acopladas a una pipeta de perfusión de múltiples vías con una punta de salida común que se posicionaba a menos de 100  $\mu\text{m}$  de la célula en experimentación (Fig. 13). La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido así como de las características de la pipeta empleada alcanzando un reemplazo completo en el entorno de la célula en menos de 1 s.

Para la aplicación aguda de las toxinas se siguieron las indicaciones experimentales señaladas por McDonough relativas a evitar la pérdida de potencia por absorción en las mangueras de perfusión o por la presencia de trazas de metales pesados (McDonough, 2004).

Las pipetas de *patch* se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Kimax-51<sup>®</sup>, Kimble Glass Inc., diámetros 1,5-1,8 mm x 100 mm) con ayuda de un estirador vertical (modelo PP-830, Narishige, Tokio, Japón), aplicando calor en dos pasos sucesivos. La punta de las pipetas se pulió al calor de una resistencia en una microforja (MF-830, también de Narishige), hasta que su diámetro interior era de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ; la resistencia de las pipetas así obtenidas, una vez rellenas con la solución intracelular, fue de 3-4 M $\Omega$ .

En la etapa inicial de los experimentos los electrodos se conectaron al preamplificador del amplificador DAGAN 8900, permitiendo la cancelación de los transientes capacitativos y la compensación de las resistencias en serie. Para la adquisición, almacenamiento y análisis de los datos se utilizó una tarjeta conversora analógico-digital Labmaster (Axon Instruments) y un ordenador PC con el programa informático pCLAMP (Axon Instruments, Union City, California, USA). Posteriormente y hasta el término del trabajo experimental los registros electrofisiológicos fueron realizados conectando los electrodos al preamplificador de un amplificador de *patch-clamp* EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) con una interfase ITC-16 AD/DA integrada. Para la adquisición de datos se empleó el programa informático PULSE (también de HEKA) y un ordenador PC. Los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 50 kHz. El análisis de los datos se realizó con el programa OriginPro 7.0 (OriginLab), al que se exportaron los datos procedentes de Pulse con ayuda del programa Origin DataAccess 7.0 (Bruyton & OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

El potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV (*HP*). Para el registro de las corrientes a través de los CCDV se aplicaron pulsos despolarizantes cuadrados desde el potencial de fijación, de intensidad, duración y a intervalos que se especifican en cada experimento.

### 3.4 Materiales y reactivos

El DMEM, la colagenasa tipo I, el suero fetal bovino, la penicilina y la estreptomicina se adquirieron en Gibco (Madrid, España). Los capilares de vidrio de borosilicato para *patch* pertenecían a Kimble Glass Inc. (Vineland, USA). El resto de los compuestos utilizados se adquirieron en Sigma-Aldrich o Panreac con grado analítico PA (España) y se disolvieron en agua o DMSO según las especificaciones del proveedor.

Los compuestos naturales, los compuestos de síntesis y el bloqueante de CCDV tipo-L nifedipino fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de  $10^{-2}$  M, alicuotados y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las toxinas  $\omega$ -conotoxina GVIA y  $\omega$ -agatoxina IVA; adquiridas en Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japón); fueron preparadas en agua destilada desionizada estéril a una concentración de  $10^{-4}$  M, alicuotadas y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La TTX fue adquirida en Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) y fue preparada del mismo modo a una concentración de  $10^{-3}$  M.

La solución intracelular para *patch clamp* se descongelaba en el día a partir de un *stock* conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, cada día de experimentos fueron diluidos en la solución salina (Krebs-Hepes) a la concentración deseada. A las concentraciones más altas utilizadas (no más de 0.1%), el DMSO no tuvo efectos significativos sobre la corriente de Bario ( $I_{\text{Ba}}$ ).

### 3.5 Estadística

Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media del número de células o experimentos indicados.

En el análisis estadístico se utilizó, de acuerdo con el diseño experimental, la prueba t de Student (datos pareados).

Para comparar las diferencias entre los distintos grupos de datos se utilizó la prueba t de Student (no pareado). El nivel de significación se estableció con un valor de  $p < 0,05$  (\*) ó  $p < 0,01$ (\*\*).

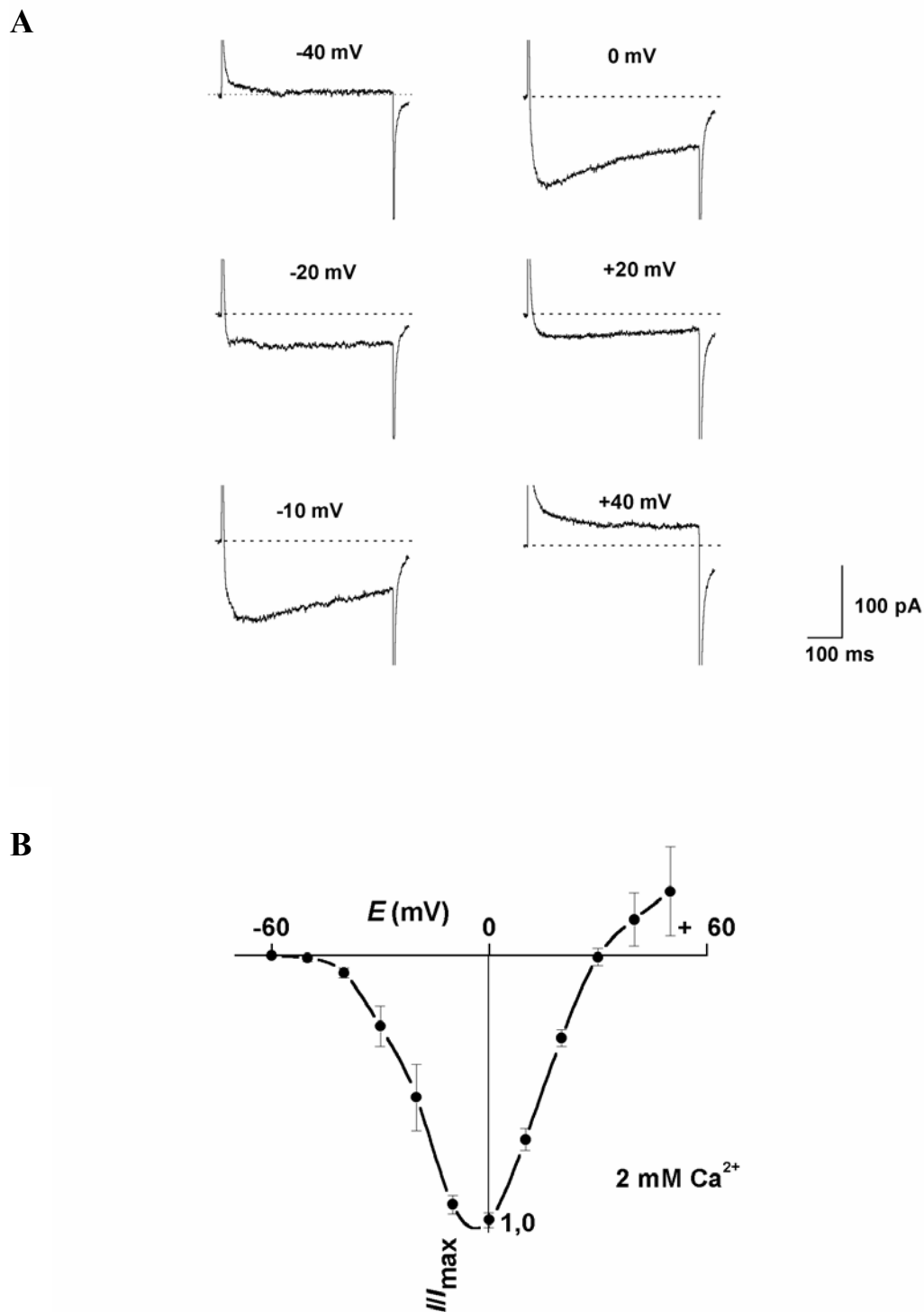
## **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Aislamiento y determinación del perfil de la corriente de bario ( $I_{Ba}$ ) control

Los primeros experimentos tuvieron como objetivo reproducir los registros descritos previamente de corrientes de  $Ca^{2+}$  ( $I_{Ca}$ ) a través de CCDV en la CCB mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera y en modo de fijación de voltaje. Como ya ha sido mencionado, las CCB presentan en su membrana plasmática una serie de canales iónicos dependientes del voltaje, además de los CCDV (Artalejo, 1995). El registro de las corrientes globales tras una despolarización tiene, por tanto, un importante componente de corrientes de entrada de  $Na^+$  y salida de  $K^+$  cuya gran magnitud podría ocultar la  $I_{Ca}$ . Para lograr el aislamiento de la  $I_{Ca}$  los registros se realizaron utilizando una solución extracelular que contenía 2 mM de  $Ca^{2+}$ , 1-2 $\mu$ M de TTX para bloquear las corrientes de  $Na^+$ ; TEA<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> en la solución intracelular para bloquear las corrientes de  $K^+$  (ver sección de materiales y métodos).

De acuerdo a los registros clásicos de  $I_{Ca}$  a través de CCDV en la CCB (Fenwick y *col.*, 1982b) y a los trabajos de nuestro grupo (García y *col.*, 2006) la aplicación escalonada de pulsos despolarizantes cuadrados, de 50 ms de duración, desde un HP de -80 mV a potenciales entre -60 a +50 mV, en incrementos de 10 mV y a intervalos de 10 s ; protocolo que en este estudio será llamado tren de pulsos despolarizantes (Fig. 16, A); inducen una corriente de entrada (por convención hacia valores negativos) cuyo umbral de activación se encuentra en torno a los -40 mV, con una intensidad máxima de corriente entre los -10 a 0 mV y con un potencial (E) de reversión de +50 mV (Fig. 16). La  $I_{Ca}$  registrada bajo estas condiciones experimentales tuvo un valor de intensidad máxima de  $-121,9 \pm 26,5$  pA (n=4).

La presencia de 14 mM EGTA y la ausencia de  $Ca^{2+}$  en la solución intracelular evitaron el fenómeno de “*run-down*”, es decir, la tendencia de la  $I_{Ca}$  a disminuir con el tiempo. Este fenómeno también se redujo al aplicar pulsos de corta duración (50 ms) a baja frecuencia (0,1 Hz).



**Figura 16. Corrientes globales en presencia de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.** A) Registro originales de la  $I_{\text{Ca}}$  inducida en una célula por un tren de pulsos despolarizantes cuadrados desde un HP de -80 mV en presencia de 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Los pulsos con una duración de 50 ms se aplicaron a potenciales entre -60 y +50 mV en incrementos de 10 mV y a una frecuencia de 0,1Hz. B) Intensidad de la corriente normalizada ( $I/I_{\text{max}}$ ) en función del E de prueba (Curva I-V). Los experimentos fueron realizados con 1  $\mu\text{M}$  de TTX en la solución extracelular y TEA-Cs en la solución intracelular. La gráfica muestra la media  $\pm$  error estándar de 4 células.



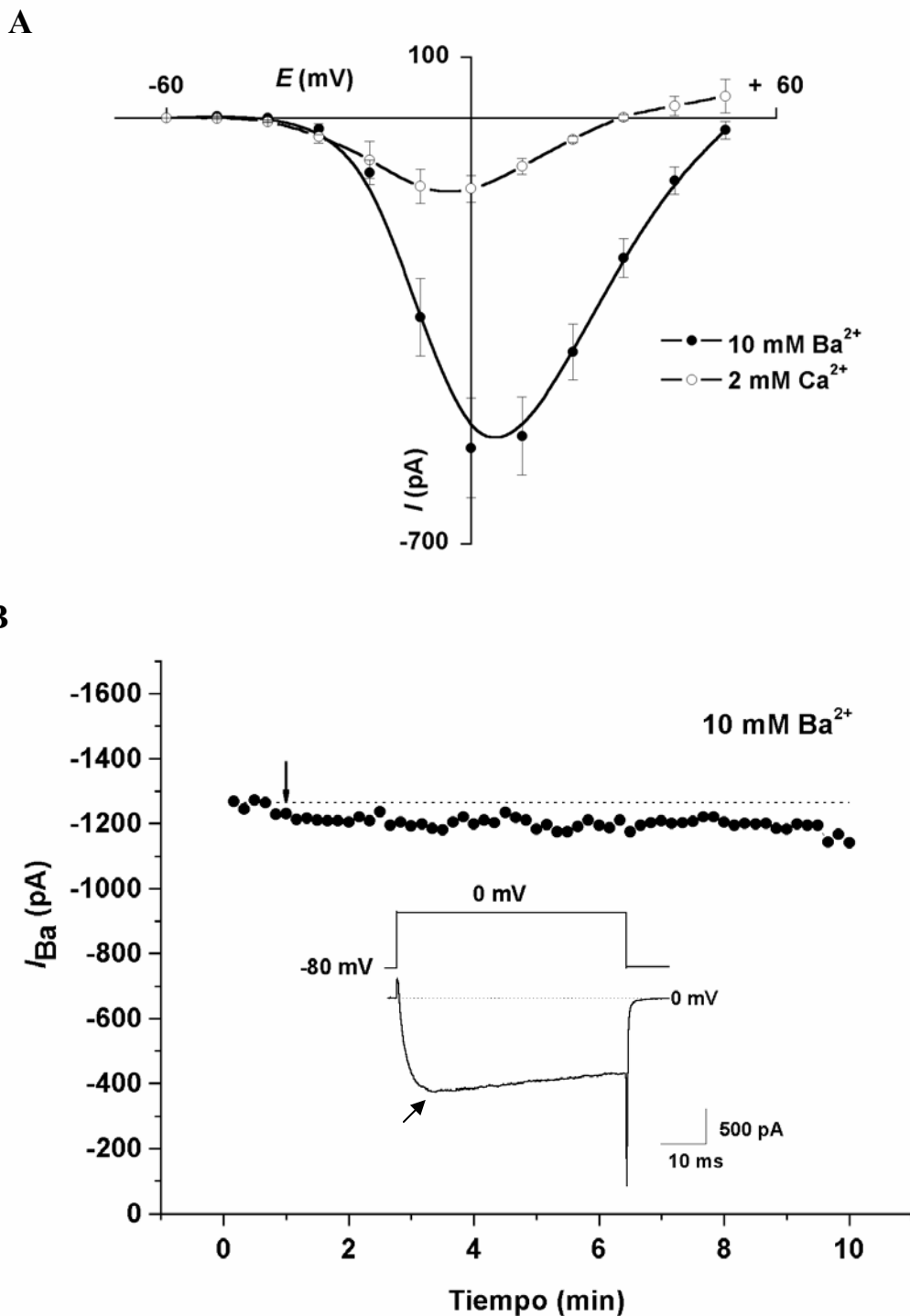
Sin embargo, para evaluar el efecto directo de los compuestos sobre los CCDV fue de gran importancia contar con una buena resolución en los registros de corrientes, así como disponer de una ventana de tiempo que permitiese una observación completa del fenómeno sobre corrientes estables. La estrategia utilizada fue reemplazar el  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución extracelular, como ión de carga. Debido a que los CCDV presentan una menor afinidad al  $\text{Ba}^{2+}$ , la permeabilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  con respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  es mayor, además su acumulación en el citosol inhibe de manera menos eficiente los CCDV que el  $\text{Ca}^{2+}$  por lo cual la intensidad de las  $I_{\text{Ba}}$  es significativamente mayor que las  $I_{\text{Ca}}$  y la pérdida de corriente en el curso temporal es significativamente menor.

De esta forma, en presencia de 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  se realizó el registro de la  $I_{\text{Ba}}$  mediante la aplicación de un tren de pulsos despolarizantes idéntico al aplicado en los registros con 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. En 360 células ensayadas, la máxima intensidad de la  $I_{\text{Ba}}$  tuvo un valor promedio de  $-950,8 \pm 25$  pA, alcanzándose este a valores más positivos; entre 0 a +10 mV; como también el potencial de reversión a +50 mV. En la Fig. 17A se muestra la media de 10 células ( $-610 \pm 74,3$  pA).

Para determinar el curso temporal de la corriente de máxima amplitud, es decir la relación de intensidad de corriente *versus* el tiempo, se realizó la aplicación repetitiva de un pulso despolarizante cuadrado a una frecuencia de 0,1 Hz desde un HP de -80 mV hasta el potencial de máxima intensidad de corriente, determinado previamente por un tren de pulsos. La Figura 17,B muestra un trazo de  $I_{\text{Ba}}$  característico (inserto) y el curso temporal obtenido tras representar el valor de máxima intensidad de corriente *versus* el tiempo.

#### **4.2 Efecto de los compuestos naturales sobre la magnitud de la $I_{\text{Ba}}$**

El estudio inicial del efecto de los compuestos naturales sobre los CCDV se realizó perfundiendo todos los fármacos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Esta concentración fue elegida basándonos en la descripción de los experimentos realizados en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.



**Figura 17. Corrientes globales en 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  extracelular.** **A)** Intensidad de la corriente en función del E de prueba (Curva *I-V*). Los experimentos fueron realizados aplicando un tren de pulsos despolarizantes con 1  $\mu\text{M}$  de TTX y 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (4 células) o 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  (10 células) en la solución extracelular y TEA-Cs en la solución intracelular. Los pulsos con una duración de 50 ms se aplicaron a potenciales entre -60 y +50 mV en incrementos de 10 mV y a una frecuencia de 0,1Hz. **B)** Curso temporal y registro de un trazo original representativo de las  $I_{\text{Ba}}$  control inducidas en una célula por un tren de pulsos despolarizantes cuadrados desde un HP de -80 mV a 0 mV en presencia de 10 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  extracelular. Las flechas indican el pico de corriente máxima del trazo representado.

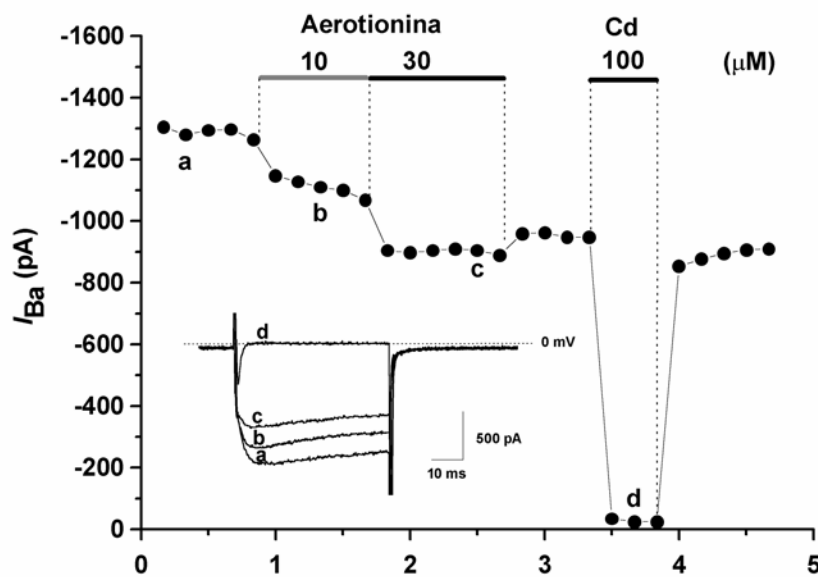
En esos experimentos en neuroblastoma, tras una incubación de 10 minutos a una concentración de 18  $\mu\text{M}$ , los compuestos aerotionina, homoaerotionina y 11,19-dideoxifistularina inhibieron de forma significativa ( $75.4\pm 1.3\%$ ,  $94.9\pm 4.4\%$  y  $33.7\pm 14.4\%$ , respectivamente) el incremento de la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) inducido por una despolarización con alto  $\text{K}^+$  (60 mM) en células SHSY-5Y cargadas con fluo-4 AM (Martinez y col., 2005).

Para estudiar el posible efecto de bloqueo de los compuestos sobre la  $I_{\text{Ba}}$ , se realizaron registros de corrientes en la configuración de célula entera, modo fijación de voltaje aplicando entre 4 a 6 pulsos despolarizantes desde -80 mV a 0 o -10 mV durante 50 ms cada 10 segundos (pulsos control). Tras conseguir la estabilización de la  $I_{\text{Ba}}$  se aplicó el compuesto de forma aguda durante aproximadamente 1 min para luego efectuar su lavado. En los registros originales realizados en dos células distintas mostrados en la Fig. 18 (insertos) se observa el efecto de bloqueo del pico de la  $I_{\text{Ba}}$  producido por los compuestos aerotionina (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) y homoaerotionina (10  $\mu\text{M}$ ). Los dos compuestos produjeron un bloqueo parcialmente reversible de la  $I_{\text{Ba}}$  a 10  $\mu\text{M}$ , como puede apreciarse en los cursos temporales (Fig. 18) obtenidos al representar los valores de máxima amplitud de corriente (corriente al pico) correspondiente a cada pulso despolarizante.

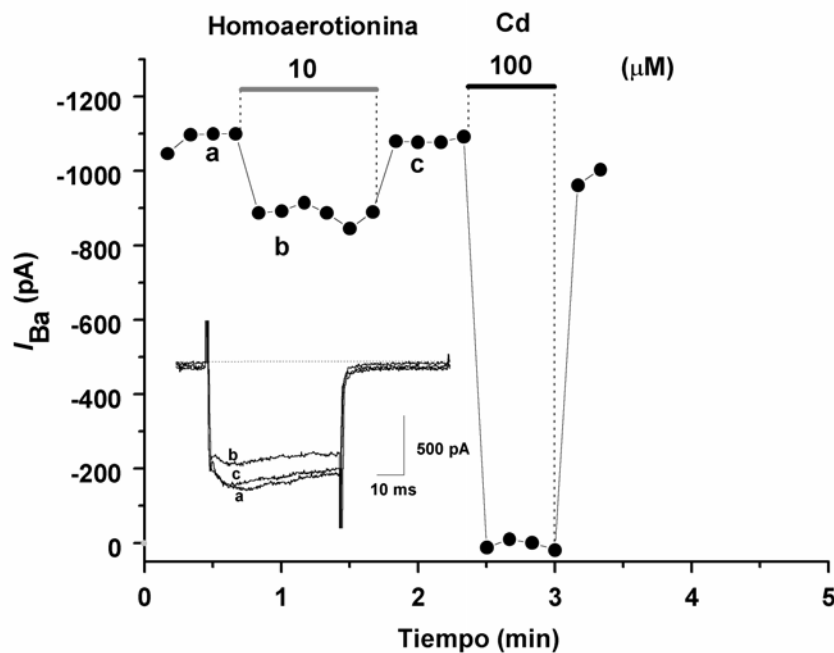
El bloqueo producido por los compuestos se expresa como porcentaje de inhibición y fue calculado como la diferencia entre la media de la respuesta máxima incluyendo los tres últimos pulsos antes de la aplicación del compuesto (control, 100%) y la respuesta media de los tres últimos pulsos durante la aplicación del compuesto (inhibición).

El bloqueo inducido por aerotionina y homoaerotionina a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  fue de  $15,3\pm 3,9\%$  (n=4) y de 14,5% (n=2), respectivamente. Para verificar que la corriente registrada correspondía a la corriente que fluía a través de los CCDV, se aplicó  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ); como bloqueante no selectivo de los CCDV; al final de cada experimento.

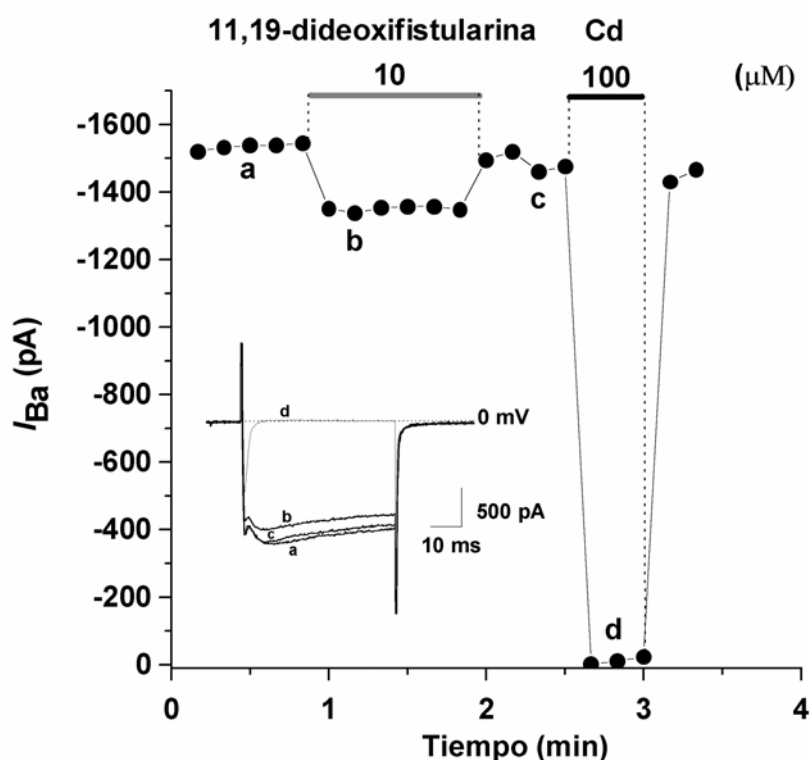
A



B



**Figura 18. Inhibición de la  $I_{Ba}$  inducida por los compuestos homólogos aerotionina y homoaerotionina en las CCB.** Los registros fueron obtenidos en dos células distintas mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. **A)** Curso temporal y trazos originales (inserto) representativos de la  $I_{Ba}$  inducida en una célula mediante la aplicación de un pulso despolarizante cuadrado de 50 ms de duración desde un HP de -80 mV a -10 mV en intervalos de 10 s. La  $I_{Ba}$  control (a) fue parcialmente inhibida tras la aplicación secuencial de concentraciones crecientes de aerotionina (10 y 30  $\mu$ M; b y c, respectivamente). La aplicación aguda de homoaerotionina (10  $\mu$ M) también indujo una inhibición de la  $I_{Ba}$  que fue parcialmente reversible tras el lavado (**B**). Al final de cada experimento, la aplicación de Cd<sup>2+</sup> (100  $\mu$ M), un bloqueante no selectivo de los CCDV, produjo la inhibición total de las corrientes que fluyen por CCDV, pero no de las  $I_{Na}$  (A, d) al realizar el experimento en ausencia de TTX.

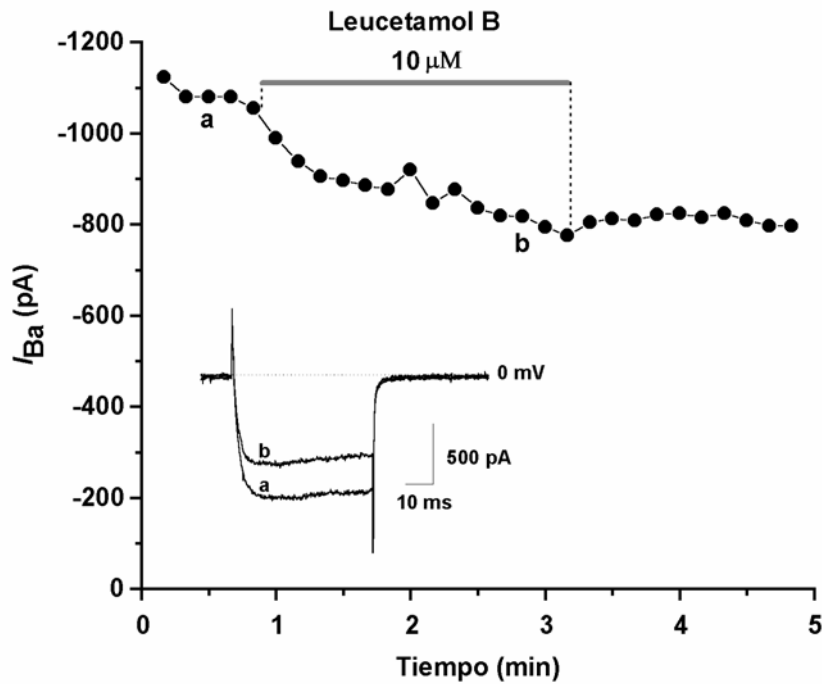


**Figura 19. Inhibición de la  $I_{Ba}$  inducida por la 11,19-dideoxifistularina.** Los registros originales representativos fueron obtenidos en una célula mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. Tras la aplicación de cinco pulsos despolarizantes cuadrados (a); (ver Fig. 18); la aplicación aguda de la 11,19-dideoxifistularina ( $10 \mu\text{M}$ ) indujo una inhibición rápida (b) y parcialmente reversible (c) de la  $I_{Ba}$  control, la cual fue totalmente inhibida por  $\text{Cd}^{2+}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) (d).

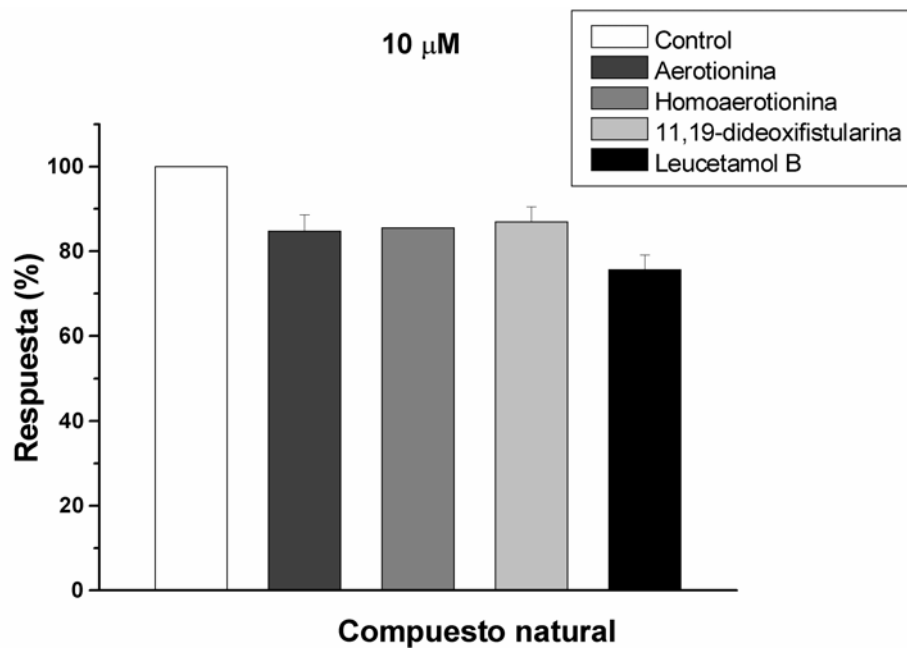
La figura 19 muestra los registros originales de la  $I_{Ba}$  de una célula a la cual se le aplicó el mismo protocolo de pulsos despolarizantes descrito anteriormente. En el experimento se observa que la 11,19-dideoxifistularina a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  indujo una rápida inhibición del pico de la  $I_{Ba}$ , similar a la producida por los otros derivados de bromotirosina estudiados. El efecto de inhibición a esta concentración fue completamente revertido tras el lavado. El valor medio de la inhibición ensayada en tres células fue de  $13,1 \pm 3,6\%$ .

El leucetamol B ( $10 \mu\text{M}$ ) produjo un bloqueo de la  $I_{Ba}$  mayor que los derivados de bromotirosina ( $24,4 \pm 3,5\%$ ,  $n=3$  células). A diferencia de estos compuestos la inhibición del leucetamol B fue progresiva; tras 2,5 min de aplicación no alcanzó a estabilizarse por completo; y fue además prácticamente irreversible (Fig. 20).

A



B

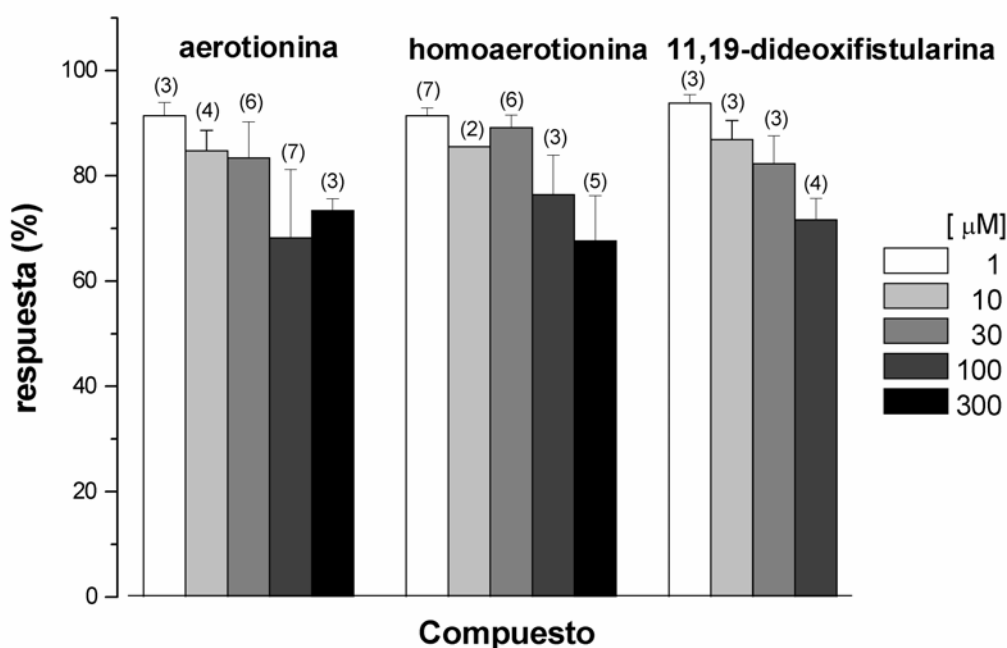


**Figura 20. Inhibición de la  $I_{Ba}$  inducida por leucetamol B.** A) Los registros originales representativos fueron obtenidos en una célula mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. Tras la aplicación de cinco pulsos despolarizantes cuadrados (a); (ver Fig. 18); la aplicación aguda del leucetamol B ( $10 \mu\text{M}$ ) indujo una inhibición paulatina (b) y prácticamente irreversible de la  $I_{Ba}$  control que fue mayor a la inducida por los derivados de bromotirosina, como se observa en la gráfica comparativa del bloqueo de los compuestos naturales a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ , expresado como porcentaje de respuesta  $\pm$  error estándar). B) Gráfica comparativa del efecto de los compuestos naturales a  $10 \mu\text{M}$  sobre la  $I_{Ba}$ .

#### 4.2.1 Efecto de los derivados de bromotirosina sobre la magnitud de la $I_{Ba}$ en función de la concentración

Como hemos observado anteriormente, en los experimentos realizados con aerotionina, la aplicación sucesiva de dos concentraciones crecientes del compuesto (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) indujo una inhibición con características de concentración-dependencia (Fig. 18A).

Para evaluar el efecto de distintas concentraciones aplicadas de forma aislada sobre la  $I_{Ba}$ , en una segunda etapa se realizaron experimentos a concentraciones entre 1 y 300  $\mu\text{M}$ , que evidenciaron la concentración-dependencia del bloqueo producido por los derivados de bromotirosina. La Figura 21 muestra la gráfica comparativa de la inhibición de la respuesta control ( $I_{Ba}$ ) por los compuestos aerotionina, homoaerotionina y 11,19-dideoxifistularina. No se observaron cambios cinéticos significativos de las corrientes a ninguna de las concentraciones probadas.



**Figura 21. Inhibición concentración-dependiente de la  $I_{Ba}$  inducida por los compuestos de la esponja marina *Aplysina cavernicola*.** Las  $I_{Ba}$  fueron inducidas en célula entera, modo fijación de voltaje, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes e igual protocolo al explicado en la Fig. 18. La aplicación de los compuestos fue realizado a concentraciones únicas y en células individuales. Los datos están expresados como porcentaje de respuesta  $\pm$  error estándar. Entre paréntesis se indica el n° de células que fueron ensayadas en cada caso.

Aerotionina y homoaerotionina mostraron una gran variabilidad en su efecto de bloqueo en las distintas células aplicadas. Debido a que disponíamos de cantidades muy restringidas de compuesto, el Leucetamol B sólo fue probado a una concentración.

#### **4.3 Efecto de los compuestos naturales marinos sobre la relación corriente-voltaje**

Para descartar que el efecto observado como bloqueo de la  $I_{Ba}$  por los compuestos naturales no fuese debido a un desplazamiento del pico de la corriente hacia otros potenciales; lo cual sería observado también como un bloqueo al analizar sólo la corriente máxima; se estudió el efecto de los compuestos sobre la relación corriente-voltaje ( $I-V$ ). Para ello se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes de intensidad creciente desde -60 mV hasta +50 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV, con una duración de 50 ms cada pulso, a intervalos de 10 s. Este protocolo se aplicó en ausencia (control) y en presencia del compuesto estudiado. El valor del pico de corriente obtenida se representó respecto de cada uno de los 12 pulsos (-60 a +50 mV) correspondientes, obteniéndose así la relación  $I-V$ .

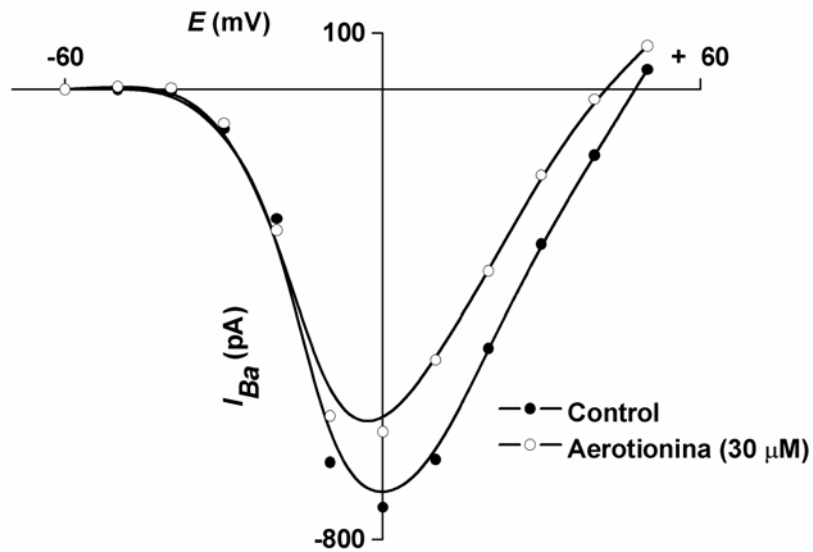
En la Fig. 22 se observa que aerotionina (30  $\mu\text{M}$ ) y homoaerotionina (10  $\mu\text{M}$ ) producen una inhibición de la  $I_{Ba}$  sin alterar el perfil de la relación  $I-V$  control, destacando que este bloqueo se produjo principalmente a potenciales más positivos, mayores a -10 mV. Ni leucetamol B ni la 11,19-dideoxifistularina fueron probados.

#### **4.4 Efecto de los compuestos naturales marinos sobre la $I_{Ba}$ remanente tras la aplicación de nifedipino.**

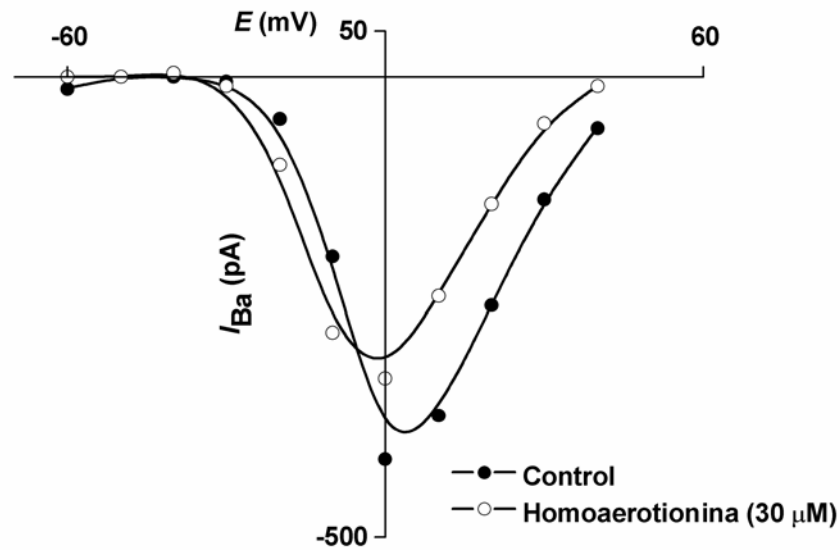
Para estudiar si el bloqueo preferente a potenciales más despolarizados era debido a la selectividad de los compuestos marinos por alguno de los subtipos de CCDV presentes en las CCB, se utilizó como herramienta farmacológica el nifedipino, una dihidropiridina que bloquea selectivamente los CCDV de tipo-L. En las CCB este fármaco bloquea alrededor de un 20% la  $I_{Ba}$  aplicado a una concentración de 3  $\mu\text{M}$ . El protocolo experimental consistió en la aplicación inicial de nifedipino para bloquear el componente L de la corriente total y posteriormente la aplicación del compuesto en estudio (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de nifedipino, evaluando el efecto sobre la corriente máxima.



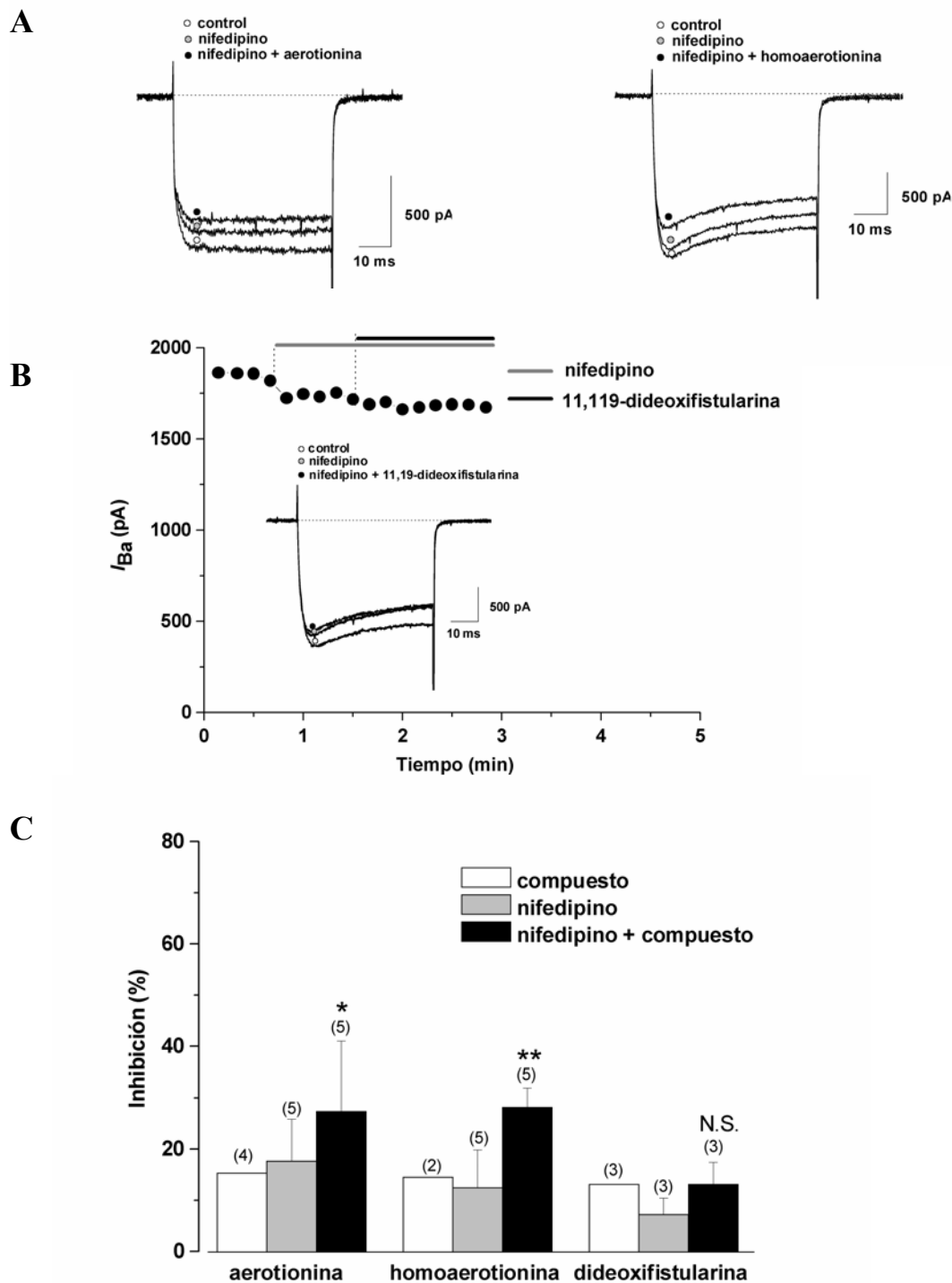
A



B

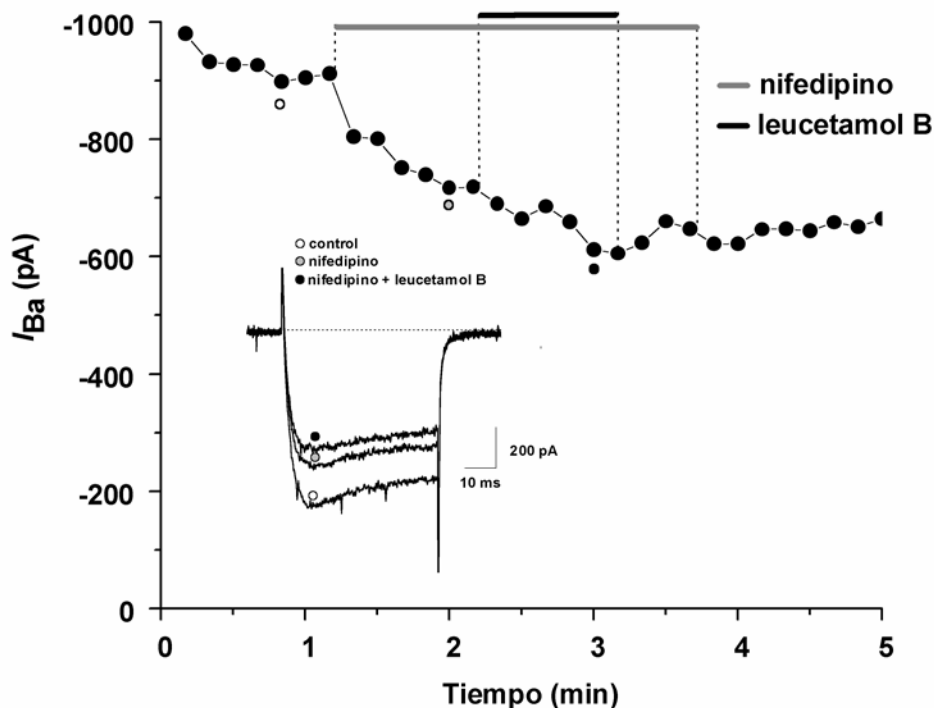


**Figura 22. Efecto de aerotionina y homoerotionina sobre la relación  $I$ - $V$  en células cromafines bovinas.** La corriente fue inducida aplicando un protocolo de pulsos despolarizantes sucesivos a intensidad creciente desde  $-60$  a  $+50$  mV en incrementos de  $10$  mV desde un potencial de fijación de  $-80$  mV. La gráfica representativa fue construida a partir de los valores de corriente máxima obtenida a los respectivos potenciales. El protocolo fue aplicado a las células antes (control) y en presencia de aerotionina (**A**) homoerotionina (**B**) observándose que el bloqueo es debido a la inhibición de la  $I_{Ba}$  máxima y no a un desplazamiento de la relación  $I$ - $V$ . En ambos experimentos la  $I_{Ba}$  se produjo a  $0$  mV, tanto para el control como durante la aplicación de los compuestos.



**Figura 23. Inhibición de la  $I_{Ba}$  por los derivados de bromotirosina en presencia de nifedipino.** (A,B) Registros originales de la  $I_{Ba}$  obtenida en tres células distintas tras la aplicación de pulsos despolarizantes a 0 mV durante 50 ms a intervalos de 10 s desde un potencial de fijación de -80 mV. Las células se perfundieron con nifedipino (3 ó 10  $\mu$ M) y posteriormente con una mezcla de nifedipino y el compuesto respectivo (10  $\mu$ M). Aerotionina y homoaerotionina indujeron un bloqueo adicional significativo del pico de la  $I_{Ba}$  (C), que en el caso de la 11,19-dideoxifistularina es no significativo (B, C). El bloqueo adicional correspondería a un bloqueo de los CCDV no-L. El número de experimentos se indica entre paréntesis. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (prueba de t de Student para datos pareados).

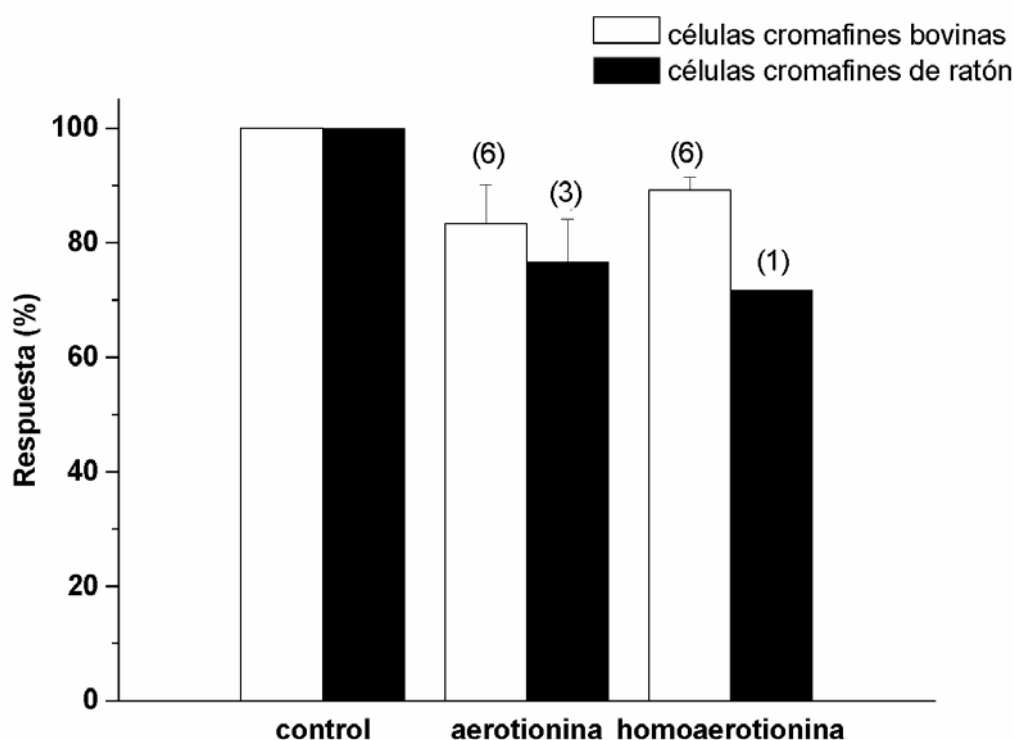
En la figura 23C se observa cómo el nifedipino inhibió la  $I_{Ba}$  en un 26% (10  $\mu$ M); 21,8% (10  $\mu$ M) y  $7,2\pm 3,3\%$  (3  $\mu$ M) en tres células aisladas distintas (A, B). La aplicación posterior de aerotionina, homoaerotionina y la 11,19-dideoxifistularina en presencia de nifedipino produjo un bloqueo adicional de la  $I_{Ba}$  de un 14,5%; 15,7% y 5,9%, respectivamente. La fig. 23C muestra la inhibición del compuesto (10  $\mu$ M) aplicado de forma aislada en experimentos individuales (barras blancas). En experimentos similares el leucetamol B (10  $\mu$ M) produjo un bloqueo adicional de la  $I_{Ba}$  (8,7%) sobre el bloqueo de nifedipino (21,8% a 10  $\mu$ M) (Fig. 24). Estos resultados sugieren que aerotionina y homoaerotionina inhibirían mayoritariamente el componente no-L de la corriente, mientras que la 11,19-dideoxifistularina inhibiría de forma parcial ambos componentes. El leucetamol B inhibiría ambos componentes, mayoritariamente el L.



**Figura 24. Inhibición de la  $I_{Ba}$  por leucetamol B en presencia de nifedipino.** Curso temporal representativo y registro original de la  $I_{Ba}$  (inserto) obtenida en una célula inducida por aplicación de pulsos despolarizantes a 0 mV durante 50 ms a intervalos de 10 s desde un potencial de fijación de -80 mV. La célula fue perfundida con nifedipino (10  $\mu$ M) y posteriormente con una mezcla de nifedipino y leucetamol B (10  $\mu$ M) que indujo un bloqueo adicional débil de la  $I_{Ba}$  remanente.

#### 4.5 Efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la magnitud de la $I_{Ba}$ en células cromafines de ratón.

Las células cromafines de ratón presentan una proporción de CCDV diferente a la de las CCB con una mayor proporción de CCDV tipo-L. La composición es: 45% L, 30% P/Q, 25% N (Hernandez-Guijo y *col.*, 1998). Con el objetivo de estudiar el efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la  $I_{Ba}$  con un componente mayoritario L se realizaron experimentos siguiendo los mismos protocolos utilizados en los experimentos con CCB esta vez en células cromafines de ratón (CCR). La figura 25 muestra la gráfica comparativa del efecto sobre la  $I_{Ba}$  en CCB y CCR tras la aplicación de aerotionina u homoaerotionina (30  $\mu$ M). La inhibición de ambos compuestos fue mayor en las CCR, sugiriendo un efecto sobre los CCDV tipo-L.

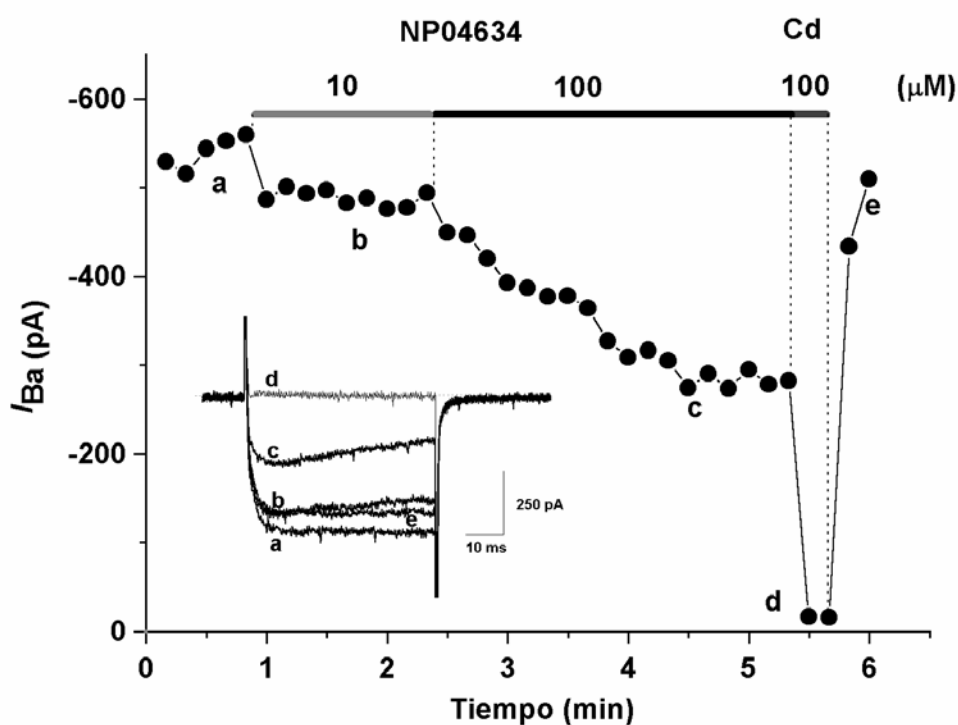


**Figura 25. Efecto de aerotionina y homoaerotionina sobre la  $I_{Ba}$  en células cromafines de ratón.** La inhibición de la respuesta (%) fue estudiada en experimentos individuales para cada uno de los compuestos y tipo de célula. Los compuestos fueron aplicados de forma aislada y durante el mismo tiempo tras estabilizar la  $I_{Ba}$  máxima control (100%), que fue inducida mediante pulsos despolarizantes cuadrados siguiendo el protocolo ya descrito (ver Fig. 18). La gráfica comparativa muestra que tanto aerotionina como homoaerotionina indujeron una mayor inhibición en las CCR que posee un componente mayoritario de CCDV tipo-L. El número de experimentos se indica entre paréntesis.

#### 4.6 Efecto del derivado de síntesis NP04634 sobre la magnitud de las $I_{Ba}$ en CCB

El compuesto NP04634 es un derivado de síntesis de la 11,19-dideoxifistularina (ver sección de métodos). Continuando con el diseño experimental utilizado para el estudio del efecto de los compuestos sobre los CCDV, los primeros experimentos con el NP04634 tuvieron como objetivo estudiar el bloqueo de la  $I_{Ba}$  en las CCB a distintas concentraciones.

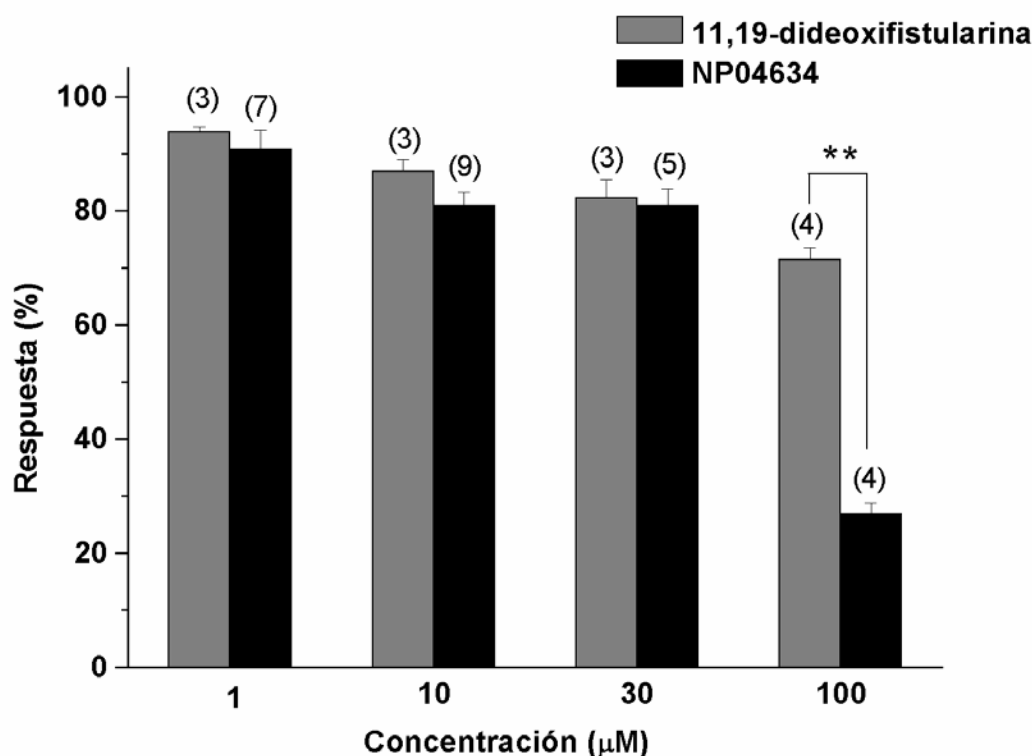
El compuesto NP04634, inhibió la  $I_{Ba}$  máxima en un  $19,1 \pm 2,3\%$  al aplicarlo a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . La aplicación secuencial de concentraciones crecientes de este compuesto ( $10$  y  $100 \mu\text{M}$ ) indujo un bloqueo acumulativo que evidenció la concentración-dependencia de su efecto.



**Figura 26. Efecto del NP04634 sobre la  $I_{Ba}$  en CCB.** Los experimentos se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. La figura muestra el curso temporal del bloqueo por NP04634 a  $10$  y  $100 \mu\text{M}$  y trazos originales representativos (inserto) del registro de  $I_{Ba}$  obtenidos en los puntos indicados. Las corrientes fueron obtenidas en células independientes tras la aplicación de pulsos despolarizantes a  $0 \text{ mV}$  durante  $50 \text{ ms}$  cada  $10 \text{ s}$ , desde un potencial de fijación de  $-80 \text{ mV}$ . El NP04634 induce una inhibición concentración-dependiente de la  $I_{Ba}$ .

Como se observa en la figura 26, el bloqueo del NP04634 a 10  $\mu\text{M}$  inhibió la corriente estabilizándose de forma rápida en menos de 1 min tras la aplicación del compuesto. Sin embargo, a 100  $\mu\text{M}$  el bloqueo fue progresivo y se estabilizó después de 3 min.

La aplicación de concentraciones únicas de 0,3, 1, 3, 30 y 100  $\mu\text{M}$  en experimentos de inhibición del pico de la  $I_{\text{Ba}}$  indujeron un bloqueo de  $0,1 \pm 0,8$ ;  $9,2 \pm 3,4$ ;  $6,5 \pm 1,3$ ;  $19,1 \pm 2,9$  y  $73,1 \pm 1,9\%$ , respectivamente. La figura 27 muestra que la inhibición del NP04634 sólo a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  fue significativamente mayor que la de la 11,19-dideoxifistularina de la cual deriva.

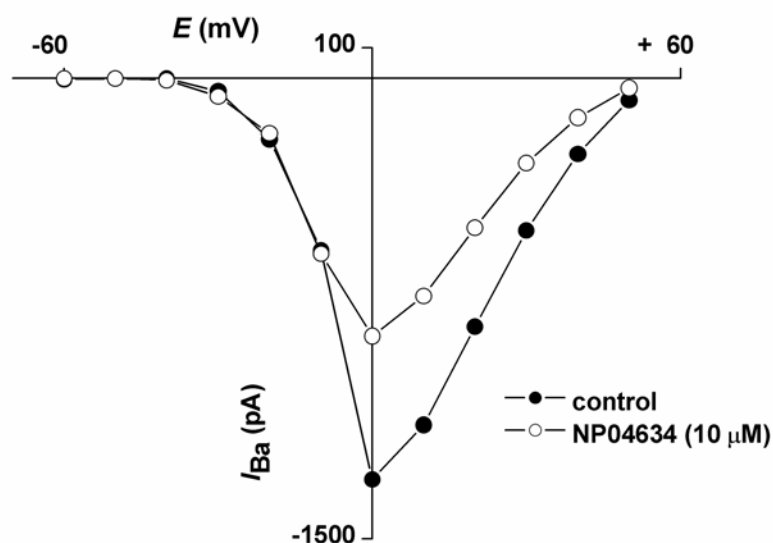


**Figura 27. Inhibición concentración-dependiente del pico de la  $I_{\text{Ba}}$  inducida por la 11,19 dideoxifistularina y por su derivado de síntesis NP04634.** La  $I_{\text{Ba}}$  fue inducida en célula entera, modo fijación de voltaje, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes e igual protocolo al explicado en la Fig. 18. La aplicación de los compuestos fue realizada a concentraciones únicas y en células individuales. Los datos están expresados como porcentaje de respuesta  $\pm$  error estándar. Entre paréntesis se indica el n° de células que fueron ensayadas en cada caso. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.7 Efecto del NP04634 sobre la relación $I-V$

Para descartar que el bloqueo del NP04634 fuese debido a una modificación del perfil de la relación  $I-V$  se realizaron experimentos en CCB aisladas similares a los detallados en el punto 4.3 de resultados, esta vez aplicando NP04634 a  $10 \mu\text{M}$ . Para ello se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes de intensidad creciente desde  $-60 \text{ mV}$  hasta  $+50 \text{ mV}$  en incrementos de  $10 \text{ mV}$  desde un potencial de fijación de  $-80 \text{ mV}$ , con una duración de  $50 \text{ ms}$  cada pulso, a intervalos de  $10 \text{ s}$ . Este protocolo se aplicó en ausencia (control) y en presencia del compuesto estudiado. El valor del pico de corriente obtenida se representó respecto de cada uno de los 12 pulsos correspondientes ( $-60$  a  $+50 \text{ mV}$ ), obteniéndose así la relación  $I-V$ .

En la figura 28 se observa que el NP04634 produce una inhibición de la  $I_{\text{Ba}}$  sin alterar el perfil de la relación  $I-V$  control, destacando que este bloqueo se produjo principalmente a potenciales más positivos, mayores a  $-10 \text{ mV}$ .



**Figura 28. Efecto del NP04634 sobre la relación  $I-V$  en células cromafines bovinas.** La corriente fue inducida aplicando un protocolo de pulsos despolarizantes sucesivos a intensidad creciente desde  $-60$  a  $+50 \text{ mV}$  en incrementos de  $10 \text{ mV}$  desde un potencial de fijación de  $-80 \text{ mV}$ . La gráfica representativa de dos experimentos fue construida a partir de los valores de corriente máxima obtenida a los respectivos potenciales. El protocolo fue aplicado a las células antes (control) y en presencia de NP04634 observándose que no se producen cambios en el perfil de la curva  $I-V$  constatando que el bloqueo es debido a la inhibición de la  $I_{\text{Ba}}$  máxima. Nótese el bloqueo de la  $I_{\text{Ba}}$  se produce a potenciales sobre los  $-10 \text{ mV}$ . En ambos experimentos la  $I_{\text{Ba}}$  se produjo a  $0 \text{ mV}$ , tanto para el control como durante la aplicación del compuesto.

#### 4.8 Efecto de NP04634 sobre los CCDV no-L

Para el estudiar el efecto del compuesto NP04634 sobre los CCDV no-L en las CCB se utilizó nuevamente nifedipino (10  $\mu$ M) como herramienta para bloquear completamente los CCDV de tipo-L. En este caso se trabajó con dos tipos de protocolos; el primero consistió en la aplicación inicial de nifedipino para bloquear el componente L de la corriente total y posteriormente la aplicación del compuesto en estudio (10  $\mu$ M) en presencia de nifedipino, evaluando el efecto sobre la corriente máxima y el segundo consistió, a la inversa, en la aplicación de nifedipino tras la aplicación inicial del NP04634 (10  $\mu$ M). Cada protocolo fue aplicado a células individuales en las cuales se indujo las  $I_{Ba}$  mediante, primero, el protocolo de tren de pulsos para conocer el potencial al cual se produce la  $I_{Ba}$  de máxima amplitud y posteriormente aplicando el protocolo de pulsos despolarizantes cuadrados desde -80 mV hasta el potencial antes definido. La frecuencia y duración de los pulsos fue la habitual y ya descrita en los experimentos anteriores con nifedipino.

##### 4.8.1 Efecto de nifedipino sobre la $I_{Ba}$ tras la aplicación de NP04634

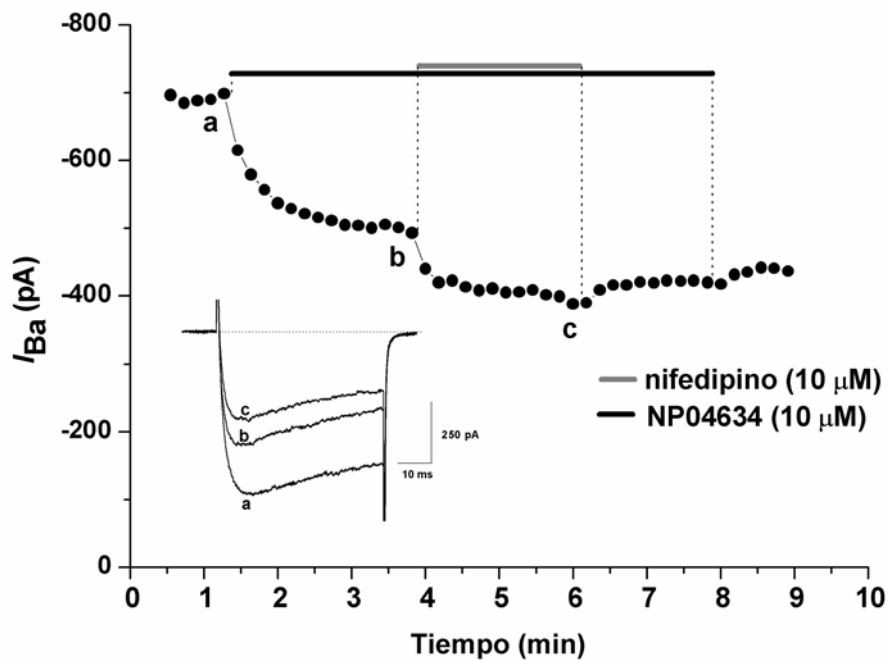
Se evaluó el efecto del NP04634 sobre los CCDV no-L en experimentos con nifedipino (10  $\mu$ M) mediante la aplicación del compuesto en estudio para posteriormente y tras alcanzar la estabilización del bloqueo del pico de la  $I_{Ba}$  aplicar el nifedipino. En la figura 29A se muestra un experimento representativo de 5 experimentos en el que se observa que tras el bloqueo del NP04634 ( $28,7 \pm 1,1\%$ ) el nifedipino induce un bloqueo aditivo ( $44,2 \pm 1,8\%$ ), es decir, un bloqueo adicional de  $15,4 \pm 0,7$  similar al bloqueo producido de forma aislada por ( $14,7 \pm 1,7\%$ ; figura 28B).

##### 4.8.2 Efecto de NP04634 sobre la $I_{Ba}$ remanente tras la aplicación de nifedipino

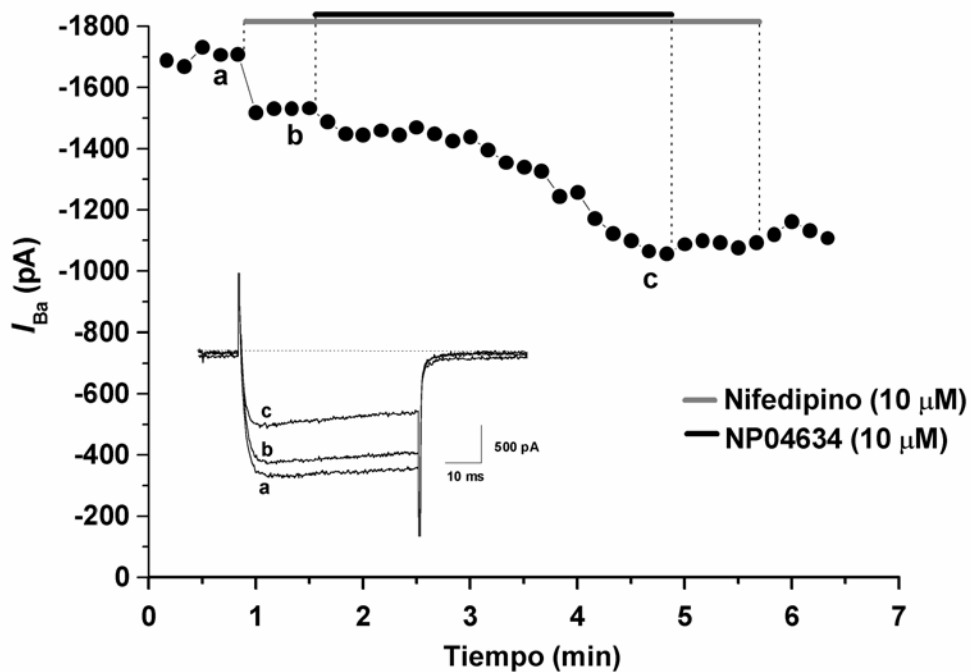
La aplicación de NP04634 (10  $\mu$ M) en presencia de nifedipino produjo también un bloqueo aditivo. En la figura 29B; representativa de 9 experimentos; se observa que el NP04634 inhibió la corriente residual en presencia de nifedipino en un  $15,4 \pm 2,1\%$ , atribuible al bloqueo del componente no-L de la  $I_{Ba}$ . Ambos experimentos sugieren para el NP04634 una selectividad por los CCVD no-L.



A



B



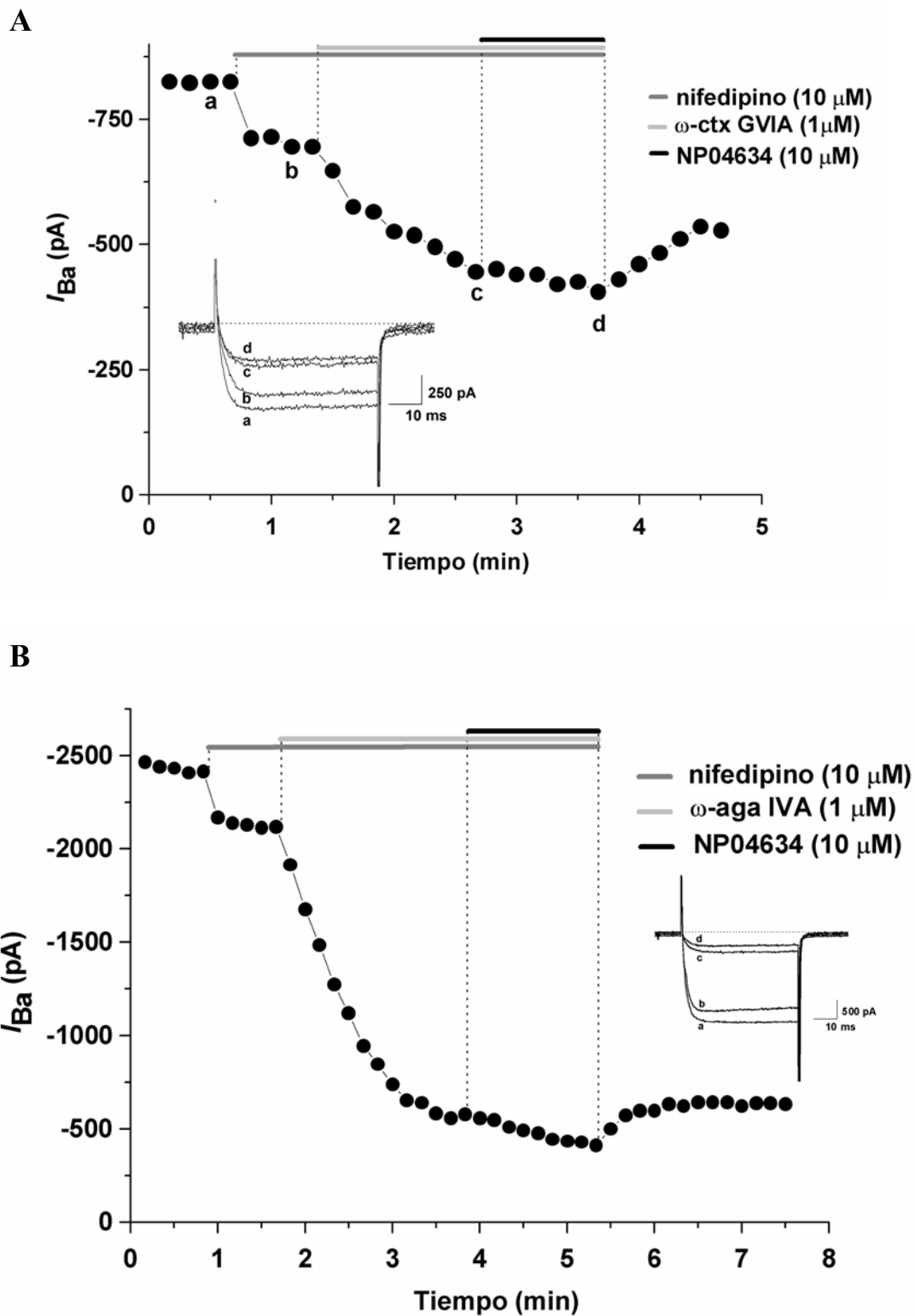
**Figura 29.** Efecto del NP04634 sobre los CCDV no-L en CCB. Cursos temporales y trazos originales (inserto) de dos experimentos representativos. Se observa el bloqueo producido por la aplicación de nifedipino ( $10 \mu\text{M}$ ) en presencia de NP04634 ( $10 \mu\text{M}$ ) (A) y de NP04634 en presencia de nifedipino (B). En ambos experimentos se observa el bloqueo aditivo de los dos compuestos.

#### 4.9 Disección farmacológica de los CCDV tipo-P/Q y tipo-N en las CCB

Para estudiar con más detalle el posible bloqueo selectivo del NP04634 (10  $\mu$ M) sobre los CCDV no-L se utilizaron las toxinas  $\omega$ -conotoxina GVIA y  $\omega$ -agatoxina IVA, que bloquean selectivamente para los CCDV tipo-N y tipo-P/Q, respectivamente. La aplicación de NP04634 tras la aplicación secuencial de nifedipino (10  $\mu$ M) y  $\omega$ -conotoxina GVIA (1  $\mu$ M) permitió evaluar el efecto de NP04634 sobre el componente P/Q de la corriente, mientras que la aplicación de NP04634 (10  $\mu$ M) tras la aplicación de nifedipino y  $\omega$ -agatoxina IVA (1 $\mu$ M) permitió evaluar el efecto sobre el componente N. Recordemos que en las CCB se ha descrito una proporción de CCDV tipo P/Q de un 50% y un 30% de CCDV de tipo-N (García y *col.*, 2006).

##### 4.9.1 Efecto de NP04634 sobre el pico de la $I_{Ba}$ tras la aplicación de nifedipino y $\omega$ -conotoxina GVIA

En la figura 30A; representativa de 8 experimentos; se observa el bloqueo secuencial de los distintos componentes de la  $I_{Ba}$ . El bloqueo estable del componente L de la corriente inducido por nifedipino (14,4 $\pm$ 1,5 %) se alcanzó en el primer minuto de aplicación, posteriormente el bloqueo por la  $\omega$ -conotoxina GVIA sobre el componente N fue progresivo estabilizándose aproximadamente tras 1,5 min de aplicación, comportamiento característico de esta toxina sobre las  $I_{Ba}$  en CCB (Ruiz-Nuno y *col.*, 2003). En el experimento mostrado, el bloqueo aditivo de nifedipino y de la  $\omega$ -conotoxina GVIA alcanzó un 60%. La aplicación del NP04634 tras la aplicación de nifedipino más la toxina indujo un claro bloqueo adicional en todas las células probadas mostrando un comportamiento muy reproducible como lo indica el valor medio del efecto (8,8 $\pm$ 0,72%). Este bloqueo adicional sería correspondiente al bloqueo parcial del componente P/Q inducido por el compuesto.

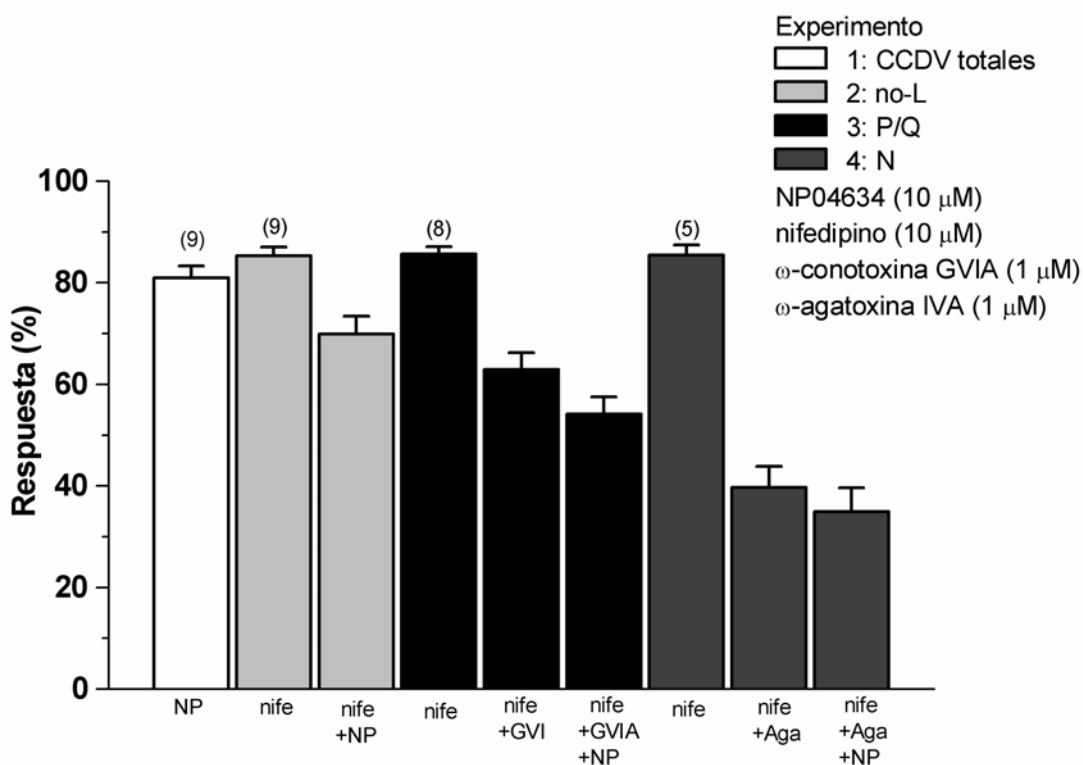


**Figura 30.** Efecto del NP04634 sobre los CCDV tipo P/Q y tipo-N. Cursos temporales y trazos originales de dos experimentos representativos. Se observa el bloqueo secuencial acumulativo producido por nifedipino (10  $\mu$ M) y  $\omega$ -ctx GVIA (1  $\mu$ M) (A) y por nifedipino y  $\omega$ -aga IVA (1  $\mu$ M) (B). En ambos casos se observa el bloqueo adicional por NP04634.

#### 4.9.2 Efecto de NP04634 sobre la $I_{Ba}$ tras la aplicación de nifedipino y $\omega$ -agatoxina IVA

La figura 30, B muestra el curso temporal y el registro de los trazos originales de  $I_{Ba}$  al aplicar nifedipino ( $10 \mu\text{M}$ ) y  $\omega$ -agatoxina IVA ( $1 \mu\text{M}$ ) sobre una célula, representativa de 5 experimentos. Tras aislar el componente N de la corriente el NP04634 inhibió la corriente remanente en un  $4,8 \pm 0,74\%$ , correspondiente al bloqueo parcial de los CCDV tipo-N.

La figura 31 muestra la gráfica comparativa de los resultados obtenidos tras la disección del componente P/Q y del componente N de la corriente y del efecto inhibitorio inducido tras la aplicación del compuesto NP04634.



**Figura 31.** La gráfica resume los resultados obtenidos al aplicar NP04634 ( $10 \mu\text{M}$ ) tras aislar los distintos subtipos de CCDV utilizando herramientas farmacológicas para bloquear selectivamente los CCDV no-L de tipo-P/Q y tipo-N. El bloqueo por NP04634 correspondería al bloqueo de CCDV no-L, mayoritariamente del componente P/Q.

## **5. DISCUSIÓN**

El presente trabajo constituye la primera evidencia directa del efecto de bloqueo de los CCDV por los compuestos aerotionina, homoaerotionina y 11,19-dideoxifistularina provenientes de la esponja marina *Aplysina cavernicola*; del compuesto aislado de la esponja marina *Leucetta primigenia*, leucetamol B y del derivado de síntesis NP04634. Nuestros datos indican un efecto mayoritario de los homólogos aerotionina y homoaerotionina sobre los CCDV tipo no-L y, en cambio, de un efecto compartido L y no-L por la 11,19 dideoxifistularina y el leucetamol B. La selectividad del NP04634, derivado de esta última, por los CCDV no-L (mayoritariamente P/Q) dan cuenta de un importante giro en la selectividad del compuesto original.

El primer punto a discutir tiene relación con el ión utilizado en nuestros experimentos donde el  $\text{Ca}^{2+}$  fue reemplazado por  $\text{Ba}^{2+}$  como ión transportador de carga. Las razones de esta sustitución fueron el poder contar con corrientes estables y de una magnitud que nos permitiera una ventana amplia para evidenciar el efecto de los compuestos en estudio. Sin embargo, ha sido descrito que el  $\text{Ba}^{2+}$  a altas concentraciones ( $>2$  mM) puede alterar la unión del ligando al canal (Albillos y col., 1996). Es probable que el efecto de los compuestos estudiados sea mayor en condiciones en las que se utilice  $\text{Ca}^{2+}$  como ión permeante. La técnica de *patch-clamp* en parche perforado; consistente en el establecimiento de la configuración de célula entera mediante la formación de pequeños poros en la membrana plasmática al utilizar un ionóforo al interior de la pipeta y cuya ventaja es evitar la pérdida de los componentes intracelulares; nos hubiese permitido trabajar con  $\text{Ca}^{2+}$  y evitar el *run-down* de la corriente, sin embargo la magnitud de estas hubiese sido significativamente menor. Además, en esta configuración no es posible controlar la composición interna de la célula y, más importante aún, es una técnica que requiere más tiempo para cada experimento, incompatible con el estudio en *patch-clamp* de la selectividad de un alto número de compuestos (25 en nuestro caso).

Otro elemento interesante de comentar es la reciente evidencia del efecto de la temperatura en el comportamiento de los CCDV, se ha visto que el registro a 37°C de corrientes de CCDV tipo-T presentan una cinética más rápida de activación, inactivación y recuperación de la inactivación, respecto de las corrientes registradas a 21°C, existiendo diferencias entre las distintas isoformas del canal y entre las especies estudiadas,

(humanos, ratas) (Iftinca y *col.*, 2006). Sin embargo no existen antecedentes a este respecto para los tipos de CCDV estudiados en este trabajo. Nuestros registros fueron realizados a T° ambiente.

La evaluación farmacológica y clínica de los compuestos naturales está generalmente supeditada al problema de la obtención de suficiente cantidad del compuesto puro para este propósito. En muchos casos los metabolitos aparecen en concentraciones mínimas en los macroorganismos y existe mucha variabilidad en la población. Los compuestos naturales estudiados en este trabajo, sólo pudieron ser probados a algunas concentraciones por disponer de una cantidad pequeña y limitada de producto. Por esta misma razón, no se pudo profundizar en los experimentos de selectividad de los compuestos naturales. Esta fue la razón de que el efecto del leucetamol B sobre la magnitud de las  $I_{Ba}$  fuese ensayado solamente a una concentración, que la 11,19-dideoxifistularina no fuese probada a todas las concentraciones a las que fueron probados los otros dos derivados de bromotirosina y, en general a un número de experimentos que no permiten realizar un buen análisis estadístico, primando muchas veces un criterio cualitativo.

Teniendo estos elementos en consideración, compararemos el efecto de ambos grupos de compuestos. Así, hemos observado que los derivados de bromotirosina (10  $\mu$ M) inducen un efecto rápido y estable de bloqueo de la  $I_{Ba}$ , a diferencia del leucetamol B que produce un bloqueo progresivo que demora un par de minutos en estabilizarse (Fig. 20). Este efecto progresivo del leucetamol B puede ser atribuido a sus potenciales características lipofílicas al tratarse de una molécula lipídica que, como se ha descrito para otros compuestos bloqueadores de CCDV altamente lipofílicos como la dotarizina, penetran en la bicapa lipídica y se acumulan en la membrana en pocos segundos (Ruiz-Nuno y *col.*, 2003). Este hecho también explicaría la casi nula reversión del efecto de bloqueo que se observa tras el lavado del compuesto (Fig. 20). Esta falta de reversibilidad no se observó con los derivados de bromotirosina a la concentración de 10  $\mu$ M, sin embargo si se observó una reversión parcial tras la aplicación de concentraciones más altas y durante un mayor tiempo (Fig. 18A), al igual que con el NP04634 (Fig. 26) y que será discutido más adelante.

Hubiese sido conveniente contar con algún parámetro de hidrofobicidad como por ejemplo ClogP, para tener una idea de la adhesión de los compuestos a la membrana.

Continuando con la comparación entre los dos tipos de compuestos estudiados, de acuerdo a nuestros resultados, el bloqueo del pico de la  $I_{Ba}$  por el leucetamol B (10  $\mu$ M; 24,4%) fue mayor que el bloqueo por los derivados de bromotirosina (14,3%) a la misma concentración. El leucetamol B es un lípido con extremos 2-amino-3-hidroxilo (Kong y Faulkner, 1993) y bajo nuestras condiciones experimentales demuestra ser más efectivo que los derivados de bromotirosina en su efecto bloqueador de las corrientes globales de  $Ba^{2+}$  en las CCB. Entre los compuestos orgánicos que bloquean los CCDV encontramos un grupo de compuestos alifáticos, entre ellos el farnesol, una molécula con largas cadenas alquiladas, que sirve de ligando endógeno para los canales  $Ca_v2.2$  (tipo-N). Estos compuestos bloquean los canales con alta afinidad/selectividad mediante el bloqueo de canal abierto y promoviendo la inactivación voltaje-dependiente del canal. Se sabe que las cadenas alifáticas con grupos amino terminales, aumentan el bloqueo. (Schroeder y *col.*, 2006). El bloqueo del farnesol, se produce al parecer, por dos mecanismos. A bajas concentraciones el farnesol desplaza la curva de inactivación en el estado estacionario hacia potenciales más hiperpolarizados, indicativo de un fuerte bloqueo por inactivación del canal. A concentraciones micromolares mediaría un rápido bloqueo de canal abierto que aparece como una aceleración aparente del curso temporal macroscópico de inactivación y es no selectivo entre CCDV de alto umbral de activación. Este último efecto muestra una gran dependencia de la larga cadena de carbono (con la mayor afinidad en los C12 y C13) y aumenta drásticamente con la presencia de un grupo amino al final de la cadena (Beedle y Zamponi, 2000). Doering y Zamponi (2003) proponen que los grupos cargados del nitrógenos servirían para anclar el fármaco al canal mientras que el extremo de la cola de carbono flexible sería la que mediaría finalmente la acción de bloqueo. En base a estos antecedentes sería interesante realizar un estudio sobre los mecanismos de bloqueo del leucetamol B.

En relación a los derivados de bromotirosina, estos compuestos fueron probados a varias concentraciones en su efecto bloqueante sobre el pico de las  $I_{Ba}$ . A pesar de que



este efecto es rápido y dependiente de la concentración aplicada, se produce en un estrecho margen de no más de un 35% de bloqueo a concentraciones tan altas como 300  $\mu\text{M}$  (homoaerotionina), es decir, se trata de un efecto discreto de bloqueo. Además, y como hemos señalado anteriormente, el bloqueo por los tres compuestos fue muy similar; sin embargo, y como se observa en la figura 21, los compuestos homólogos estructurales aerotionina y homoaerotionina (Fig. 8) presentan un mayor bloqueo unido a un comportamiento más errático, en comparación con la 11,19-dideoxifistularina que se comporta de un modo más reproducible. Con esto queremos decir que, comparativamente, la estructura de la 11,19-dideoxifistularina presenta un comportamiento más estable en el bloqueo de CCDV. Estos tres compuestos son estructuralmente muy similares, con un motivo espirociclohexadienilisoazolino idéntico y cuyas diferencias radican en la naturaleza de los sustituyentes amino unidos al grupo carbonilo adyacente al anillo isoazolino (Fig. 8) (Thoms y *col.*, 2003).

Sin embargo, las concentraciones ensayadas nos muestran solamente una concentración-dependencia parcial, ya que las concentraciones más bajas no nos permitieron encontrar el efecto mínimo. Esto, unido al estrecho margen de efecto, impidió describir el perfil de comportamiento con un ajuste a una sigmoide (curva concentración-dependencia) y por tanto no fue posible calcular parámetros farmacológicos de comparación como el de concentración inhibitoria 50.

Los experimentos tendentes a estudiar la selectividad por los distintos CCDV de los compuestos se realizaron en base a una serie de supuestos que es necesario revisar. Los efectos farmacológicos de bloqueo de los canales  $\text{Ca}_v2$  (CCDV no-L) generalmente son inferidos de estudios con toxinas peptídicas selectivas, especialmente con  $\omega$ -agatoxina IVA para los estudios de  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q) y  $\omega$ -conotoxina GVIA y  $\omega$ -conotoxina MVIIA para  $\text{Ca}_v2.2$  (N). Sin embargo, estos péptidos son generalmente tratados como bloqueadores selectivos cuando no lo son (Cohen y Kraus, 2004). En relación a las herramientas farmacológicas utilizadas, debemos decir que se realizaron los experimentos en base a dos supuestos: 1) la completa selectividad del nifedipino y de las  $\omega$ -toxinas y 2) que el bloqueo inducido por estos compuestos fue completo. Sin embargo, existen evidencias que indican que el exceso de bario podría impedir la unión de las  $\omega$ -toxinas al receptor (Hernandez-

Guijo y col., 1998), modificando la proporción de CCDV observada (Albillos y col., 1996). En el caso del nifedipino, los primeros experimentos se realizaron con la concentración de 3  $\mu\text{M}$  y que en CCB había mostrado una inhibición de aproximadamente un 20% correspondiente a la proporción de CCDV tipo-L en este modelo. Sin embargo y como puede observarse en la figura 23, en que el experimento de la 11,19-dideoxifistularina se ha realizado con 3 $\mu\text{M}$  de nifedipino, no se alcanzó el bloqueo esperado teniendo que utilizar en los experimentos siguientes una concentración más alta, 10  $\mu\text{M}$ , lográndose un bloqueo cercano al 20% (Fig. 30).

Teniendo presentes las anteriores consideraciones, los experimentos en los que se aplicó leucetamol B; tras el bloqueo por nifedipino, mostraron un bloqueo adicional correspondiente a una tercera parte del bloqueo observado por la aplicación del compuesto de forma aislada (Fig. 23). De acuerdo a estos resultados, el bloqueo del leucetamol B de un 24% estaría repartido entre un 8% de bloqueo de los CCDV no-L y un 16 % de bloqueo de los CCDV tipo-L. Este compuesto formaría parte del grupo de los antagonistas de CCDV de amplio espectro, como la dotarizina y la flunarizina (Lara y col., 1997) con un efecto sobre, al menos, los tres tipos de CCDV aquí estudiados.

La aerotionina y la homoaerotionina, en cambio, mostraron un efecto adicional significativo, tras el efecto de nifedipino, igual al efecto producido durante la aplicación única del compuesto a igual concentración (10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 23). Estos resultados sugieren que la totalidad del efecto de bloqueo de ambos compuestos es debida al bloqueo de los CCDV no-L, implicados en la liberación de neurotransmisores por las neuronas. Sin embargo, es necesario realizar el experimento inverso, para evidenciar el efecto adicional de nifedipino tras la aplicación de cada uno de los compuestos homólogos y de esta forma apoyar los resultados obtenidos. De ser así, aerotionina y homoaerotionina serían los primeros compuestos orgánicos marinos descritos con selectividad por los CCDV no-L y quedaría por determinar si presentan una selectividad exclusiva por algún tipo de canal (N, P/Q). Además es necesario evaluar su efecto en experimentos en que se utilice  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) como ión permeante.

De hecho, los experimentos realizados en ratón, cuya proporción de CCDV tipo-L es mayor, mostraron un mayor efecto de aerotionina y de homoaerotionina, respecto del

efecto de bloqueo de las  $I_{Ba}$  observado en las CCB a igual concentración, sugiriendo un efecto de ambos compuestos por los CCDV tipo-L que es necesario tener en cuenta en futuros experimentos (Fig. 25).

Los experimentos con la 11,19-dideoxifistularina en presencia de nifedipino, se realizaron con concentraciones de la dihidropiridina de 3  $\mu\text{M}$ , ya que fueron los primeros experimentos de selectividad que se llevaron a cabo. Como se observa en la figura 23, el nifedipino a dicha concentración inhibió la  $I_{Ba}$  en un 7,2%, muy por debajo del 20% esperado. Es posible que este bajo porcentaje de bloqueo haya sido debido a la variabilidad entre células ya que el valor del 20% proviene de la media de un alto número de experimentos entre los que también se encuentran células con una proporción menor al 20% de CCDV tipo-L. De todas formas el dato relevante en estos experimentos es un resultado negativo, ya que la 11,19-dideoxifistularina indujo un bloqueo adicional de la  $I_{Ba}$  de un 5,9% tras la aplicación de nifedipino, frente al 13% de inhibición producida al ser aplicado de forma aislada. Nuestros resultados sugieren que la 11,19-dideoxifistularina induce un bloqueo tanto del componente L como del componente no-L, de igual magnitud (aproximadamente 6%). De este modo la 11,19-dideoxifistularina resulta ser, en nuestras manos, el compuesto que muestra una acción más débil y menos selectiva, sin embargo como comentamos anteriormente, fue el más estable en su efecto de los tres derivados de bromotirosina.

Resulta interesante considerar que; ya que en el extracto de la esponja marina *Aplysina cavernicola* se encontraban presentes los tres compuestos derivados de bromotirosina y que nuestros resultados han sugerido que los homólogos parecen inhibir mayoritariamente los CCDV no-L mientras que la 11,19-dideoxifistularina inhibe también los CCDV tipo-L; la acción de estos compuestos podría ser complementaria.

Tras realizar el estudio de los compuestos naturales, procedimos a la evaluación del derivado de síntesis de la 11,19-dideoxifistularina, NP04634, diseñado y sintetizado por Neuropharma para mejorar las propiedades sobre los CCDV no-L observadas en la 11,19-dideoxifistularina y cuya estructura puede verse en la tabla 7.

Se sabe que los residuos activos de la  $\omega$ -conotoxina GVIA en el bloqueo de los  $Ca_v2.2$  (tipo-N) corresponden a Lisina 2, Tirosina 13 y Arginina 17. Mediante el diseño racional de fármacos se ha intentado imitar estos grupos funcionales para desarrollar inhibidores orgánicos pequeños para estos canales. La aproximación dendroide en el diseño racional de fármacos es atractiva desde el punto de vista de los compuestos cabezas de serie como el mayor grado de flexibilidad que permitirá a los grupos funcionales de la cadena lateral encontrar la conformación favorecida (preferida) para la unión al receptor. Los compuestos que presentan cadenas laterales Arginina10, Leucina11 y Tirosina13 producen compuestos con afinidad mayor y una menor flexibilidad en la cadena (Schroeder y *col.*, 2006).

A las distintas concentraciones probadas, el compuesto NP04634 indujo una inhibición del pico de la  $I_{Ba}$  concentración-dependiente mayor que la inhibición inducida por el compuesto de origen. Esta diferencia fue altamente significativa a la mayor concentración probada (100  $\mu$ M). El bloqueo inducido por el NP04634, sin embargo mostró un mayor variabilidad que la 11,19-dideoxifistularina (datos no mostrados).

Como se observa en la figura 26, el efecto de bloqueo a 10  $\mu$ M es rápido y estable, mientras que a 100  $\mu$ M se produce un bloqueo progresivo que conlleva un cambio cinético de la  $I_{Ba}$  tardía (Fig. 26, trazos originales) consistente en el aceleramiento de la inactivación de la corriente. Este efecto, tendría relación con un tipo de mecanismo de bloqueo descrito para otros compuestos orgánicos que bloquean los CCDV (ver introducción) correspondiente a un bloqueo de canal abierto. El bloqueo progresivo a altas concentraciones debe tener relación con su acumulación en la membrana plasmática, sin embargo, como se observa en la figura, tras la aplicación de  $Cd^{2+}$  este efecto es revertido tras el lavado del fármaco.

En el estudio de la posible selectividad del NP04634 encontramos uno de los resultados más relevantes del estudio del compuesto de síntesis. Los experimentos con nifedipino, para estudiar la acción del NP04634 sobre los CCDV no-L, mostraron por una parte que, la aplicación del NP en presencia de la DHP indujo un bloqueo adicional similar al bloqueo inducido por el compuesto en aplicación única (Fig. 29A).

Al tratarse de un compuesto de síntesis, y poder disponer de una mayor cantidad del compuesto; se pudo realizar el experimento inverso; es decir, la aplicación de nifedipino tras la perfusión del NP. En este último experimento la DHP induce un claro bloqueo adicional del pico de la  $I_{Ba}$ , evidenciando que el NP04634 ejerció un bloqueo selectivo de los CCDV no-L, sin tocar, al menos bajo nuestras condiciones experimentales y a una concentración de 10  $\mu$ M, el componente L. Estos resultados muestran que las modificaciones estructurales realizadas a la 11,19-dideoxifistularina, proporcionaron un compuesto de síntesis con propiedades mejoradas en cuanto a su selectividad por los CCDV no-L.

Prosiguiendo con el estudio de selectividad, realizamos experimentos con toxinas selectivas para aislar farmacológicamente los CCDV tipo-N y tipo-P/Q. Los experimentos evidenciaron que el bloqueo inducido por este compuesto se produjo principalmente sobre el CCDV tipo-P/Q (Fig. 31). Si bien los datos electrofisiológicos muestran que este compuesto no afecta de forma aguda a los canales tipo-L, no se puede descartar un efecto inespecífico sobre CCDV de tipo-L cuando se aplica a concentraciones elevadas, ya que se trata de una molécula con características lipofílicas que tras largas aplicaciones podría acumularse en la membrana de la célula. De hecho, experimentos en órgano aislado (aorta de rata) mostraron que el NP04634 (10  $\mu$ M), tras 10 minutos de aplicación, produce una disminución de un 42% de la reactividad vascular máxima evocada por KCl (35 mM), atribuible a un efecto inespecífico-tóxico sobre el CCDV tipo-L (datos no mostrados). Los resultados sugieren que NP04634, a bajas concentraciones (<10  $\mu$ M), es un bloqueante selectivo de los CCDV no-L, con un efecto mayoritario sobre los CCDV tipo-P/Q.

Nuestro estudio se ha enfocado en el efecto directo de los compuestos sobre los CCDV y no ha considerado por ejemplo, la evidencia reciente que da cuenta de los mecanismos regulatorios que experimentan los CCDV, debido a los que, el registro de la inhibición rápida de la corriente que fluye a través de los CCDV, interpretada como un efecto de bloqueo, puede deberse a un mecanismo de tráfico por el cual el canal es removido de la membrana e internalizado mediante un proceso endocitótico.

Este tipo de regulación, entre otros, son actualmente investigados y podrían dar algunas pistas que faciliten la manipulación terapéutica de la actividad de los CCDV (Jarvis y Zamponi, 2007).

De acuerdo a nuestros antecedentes, los cuatro compuestos naturales presentados en esta tesis han mostrado tener propiedades antibióticas contra distintas cepas de bacterias y como ha demostrado la criba desarrollada por Neuropharma, propiedades neuroprotectoras. Existen antecedentes que indican que el clotrimazol, un agente antifúngico relacionado estructuralmente con las difenilalquilaminas flunarizina y cinnarizina, tiene un efecto antiproliferativo contra varios tipos celulares y ha mostrado efectos neuroprotectores en cultivos de neuronas (Triggle, 2004). La flunarizina y la cinnarizina, son dos bloqueadores de CCDV de “amplio espectro”.

Como ya hemos comentado, los compuestos bloqueantes de CCDV han sido tradicionalmente utilizados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, sin embargo estos medicamentos pueden ser también utilizados para el tratamiento de otras patologías como el dolor intratable o ciertas patologías neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA) (Verkhatsky y Toescu, 2003). De etiopatogenia aún desconocida, la EA presenta una manifiesta alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Mattson y col., 2000) y un déficit colinérgico (Winkler y col., 1998). Sin embargo, el uso de antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  en enfermos de Alzheimer no ha mostrado efectos significativos sobre los síntomas ni sobre el curso de la enfermedad (Yasar y col., 2005). En cambio, el desarrollo de fármacos con actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), supone hoy día una de las estrategias más útiles para el tratamiento de esta enfermedad, si bien su utilidad es limitada por producir efectos sólo a nivel sintomático.

Se ha postulado que la combinación de las propiedades moduladoras de CCDV y la actividad anticolinesterásica serían una estrategia muy útil en el tratamiento de las alteraciones neurodegenerativas, para lo cual se buscan nuevos compuestos naturales con estas potencialidades (Choudhary y col., 2005). Los compuestos naturales estudiados en esta tesis muestran propiedades inhibitorias de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa que fueron caracterizadas por Neuropharma.

A pesar de los numerosos compuestos que muestran propiedades bloqueadoras de los CCDV, la farmacología selectiva de estos canales iónicos continúa siendo aún muy limitada. Sin embargo, y a pesar de la gran diversidad estructural que presentan los compuestos aislados de esponjas marinas, así como de la bioactividad desplegada; mucha de la cual podría relacionarse con una acción sobre los CCDV; existen muy pocos estudios sobre la acción directa de los compuestos orgánicos aislados de espongiarios sobre las corrientes que fluyen a través de los CCDV. Previo a nuestros resultados sobre el bloqueo de CCDV por compuesto derivados de bromotirosina, fue descrito el efecto modulador de los CCDV del músculo esquelético por la bastadina (Peng y col., 2005) y de la crambescidina 816, un alcaloide policíclico de guanidina aislado de la esponja marina *Crambe crambe* con acción bloqueante sobre CCDV (Berlinck y col., 1993). Uno de los trabajos más desarrollados en este sentido, es el estudio de los alcaloides pirrol-imidazol provenientes de las esponjas del género *Agelas* sobre los CCDV (Bickmeyer y col., 2004; Bickmeyer, 2005; Bickmeyer y col., 2007).

Existen numerosos antecedentes que evidencian la importante participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la fisiología de las esponjas y por ende, contribuyen a fundamentar la potencial existencia de compuestos con propiedades moduladoras de este ión. Por ejemplo existen evidencias de la presencia de la enzima anhidrasa carbónica en las esponjas marinas (Jackson y col., 2007), se han realizado registros de espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jaffe, 2002); ha sido bién establecido el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el acoplamiento estímulo-respuesta para la agregación celular tras la disociación mecánica de las células de la esponja *Microciona prolifera*, donde los bloqueantes de CCDV (verapamil, Cd) inhiben la agregación (Dunham y col., 1983). Además, en una especie de coral (*phylum Cnidaria*), filogenéticamente muy cercano a los poríferos, se ha clonado el gen de la subunidad alfa1 del CCDV tipo-L, probablemente involucrado en la calcificación característica de este grupo de organismos acuáticos (Zoccola y col., 1999).

Por último, quisiéra destacar nuevamente los antecedentes ya mencionados que hablan de la función principalmente defensiva de los compuestos encontrados en los poríferos. Se ha sugerido que el posible efecto disuasivo de los compuestos con un efecto sobre los CCDV sea su acción sobre la señalización en células quimiorreceptoras de ciertos órganos de especies predadoras, además de su potencial acción como neurotoxinas (Bickmeyer y col., 2007). De ser este un mecanismo generalizado de defensa, existirían una

gran cantidad de compuestos orgánicos provenientes de esponjas marinas, aún no descubiertos, con efecto sobre los CCDV.



## **6. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los objetivos planteados y a la luz de los resultados obtenidos, podemos expresar las siguientes conclusiones:

Utilizando la técnica de *patch-clamp* hemos evidenciado el efecto directo de los compuestos naturales aerotionina, homoaerotionina, 11,19-dideoxifistularina y leucetamol B, y del derivado de síntesis NP04634, sobre los CCDV en la célula cromafín bovina.

- 1.- Los derivados de bromotirosina, aerotionina, homoaerotionina y 11,19-dideoxifistularina inducen un bloqueo de los CCDV menor que el producido por el compuesto lipídico leucetamol B. Los homólogos estructurales aerotionina y homoaerotionina inducen un bloqueo concentración-dependiente de la  $I_{Ba}$  a través de los CCDV discreto sin mostrar diferencias significativas entre ellos. La 11,19-dideoxifistularina es la que induce el menor bloqueo, este presenta también características de contracción-dependencia y es discreto.
- 2.- El mayor grado de selectividad lo mostraron aerotionina y homoaerotionina con un efecto claramente mayoritario sobre el componente no-L de la  $I_{Ba}$ . Tanto la 11,19-dideoxifistularina como el leucetamol B tienen un efecto compartido sobre ambos componentes de la  $I_{Ba}$  que en el caso del leucetamol B, parece ser mayoritariamente sobre el componente L.
- 3.- El compuesto de síntesis NP04634, a concentraciones menores a 10  $\mu$ M, mostró propiedades mejoradas tanto en el grado de bloqueo de la  $I_{Ba}$  como en las propiedades selectivas por los CCDV no-L, respecto del compuesto de origen, la 11,19-dideoxifistularina; produciendo un bloqueo principalmente del componente P/Q de la  $I_{Ba}$ .

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- ABDELGAWWAD, M.A.F. (2004). Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine sponges. Ph.D. thesis. In *Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät*. Düsseldorf: Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- ABERNETHY, D.R. & SCHWARTZ, J.B. (1999). Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med*, 341, 1447-57.
- ALBILLOS, A., GARCIA, A.G. & GANDIA, L. (1993). omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, 336, 259-62.
- ALBILLOS, A., GARCIA, A.G., OLIVERA, B. & GANDIA, L. (1996). Re-evaluation of the P/Q  $Ca^{2+}$  channel components of  $Ba^{2+}$  currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high  $Ba^{2+}$  concentrations. *Pflugers Arch*, 432, 1030-8.
- ALBILLOS, A., NEHER, E. & MOSER, T. (2000). R-Type  $Ca^{2+}$  channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci*, 20, 8323-30.
- ALEXANDER, S.P., MATHIE, A. & PETERS, J.A. (2007). Ion channels. *Br J Pharmacol*, 150 Suppl 1, S96-S121.
- ARIKATH, J. & CAMPBELL, K.P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol*, 13, 298-307.
- ARTALEJO, A.R. (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. In *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. ed Hans Scherübl, J.K.-J.H. pp. 259-299: CRC Press.
- ASHCROFT, F.M., PROKS, P., SMITH, P.A., AMMALA, C., BOKVIST, K. & RORSMAN, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem*, 55 Suppl, 54-65.
- ATCHISON, W.D. (2003). Effects of Toxic Environmental Contaminants on Voltage-Gated Calcium Channel Function: From Past to Present. *J Bioenerg Biomembr*, 35, 507-532.
- BAKUS, G.J., TARGETT, N.M. & SCHULTE, B. (1986). Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Ecol.*, 12, 951-87.
- BANDARANAYAKE, W.M. (2006). The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Nat Prod Rep*, 23, 223-55.
- BEAM, K.G., TANABE, T. & NUMA, S. (1989). Structure, function, and regulation of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 560, 127-37.

- BECERRO, M.A., THACKER, R.W., TURON, X., URIZ, M.J. & PAUL, V.J. (2003). Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia*, 135, 91-101.
- BEEDLE, A.M. & ZAMPONI, G.W. (2000). Block of voltage-dependent calcium channels by aliphatic monoamines. *Biophys J*, 79, 260-70.
- BERGMANN, W. & FEENEY, J.R. (1951). Contributions to the study of marine products. 32. The nucleosides of sponges. *J Org Chem*, 16, 981-987.
- BERLINCK, R.G., BRAEKMAN, J., DALOZE, D., BRUNO, I., RICCIO, R., FERRI, S., SPAMPINATO, S. & SPERONI, E. (1993). Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca<sup>++</sup> channel blocker activity of crambescidin 816. *J Nat Prod*, 56, 1007-15.
- BICKMEYER, U. (2005). Bromoageliferin and dibromoageliferin, secondary metabolites from the marine sponge *Agelas conifera*, inhibit voltage-operated, but not store-operated calcium entry in PC12 cells. *Toxicon*, 45, 627-32.
- BICKMEYER, U., DRECHSLER, C., KOCK, M. & ASSMANN, M. (2004). Brominated pyrrole alkaloids from marine *Agelas* sponges reduce depolarization-induced cellular calcium elevation. *Toxicon*, 44, 45-51.
- BICKMEYER, U., GRUBE, A., KLINGS, K.W. & KOCK, M. (2007). Disturbance of voltage-induced cellular calcium entry by marine dimeric and tetrameric pyrrole-imidazole alkaloids. *Toxicon*, 50, 490-7.
- BOROJEVIC, R. & KLAUTAU, M. (2000). Calcareous sponges from New Caledonia. *Zoosystema*, 22, 187-201.
- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. & FELTZ, A. (1991a). Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 437, 603-20.
- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. & FELTZ, A. (1991b). Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 437, 621-34.
- BRANDT, B.L., HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. & MIYAZAKI, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol*, 263, 417-39.
- BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. (2005). *Invertebrados*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- BURGOYNE, R.D. (1992). Investigation of the intracellular regulators factors and components of the exocytotic pathway. In *Neuromethods, Vol. 20: Intracellular messengers*. ed A. Boulton, G.B., and C. Taylor. pp. 433-469: The Human Press Inc.

- CARAFOLI, E. (2004). The ambivalent nature of the calcium signal. *J Endocrinol Invest*, 27, 134-6.
- CATTERALL, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 521-55.
- CATTERALL, W.A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T.P. & STRIESSNIG, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 411-25.
- CHODHARY, M.I., NAWAZ, S.A., ZAHEER UL, H., AZIM, M.K., GHAYUR, M.N., LODHI, M.A., JALIL, S., KHALID, A., AHMED, A., RODE, B.M., ATTA UR, R., GILANI, A.U. & AHMAD, V.U. (2005). Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 1171-7.
- CIMINIELLO, P., FATTORUSSO, E., FORINO, M. & MAGNO, S. (1997). Chemistry of Verongida Sponges VIII - Bromocompounds from the Mediterranean Sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Tetrahedron*, 53, 6565-6572.
- COHEN, C. & KRAUS, R. (2004). The therapeutic utility of targeting  $\text{Ca}_v2$  channels. In *Calcium Channel Pharmacology*. ed McDonough, S.I. pp. 73-93. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- COSTANTINO, V., FATTORUSSO, E., MENNA, M. & TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (2004). Chemical diversity of bioactive marine natural products: an illustrative case study. *Curr Med Chem*, 11, 1671-92.
- DEMBITSKY, V.M., GLORIOZOVA, T.A. & POROIKOV, V.V. (2005). Novel antitumor agents: marine sponge alkaloids, their synthetic analogs and derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 5, 319-36.
- D'INCALCI, M., SIMONE, M., TAVECCHIO, M., DAMIA, G., GARBI, A. & ERBA, E. (2004). New drugs from the sea. *J Chemother*, 16 Suppl 4, 86-9.
- DOERING, C.J. & ZAMPONI, G.W. (2003). Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J. Bioenerg Biomembr*, 35, 491-505.
- DOERING, C.J. & ZAMPONI, G.W. (2005). Molecular pharmacology of non-L-type calcium channels. *Curr Pharm Des*, 11, 1887-98.
- DUNHAM, P., ANDERSON, C., RICH, A.M. & WEISSMANN, G. (1983). Stimulus-response coupling in sponge cell aggregation: Evidence for calcium as an intracellular messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4756-4760.
- DUNLAP, K., LUEBKE, J.I. & TURNER, T.J. (1995). Exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci*, 18, 89-98.

- ERPENBECK, D. & VAN SOEST, R.W. (2007). Status and perspective of sponge chemosystematics. *Mar Biotechnol (NY)*, 9, 2-19.
- ERTEL, E.A., CAMPBELL, K.P., HARPOLD, M.M., HOFMANN, F., MORI, Y., PEREZ-REYES, E., SCHWARTZ, A., SNUTCH, T.P., TANABE, T., BIRNBAUMER, L., TSIEN, R.W. & CATTERALL, W.A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533-5.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 245, C1-14.
- FATTORUSSO, E. (1970). *J Chem Soc Chem Commun*, 752.
- FAULKNER, D.J. (2002). Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 19, 1-48.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. & NEHER, E. (1982a). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol*, 331, 577-97.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. & NEHER, E. (1982b). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 331, 599-635.
- FINKBEINER, S. & GREENBERG, M.E. (1998). Ca<sup>2+</sup> channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol*, 37, 171-89.
- FLECKENSTEIN, A., FREY, M. & FLECKENSTEIN-GRUN, G. (1984). [Possibilities in the future application of calcium antagonists. Is the prevention of blood vessel calcinosis possible?]. *Fortschr Med*, 102, 713-7.
- FUJITA, T. (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn*, 40 Suppl, 1-12.
- GANDÍA, L., ALBILLOS, A. & GARCIA, A.G. (1993). Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 671-6.
- GANDÍA, L., MONTIEL, C., GARCÍA, A.G. & G. LÓPEZ, M. (2007). Calcium Channels for Exocytosis: Functional Modulation with Toxins. In *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. ed Botana, L.M. *in press*.
- GARATEIX, A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos*, 58, 39-47.
- GARCÍA, A.G., GARCIA-DE-DIEGO, A.M., GANDIA, L., BORGES, R. & GARCIA-SANCHO, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, 86, 1093-131.
- GARCÍA-PALOMERO, E., CUCHILLO-IBÁÑEZ, I., GARCÍA, A., RENART, J., ALBILLOS, A. & MONTIEL, C. (2000). Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca<sup>2+</sup> channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett*, 481, 235-239.

- GARNTER, L. & HIATT, J. (2003). Sistema endocrino. In *Atlas color de histología*. pp. 258-262. Buenos Aires, Argentina: Editorial médica panamericana.
- HAEFNER, B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*, 8, 536-44.
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
- HARVEY, A.L. (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacol Sci*, 20, 196-8.
- HASSAN, W. (2004). Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Sponges. Ph.D.Thesis. In *Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät*. pp. 227. Düsseldorf: Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- HENTSCHEL, U., SCHMID, M., WAGNER, M., FIESELER, L., GERNERT, C. & HACKER, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol*, 35, 305-312.
- HERNANDEZ-GUIJO, J.M., DE PASCUAL, R., GARCIA, A.G. & GANDIA, L. (1998). Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflugers Arch*, 436, 75-82.
- HILLE, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- HOFMANN, F., BIEL, M. & FLOCKERZI, V. (1994). Molecular Basis for  $CA^{2+}$  Channel Diversity. *Annu Rev Neurosci*, 17, 399-418.
- HOOPER, J.N.A., SOEST, V. & W.M., R. (2002). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. pp. 1-1101, 1103-1706 (2 vol.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- IFTINCA, M., MCKAY, B.E., SNUTCH, T.P., MCRORY, J.E., TURNER, R.W. & ZAMPONI, G.W. (2006). Temperature dependence of T-type calcium channel gating. *Neuroscience*, 142, 1031-42.
- IMHOFF, J.F. & STOHR, R. (2003). Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. *Prog Mol Subcell Biol*, 37, 35-57.
- JACKSON, D.J., MACIS, L., REITNER, J., DEGNAN, B.M. & WORHEIDE, G. (2007). Sponge paleogenomics reveals an ancient role for carbonic anhydrase in skeletogenesis. *Science*, 316, 1893-5.



- JAFFE, L. (2002). On the conservation of fast calcium wave speeds. *Cell Calcium*, 32, 217-29.
- JARVIS, S.E. & ZAMPONI, G.W. (2007). Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 474-82.
- JONES, O.T. (2002). Ca<sup>2+</sup> channels and epilepsy. *Eur J Pharmacol*, 447, 211-25.
- KATZ, B. & MILEDI, R. (1967). The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol*, 189, 535-44.
- KERNAN, M., CAMBIE, R. & BERGQUIST, P. (1990). Chemistry of sponges. 7. 11,19-Dideoxyfistularin-3 and 11-hydroxyaerotherionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*. *J Nat Products*, 53, 615-622.
- KIDOKORO, Y. & RITCHIE, A.K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol*, 307, 199-216.
- KILPATRICK, D.L., LEDBETTER, F.H., CARSON, K.A., KIRSHNER, A.G., SLEPETIS, R. & KIRSHNER, N. (1980). Stability of bovine adrenal medulla cells in culture. *J Neurochem*, 35, 679-92.
- KOBAYASHI, S. (1977). Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch Histol Jpn*, 40 Suppl, 61-79.
- KOCHEGAROV, A.A. (2003). Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium*, 33, 145-62.
- KONG, F. & FAULKNER, D.J. (1993). Leucettamols A and B, two antimicrobial lipids from calcareous sponge *Leucetta microraphis*. *J Org Chem*, 58, 970-971.
- KÜHNEL, W. (2005). *Atlas color de citología e histología*. Madrid: Editorial médica panamericana.
- LACINOVÁ, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*, 24, 1-78.
- LARA, B., GANDIA, L., TORRES, A., OLIVARES, R., MARTINEZ-SIERRA, R., GARCIA, A.G. & LOPEZ, M.G. (1997). 'Wide-spectrum Ca<sup>2+</sup> channel antagonists': lipophilicity, inhibition, and recovery of secretion in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, 325, 109-19.
- LEWIS, R.J. & GARCIA, M.L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 790-802.
- LINDEL, T., HOFFMANN, H., HOCHGÜRTEL, M. & PAWLIK, J.R. (2000). Structure-activity relationship of inhibition of fish feeding by sponge-derived and synthetic pyrrole-imidazole alkaloids. *J. Chem. Ecol.*, 26, 1477-1496.

- LIVETT, B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, 64, 1103-61.
- LIVETT, B.G., GAYLER, K.R. & KHALIL, Z. (2004). Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr Med Chem*, 11, 1715-23.
- LIVETT, B.G., MITCHELHILL, K.I. & DEAN, D.M. (1987). Adrenal chromaffin cells-their isolation and culture (chapter 11). In *In vitro methods for studying secretion*. eds Trifaró & Poisner. pp. 171-175: Elsevier Science Publisher B.V. (Biomedical Division).
- MANCINI, I., GUELLA, G., LABOUTE, P., DEBITUSB, C. & PIETRA, F. (1993). Hemifistularin 3: a Degraded Peptide or Biogenetic Precursor? Isolation from a Sponge of the Order Verongida from the Coral Sea or Generation from Base Treatment of 11 - Oxofistularin 3. *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS.*, 1, 3121-25.
- MARTINEZ, A., MEDINA, M., GARCIA-PALOMERO, E., DE AUSTRIA, C. & ALONSO, D. (2005). Marine compounds with calcium channel blocking properties for the treatment of cognitive or neurodegenerative diseases PCT/EP2005/006643. In *World Intellectual Property Organization*. Madrid: NEUROPHARMA S.A.
- MATTSON, M.P., LAFERLA, F.M., CHAN, S.L., LEISSRING, M.A., SHEPEL, P.N. & GEIGER, J.D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 23, 222-9.
- MAYER, A.M. & GUSTAFSON, K.R. (2004). Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer*, 40, 2676-704.
- MAYER, A.M. & HAMANN, M.T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol (NY)*, 6, 37-52.
- MAYER, A.M., RODRIGUEZ, A.D., BERLINCK, R.G. & HAMANN, M.T. (2007). Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 145, 553-81.
- MCDONOUGH, S.I. (2004). *Calcium Channel Pharmacology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- MCDONOUGH, S.I. (2007). Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon*, 49, 202-12.
- MCGIVERN, J.G. (2006). Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today*, 11, 245-53.

- MCGIVERN, J.G. & MCDONOUGH, S.I. (2004). Voltage-gated calcium channels as targets for the treatment of chronic pain. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 3, 457-78.
- MILEDI, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 183, 421-5.
- MINALE, L. (1976). Natural Product Chemistry of the Marine Sponges. *Pure Appl. Chem.*, 48, 7.
- MONTEITH, G.R., MCANDREW, D., FADDY, H.M. & ROBERTS-THOMSON, S.J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat Rev Cancer*, 7, 519-30.
- MOODY, K., THOMPSON, R.H., FATTORUSSO, E., MINALE, L. & SODANO, G. (1972). Aerothionin and homoaerothionin: two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* sponges. *J.C.Perkin 1*, 10, 18-24.
- MORO, M.A., LOPEZ, M.G., GANDIA, L., MICHELENA, P. & GARCIA, A.G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*, 185, 243-8.
- MULLER, W.E. (1998). Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwissenschaften*, 85, 11-25.
- MULLER, W.E., BRUMMER, F., BATEL, R., MULLER, I.M. & SCHRODER, H.C. (2003). Molecular biodiversity. Case study: Porifera (sponges). *Naturwissenschaften*, 90, 103-20.
- MULLER, W.E., SCHRODER, H.C., SKOROKHOD, A., BUNZ, C., MULLER, I.M. & GREBENJUK, V.A. (2001). Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene*, 276, 161-73.
- MULLER, W.E., SCHWERTNER, H. & MULLER, I.M. (2004). Porifera a reference phylum for evolution and bioprospecting: the power of marine genomics. *Keio J Med*, 53, 159-65.
- NELSON, M.T. (1986). Interactiosn of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *J Gen Physiol*, 87, 201-22.
- NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod*, 67, 1216-38.
- O'CONNOR, D.T., MAHATA, S.K., MAHATA, M., JIANG, Q., HOOK, V.Y. & TAUPENOT, L. (2007). Primary culture of bovine chromaffin cells. *Nat Protoc*, 2, 1248-53.
- OLIVERA, B.M. (1997). E.E. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell*, 8, 2101-9.

- OLIVERA, B.M., MILJANICH, G.P., RAMACHANDRAN, J. & ADAMS, M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem*, 63, 823-67.
- ORI, M. & IKEDA, H. (1998). Spider venoms and spider toxins. *J Toxicol*, 17, 405-426.
- PATTERSON, P.H. (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell*, 62, 1035-8.
- PAWLIK, J.R., CHANAS, B., TOONEN, R.J., FENICAL, W. & 183-194. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127, 183-194.
- PENG, J., LI, J. & HAMANN, M.T. (2005). The marine bromotyrosine derivatives. *Alkaloids Chem Biol*, 61, 59-262.
- PROKSCH, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32, 639-55.
- PROKSCH, P., EBEL, R., EDRADA, R.A., WRAY, V. & STEUBE, K. (2003). Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi. *Prog Mol Subcell Biol*, 37, 117-42.
- RAMOINO, P., GALLUS, L., PALUZZI, S., RAITERI, L., DIASPRO, A., FATO, M., BONANNO, G., TAGLIAFIERRO, G., FERRETTI, C. & MANCONI, R. (2007). The GABAergic-like system in the marine demosponge *Chondrilla nucula*. *Microsc Res Tech*.
- RAMOS-ESPLÁ, A.A., VALLE-PÉREZ, C, BAYLE-SEMPERE, J.T Y SÁNCHEZ-LIZASO, J.L. (2004). Areas Marinas Protegidas como herramientas de Gestión Pesquera en el Mediterráneo (Area COPEMED). *Serie Informes y Estudios COPEMED*, 11.
- RANDALL, J.E. & HARTMAN, W.D. (1968). Sponge-feeding fishes of the West Indies. *Mar. Biol.*, 1, 216-225.
- RUIZ-NUNO, A., MAYORGAS, I., HERNANDEZ-GUIJO, J.M., OLIVARES, R., GARCIA, A.G. & GANDIA, L. (2003). Antimigraine dotarizine blocks P/Q Ca<sup>2+</sup> channels and exocytosis in a voltage-dependent manner in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, 481, 41-50.
- SATHER, W.A. & MCCLESKEY, E.W. (2003). Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol*, 65, 133-59.
- SCHEUER, P.J. (1990). Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential. *Science*, 248, 173-7.
- SCHROEDER, C.I., DOERING, C.J., ZAMPONI, G.W. & LEWIS, R.J. (2006). N-type calcium channel blockers: novel therapeutics for the treatment of pain. *Med Chem*, 2, 535-43.

- SIPKEMA, D., FRANSSSEN, M.C., OSINGA, R., TRAMPER, J. & WIJFFELS, R.H. (2005). Marine sponges as pharmacy. *Mar Biotechnol (NY)*, 7, 142-62.
- STORCH, V. & WELSCH, U. (2001). *Curso práctico de zoología de Kükenenthal*. Barcelona: Ariel.
- STRIESSNIG, J., KOSCHAK, A., SINNEGGER-BRAUNS, M.J., HETZENAUER, A., NGUYEN, N.K., BUSQUET, P., PELSTER, G. & SINGEWALD, N. (2006). Role of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans*, 34, 903-9.
- TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. & NUMA, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328, 313-8.
- TAPIA, L. (2007). Potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por concentraciones umbral de nicotina en células cromafines bovinas. Tesis doctoral. In *Departamento de Farmacología y Terapéutica*. pp. 154. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- TAYLOR, M.W., RADAX, R., STEGER, D. & WAGNER, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 295-347.
- THAKUR, N.L., & MÜLLER, W.E.G. (2004). Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, 86, 1506-1512.
- THOMS, C., EBEL, R. & PROKSCH, P. (2006a). Activated chemical defense in aplysina sponges revisited. *J Chem Ecol*, 32, 97-123.
- THOMS, C., EBEL, R. & PROKSCH, P. (2006b). Sequestration and Possible Role of Dietary Alkaloids in the Sponge-Feeding Mollusk *Tyrodina perversa*. In *Progress in Molecular and Subcellular Biology Subseries Marine Molecular Biotechnology: Molluscs*. ed G.Cimino, M.G. pp. 261-275. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- THOMS, C., HORN, M., WAGNER, M., UNTSCHEL, U. & PROKSCH, P. (2003). Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Marine Biology*, 142, 685-692.
- THOMS, C., WOLFF, M., PADMAKUMAR, K., EBEL, R. & PROKSCH, P. (2004). Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z Naturforsch [C]*, 59, 113-22.
- TRIGGLE, D.J. (2007). Calcium channel antagonists: clinical uses-past, present and future. *Biochem Pharmacol*, 74, 1-9.
- TRIGGLE, D.J. (2003). Drug targets in the voltage-gated calcium channel family: why some are and some are not. *Assay Drug Dev Technol*, 1, 719-33.

- TRIGGLE, D.J. (2004). Pharmacology of Ca<sub>v</sub>1 (L-Type) Channels. In *Calcium Channel Pharmacology*. ed McDonough, S.I. pp. 21-72. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher.
- TRIGGLE, D.J. (1999). The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol*, 375, 311-25.
- TURON, X., BECERRO, M.A. & URIZ, M.J. (2000). Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res*, 301, 311-22.
- UCHITEL, O.D. (1997). Toxins affecting calcium channels in neurons. *Toxicon*, 35, 1161-91.
- URIZ, M.J., TURON, X., BECERRO, M.A. & AGELL, G. (2003). Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. *Microsc Res Tech*, 62, 279-99.
- USHER, K.M., FROMONT, J., SUTTON, D.C. & TOZE, S. (2004). The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from Australia and the Mediterranean. *Microb Ecol*, 48, 167-77.
- VACELET, J. (1975). Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microscopie Biol. Cell.*, 23, 271-288.
- VERKHRATSKY, A., KRISHTAL, O.A. & PETERSEN, O.H. (2006). From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch*, 453, 233-47.
- VERKHRATSKY, A. & TOESCU, E.C. (2003). Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med*, 7, 351-61.
- VOGEL, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2069-71.
- WILKINSON, C.R. (1984). Immunological evidence for Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proc R Soc Lond B*, 220, 509-517.
- WINKLER, J., THAL, L.J., GAGE, F.H. & FISHER, L.J. (1998). Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med*, 76, 555-67.
- YASAR, S., CORRADA, M., BROOKMEYER, R. & KAWAS, C. (2005). Calcium channel blockers and risk of AD: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiol Aging*, 26, 157-63.
- ZOCCOLA, D., TAMBUTTE, E., SENEGAS-BALAS, F., MICHIELS, J.F., FAILLA, J.P., JAUBERT, J. & ALLEMAND, D. (1999). Cloning of a calcium channel alpha1 subunit from the reef-building coral, *Stylophora pistillata*. *Gene*, 227, 157-67.