

Trabajo Fin de Master

Titulado:

**Caracterización electrofisiológica de trivanilatos como
nuevos bloqueadores de canales de potasio tipo
KCa3.1/KCa2.X**

Presentado por

Aida Oliván Viguera, Lcda. Bioquímica

Realizado en la Unidad de Investigacion Traslacional, del Hopsital Universitario
Miguel Servet, Zaragoza.

Bajo la supervisión de

Ralf Köhler, PhD, Profesor, Investigador senior ARAID,
Insituto Aragones de Ciencias de la Salud (IACS), Zaragoza.

Zaragoza 22.6.2012

Autorización del Director del Proyecto

El Dr. Ralf Köhler, como director del proyecto, autoriza a Aida Oliván Viguera a presentar el Trabajo Fin de Master de título
“Caracterización electrofisiológica de trivanilatos como nuevos bloqueadores de canales de potasio tipo KCa3.1/KCa2.X”.



Índice

| | <u>página</u> |
|--|---------------|
| 1. Resumen | 5 |
| 2. Introducción | 6 |
| 2.1. Canales de KCa3.1 | 6 |
| 2.1.1. Estructura del canal KCa3.1 | 7 |
| 2.1.2. Farmacología del canal KCa3.1 | 8 |
| 2.1.2.1. Bloqueadores | 8 |
| 2.1.2.2. Activadores | 10 |
| 2.2. Canales KCa2.3 | 11 |
| 2.3. Canales KCa1.1 | 13 |
| 2.3.1. Estructura del canal KCa1.1 | 13 |
| 2.3.2. Farmacología del canal | 14 |
| 2.3.2.1. Bloqueadores | 14 |
| 2.3.2.2. Activadores | 15 |
| 3. Hipótesis y objetivos del estudio | 16 |
| 3.1. Motivación e hipótesis | 16 |
| 3.2. Tareas específicas | 17 |
| 4. Materiales y Métodos | 18 |
| 4.1. Métodos | 18 |
| 4.1.1. Líneas celulares | 18 |
| 4.1.2. Bases de la técnica Patch-Clamp | 20 |
| 4.1.3. Ensayos electrofisiológicos patch-clamp | 23 |
| 4.1.4. Análisis y evaluación | 26 |
| 4.2. Materiales | 26 |

| | |
|--|----|
| 5. Resultados | 27 |
| 5.1. Identificación y caracterización de canales KCa3.1 en la línea humana de fibroblastos 3T3-L1, mediante ensayos con el método Patch-clamp. | 27 |
| 5.2. Prueba de la eficacia de los nuevos trivanilatos como inhibidores de canales KCa3.1 expresados en la línea de fibroblastos 3T3-L1 | 29 |
| 5.3. Elaboración de una relación Dosis Respuesta de FTVA. | 30 |
| 5.4. Prueba de la eficacia de los trivanilatos como moduladores negativos de la actividad del canal, determinando su interacción al nivel de la proteína con el modulador positivo SKA-31. | 31 |
| 5.5. Caracterización de la selectividad de FTVA sobre otros canales relacionados, KCa2.3 y KCa1.1 | 34 |
| 6. Discusión | 37 |
| 7. Conclusiones y perspectivas | 41 |
| 8. Referencias | 42 |
| Agradecimientos | 46 |

1. Resumen

Los canales de potasio regulados por calcio/calmodulina (KCaX) son importantes en diversas funciones fisiológicas/patofisiológicas. Su manipulación farmacológica puede abrir nuevas vías para tratar enfermedades inflamatorias, neurológicas y cardiovasculares. Los bloqueadores existentes son insuficientemente potentes o selectivos, o no explotables comercialmente.

En este proyecto se caracteriza el efecto bloqueador de los trivanilatos FTVA, MOTVA y CITVA en sistemas de expresión de KCa3.1 (3T3-L1) y sobreexpresión de KCa2.3 (COS7), empleando para ello la técnica electrofisiológica patch-clamp. De los tres trivanilatos, FTVA ha resultado ser un bloqueador de KCa3.1 con una EC₅₀ de 43 nM, mientras que los compuestos relacionados MOTVA y CITVA han mostrado poca potencia inhibidora. FTVA ha demostrado también su potencia bloqueadora en fibroblastos procedentes de pacientes. Este efecto bloqueador de FTVA puede antagonizarse con el activador SKA-31, de un modo dependiente de la concentración del bloqueador. FTVA se ha mostrado selectivo sólo para canales KCa3.1/KCa2.X, ya que los canales KCa1.1 (levemente relacionados con la familia genética KCa3.1/KCa2.X) han resultado insensibles a él. Respecto a los KCa2.3, en ellos FTVA tiene una potencia mayor que para KCa3.1, con una EC₅₀ de 85 pM, y nuevamente el efecto bloqueador se ha podido antagonizar con SKA-31.

En conclusión, se ha identificado un nuevo bloqueador de canales KCa3.1/KCa2.X, de estructura química nueva y con una potencia 500 veces mayor en canales KCa2.3 que en KCa3.1. El centro de unión parece ser cercano o igual al usado por el activador SKA-31, por lo que FTVA parece ser un modulador negativo del “gating”. Esto supone un mecanismo de bloqueo y un centro de unión distintos a los de los bloqueadores conocidos. Por todo ello, FTVA puede ser una nueva herramienta para estudiar la función de los canales KCa3.1/KCa2.X en sistemas modelo e *in vivo* y puede ser farmacoterapéuticamente interesante en patologías con estos canales implicados.

2. Introducción

2.1. Canales KCa 3.1

KCa3.1 (Ishii et al. 1997; Wei et al. 2005) es un canal iónico regulado por Calcio y su activación tras una elevación de la concentración intracelular de Calcio produce la salida de Potasio y al mismo tiempo, una hiperpolarización de la membrana celular.

La regulación por calcio viene dada por la unión constitutiva de calmodulina al extremo carboxi-terminal de las subunidades que integran el canal, actuando así la calmodulina como una subunidad beta sensible al calcio. Este canal iónico no está regulado por voltaje como otros canales de potasio, es decir, no se inactiva con voltajes negativos, y gracias a esto puede provocar una hiperpolarización sólida y permanente. Esta función del canal iónico es importante para varios tejidos ya que con esas características su actividad regula el flujo de otros iones a través de la membrana celular y otras funciones dependientes de una hiperpolarización, como el movimiento de Calcio a través de canales regulados por voltaje.

Estos canales KCa3.1 se encuentran expresados a un nivel considerable en varios tejidos y células no excitables (Wei et al. 2005), tales como los eritrocitos, donde se ocupan de la regulación del volumen (conocidos como canales de Gardos)(Grgic et al. 2009); las células blancas del linaje sanguíneo, con funciones inmunológicas (Wulff et al. 2000; Wulff and Castle 2010) ; el endotelio vascular, para la vasorregulación (Köhler et al. 2000; Köhler and Ruth 2010); las glándulas salivares (Begenisich et al. 2004)y el epitelio intestinal (Devor et al. 1996)y bronquial (Singh et al. 2001), donde median la secreción de agua y Cloro.

Estos canales también juegan un papel protagonista en ciertas condiciones patológicas, por ejemplo, se ha observado que en células T activadas se produce una regulación a la alta de KCa3.1 (Wulff et al. 2000), y varios estudios han mostrado que el bloqueo de este canal, tanto *in vitro* como *in vivo* tiene efectos inmunosupresores (Wulff and Castle 2010). También se ha propuesto que esta regulación a la alta de KCa3.1 podría conducir a una proliferación celular anormal de otros tipos celulares y a cáncer (Grgic et al. 2005; Abdullaev et al. 2010). De hecho, inhibidores de KCa3.1 han demostrado reducir la proliferación de la neoíntima en

ratas (Köhler et al. 2003), reducir la neo-angiogénesis (Grgic et al. 2005) y disminuir la fibrosis renal en ratones (Grgic et al. 2009). Estos bloqueadores de KCa3.1 también han demostrado reducir el tamaño de la zona infartada tras infartos experimentales en ratones (Chen et al. 2011) y de los edemas tras lesiones cerebrales traumáticas (Mauler et al. 2004).

Estos datos sugieren que los canales KCa3.1 podrían ser prometedoras dianas para prevenir la proliferación celular anormal y obtener nuevos tipos de terapias inmunosupresoras. El compuesto ICA-17043 (Senicapoc™) de Icagen Inc. avanzó en los estudios clínicos para el tratamiento de la anemia perniciosa (bloqueo de la contracción irreversible de los eritrocitos mediante el bloqueo del eflujo de K⁺ a través de KCa3.1, y con ello a la vez, el flujo de agua), sin embargo el medicamento falló al no poder evitar la crisis de células falciformes (Wulff et al. 2007), presumiblemente, debido a dosis y concentraciones plasmáticas muy bajas. No obstante, los responsables del estudio comunicaron mejoras en los parámetros eritrocitarios (Ataga et al. 2011).

Por todo lo mencionado, el canal iónico KCa3.1 se considera una diana terapéutica en situaciones de proliferación celular patofisiológicas.

2.1.1 Estructura del canal KCa3.1

El canal KCa3.1 está constituido por cuatro subunidades que forman un homotetrámero (Ishii et al. 1997; Köhler 2010). Cada subunidad está formada por 6 segmentos α-hélice transmembrana, con el lazo que forma el poro localizado entre los dominios 5 y 6. (Ver figura 1). Este lazo contiene el filtro de selectividad, que para los canales de potasio viene determinado por el motivo GYG (Glicina – Tirosina – Glicina) (Ver figura 2).

El canal está regulado por calmodulina, que se encuentra constitutivamente unida a cada una de las subunidades (4 a 4). La unión de Calcio a calmodulina, a una concentración de 100-300 nM de Ca²⁺, produce un cambio conformacional, que implica también un cambio en el extremo carboxi-terminal citosólico de la proteína KCa3.1, resultando en la apertura del canal.

KCa3.1 forma parte de la familia de cuatro miembros de genes de canales de Potasio que están regulados por calmodulina: KCa3.1, KCa2.1, KCa2.2 y KCa2.3 (Wei et al. 2005).

KCa3.1 juega un papel excepcional en esta familia, debido a que tiene una conductividad unitaria más alta que el resto, alrededor de 30 pS (entre 20 y 40 pS), en comparación con los 5-10 pS de los KCa2.X; y también tiene una farmacología diferente, así por ejemplo, KCa3.1 está bloqueado por la toxina peptídica del escorpión *Leirus Quinquestriatus* (caribdotoxina), mientras que los canales KCa2.X son sensibles a la toxina de la abeja melífera (Apamina) (para más detalles véase abajo farmacología).

La proteína en su estructura tetramérica no ha sido aún cristalizada y por el momento su estructura solo puede intuirse a base de modelos estructurales generados mediante herramientas informáticas.

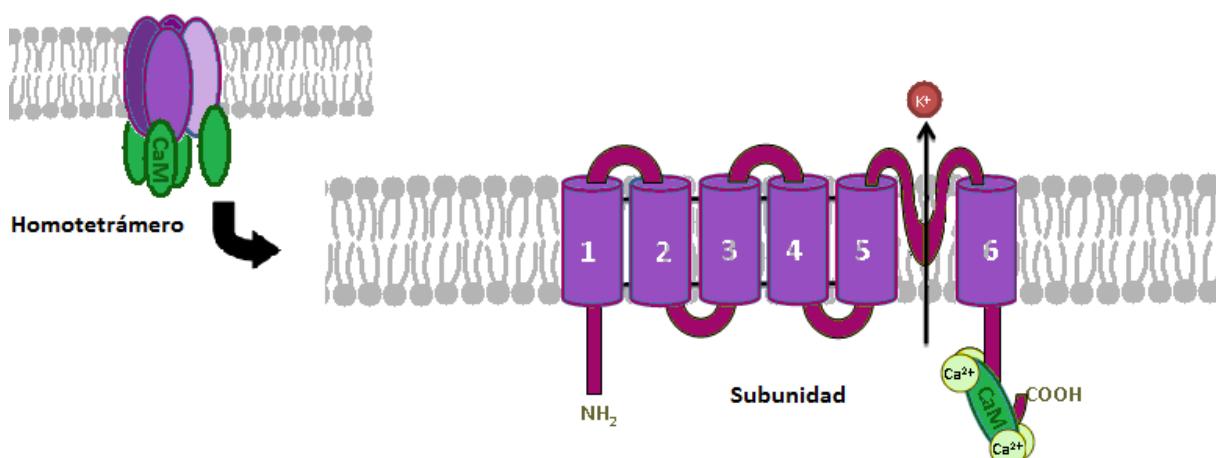


Figura 1. Esquema de la estructura homotetramérica de KCa3.1/KCa2.X (izquierda), con cuatro subunidades idénticas todas ellas formadoras del poro de selectividad, y todas ellas unidas constitutivamente a Calmodulina (CaM); y representación esquemática de su topología de membrana (derecha), ilustrando los seis dominios transmembrana (1-6) y el lazo formador del poro entre los dominios 5 y 6; se muestra también la unión de CaM a cada subunidad a través del segmento carboxi-terminal citosólico, confiriendo así la sensibilidad al Ca²⁺. (Adaptado de (Köhler 2010)).

2.1.2 Farmacología del canal KCa3.1

2.1.2.1 Bloqueadores

Los bloqueadores comúnmente establecidos del canal KCa3.1 son las toxina de escorpión, caribdotoxina, con una EC50 entorno a 5nM y maurotoxina, con una EC50 entorno a 2 nM; y

pequeñas moléculas, Clotrimazol ($EC_{50} \approx 200$ nM) y sus derivados, ICA_17043 (Senicapoc™, EC_{50} entorno a 10 nM) y 1-[(2-chlorophenyl)(diphenyl)methyl]-1H-pyrazole (TRAM-34, $EC_{50} \approx 30$ nM, ver Figura 2)). Todos ellos son relativamente selectivos (Wei et al. 2005; Wulff et al. 2007).

Lógicamente, los péptidos toxinas no pueden emplearse para un uso clínico sistematizado, pero las pequeñas moléculas mencionadas han demostrado ser seguras y, al menos en parte, efectivas en el tratamiento de diversos procesos de enfermedad en modelos animales. Sin embargo, los perfiles de selectividad de los compuestos no son aún muy satisfactorios, dado que algunos de estos bloqueadores afectan también a otros canales de la familia de canales de K⁺ y a otros canales catiónicos como ciertos canales TRP (Schilling and Eder 2007); y datos no publicados del grupo), así como a otras funciones enzimáticas (por ejemplo, el Clotrimazol bloquea el citocromo P450) (Wulff et al. 2000). Este problemático perfil de selectividad probablemente se encuentre relacionado con su mecanismo de acción, ya que estos compuestos, lipofílicos, penetran en la cavidad del canal, por debajo del filtro de selectividad (ver Figura 2) (Wulff et al. 2001), y de este modo, canales con estructuras similares podrían quedar igualmente bloqueados. No se conocen todavía bien bloqueadores que hagan su función no penetrando en la cavidad de KCa3.1, sino solamente interfiriendo el mecanismo de apertura del canal (como moduladores negativos de la actividad).

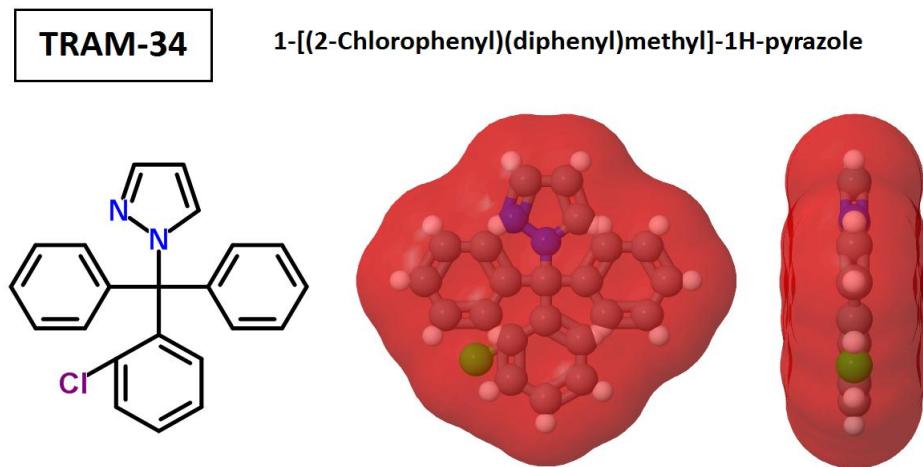


Figura 2a: nombre sistemático y estructura bidimensional y tridimensional (vista frontal y lateral) del bloqueador específico de canales KCa3.1, TRAM-34 (Modeladas con el software informático libre on-line “ChemSpider”).

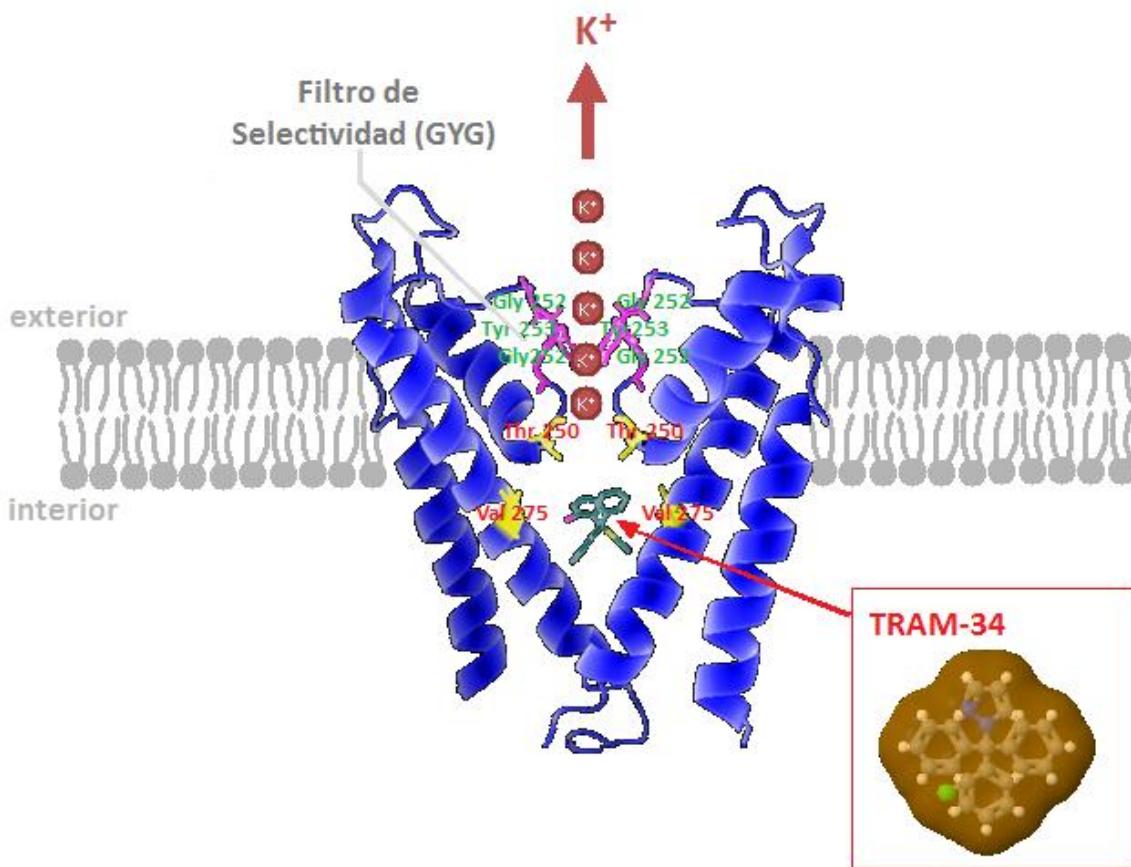


Figura 2b: vista lateral del modelo del canal KCa3.1, basada en la estructura cristalina del canal bacteriano KcsA. Solo se muestran dos de las cuatro subunidades. Se ha representado en verde el motivo Gly/Tyr/Gly del filtro de selectividad. El bloqueador TRAM-34 estaría ejerciendo su acción en el lugar señalado, interaccionando con los residuos hidrofóbicos Thr y Val, representados en rojo. (Adaptado de (Grgic et al. 2009)).

2.1.2.2 Activadores

Entre los activadores de KCa3.1 hasta ahora identificados se encuentran EBIO y DCEBIO (Singh et al. 2001), con una potencia y selectividad moderadas sobre los canales KCa2.X; así como Riluzol y NS309 (Strobaek et al. 2004), con potencia y selectividad baja (riluzol) y potencia buena pero poca selectividad (NS309).

El más selectivo de los activadores hasta ahora conocidos es naphtho[1,2-d]thiazol-2-amine (SKA-31) con una potencia aceptable (EC₅₀ entorno a 200 nM) y una selectividad 5 veces superior sobre los canales KCa2.X (Ver figura 3) (Sankaranarayanan et al. 2009). Se sospecha que su centro de unión está localizado cerca del centro de unión de calmodulina, y que su efecto activador está relacionado con la estabilización y promoción de la interacción de

calmodulina con el extremo carboxi-terminal. Así, SKA-31 funciona como un “positive gating modulator”, un modulador positivo de la actividad del canal.

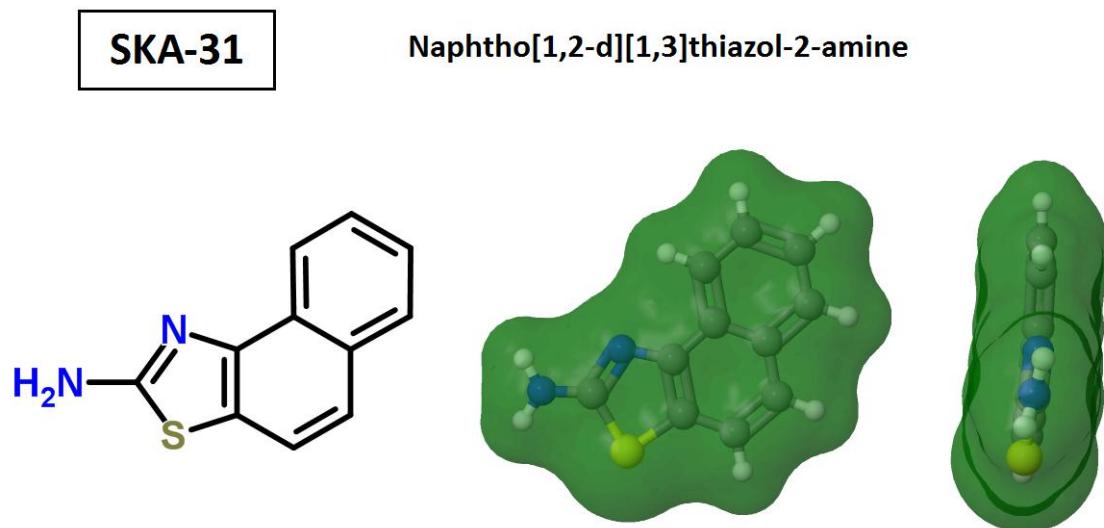


Figura 3: nombre sistemático y estructura bidimensional y tridimensional (vista frontal y lateral) del activador específico de canales KCa3.1/KCa2.X, SKA-31 (Modeladas con el software informático libre on-line “ChemSpider”).

2.2. Canales KCa 2.3

Dado que los estudios del presente trabajo también involucran el canal KCa2.3 para la evaluación de selectividad, se resumen a continuación las características básicas de este canal.

Los canales KCa2.3 se engloban dentro de la subfamilia filogenética de canales de baja conductividad unitaria (junto con KCa2.1 y KCa2.2) (Wei et al. 2005), que para estos canales alcanza valores de 5-10 pS. Al igual que KCa3.1 (filogenéticamente muy cercano) los KCa2.X son canales de potasio regulados por calcio a través de la unión constitutiva de calmodulina. La estructura del canal es equivalente a la detallada en el canal KCa3.1 (ver Figura 1), son homotetrámeros donde las cuatro subunidades son formadoras del poro de selectividad, cada una constituida por seis segmentos α -hélice transmembrana, con el lazo que contiene el filtro de selectividad GYG (característico de los canales de potasio) localizado entre los dominios 5 y 6.

Los activadores conocidos para este canal son los mismos que los descritos para KCa3.1: EBIO y DCEBIO (Singh et al. 2001) (potencia moderada, y selectividad moderadamente superior para KCa3.1), Riluzol (potencia baja y similar selectividad para KCa3.1 y KCa2.X) y NS309 (Strobaek et al. 2004) (potencia buena pero similar selectividad para KCa3.1 y KCa2.X), destacando que SKA-31 (EC50 entorno a 200 nM) tiene una selectividad 5 veces superior para los canales KCa3.1.

La diferencia en la farmacología de los canales KCa3.1 y KCa2.3 reside en sus bloqueadores. KCa2.3 es insensible a las toxinas peptídicas del escorpión Caribdotoxina y Maurotoxina, a Clotrimazol o a Senicapoc (bloqueadores eficaces de KCa3.1), pero es bloqueado con alta afinidad por la toxina de la abeja melífera, Apamina (EC50 1-10 pM). Otro bloqueador selectivo de KCa2.3 bien caracterizado es la pequeña molécula UCL1684, con una EC50 ≈ 3 nM. (Ver figura 4)

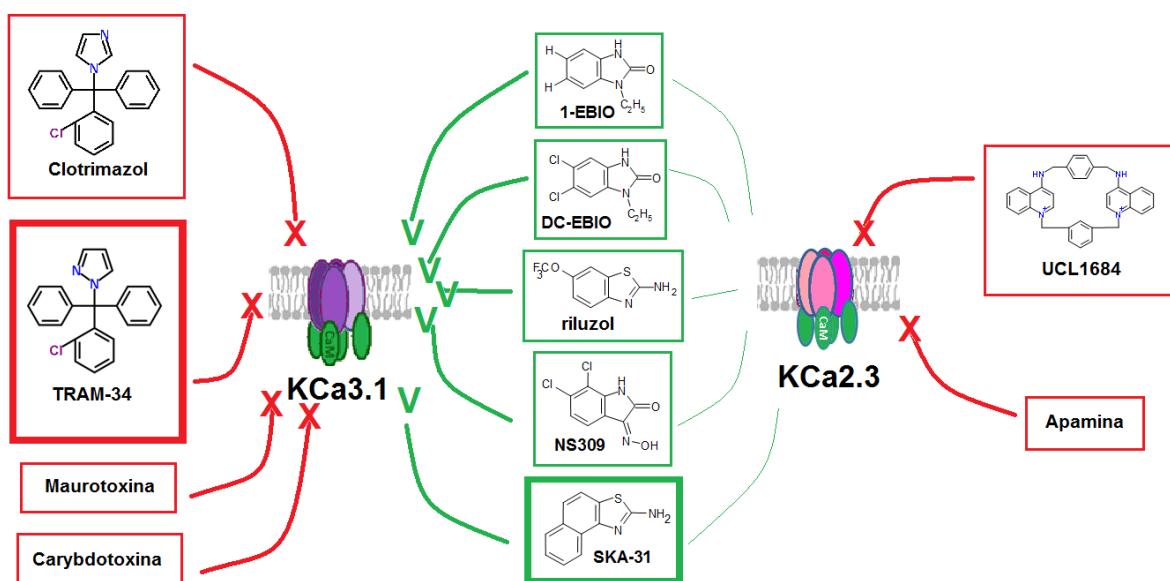


Figura 4: Relación de activadores y bloqueadores de los canales KCa3.1 y KCa2.3. Izquierda, en rojo, bloqueadores de los canales KCa3.1. Centro, en verde, activadores de los canales KCa3.1 / KCa 2.3; todos ellos tienen un efecto más potente sobre los canales KCa3.1. Derecha, en rojo, bloqueadores de los canales KCa2.3. Se muestran las estructuras de las estructuras de las pequeñas moléculas (obtenidas de “ChemSpider”); no se muestra la estructura de las toxinas. (Adaptado de (Grgic et al. 2009)).

2.3. Canales KCa 1.1

Los canales KCa1.1 pertenecen a un subgrupo filogenéticamente no emparentado con los canales KCa3.1/KCa2.X. Son canales de potasio regulados por Calcio con una conductividad unitaria elevada, de 200-300 pS. En este caso, la regulación por Calcio no viene mediada por Calmodulina, sino por la unión directa de Ca²⁺ a un centro de unión de alta afinidad localizado en el extremo carboxi-terminal de las subunidades alfa formadoras del poro de selectividad del complejo. Además, contiene un dominio sensible al voltaje, lo que le convierte en un canal dependiente de voltaje, causando su rápida inactivación a potenciales de membrana inferiores a entre -40 y – 50 mV.

2.3.1 Estructura del canal KCa1.1

El canal KCa1.1 está constituido por un homotetrámero de subunidades alfa formadoras del poro, y por cuatro subunidades beta1, estas últimas encargadas de incrementar la sensibilidad al Ca²⁺, y de este modo, incrementar la actividad del canal. (Ver figura 5) Cada subunidad alfa está formada por 7 segmentos hélices alfa transmembrana. El extremo carboxiterminal citosólico es extremadamente largo, y contiene 4 segmentos hidrofóbicos adicionales (7-10), responsables de la sensibilidad al calcio, que se logra por la unión directa de dos moléculas de Ca²⁺ al centro de unión de alta afinidad (denominado “Ca²⁺ bowl”) localizado en un lazo entre las alfa-hélices 9 y 10.

En el dominio transmembrana de la alfa-hélice 4 se localiza un motivo de argininas cargadas positivamente que constituyen el dominio sensible al voltaje, y que son las responsables de la inactivación del canal a potenciales de membrana negativos.

Las subunidades beta1 por su parte están codificadas por otro gen distinto (KCNMB1), y están constituidas por dos segmentos alfa-hélice transmembrana cuya función es incrementar la sensibilidad al Calcio del complejo.

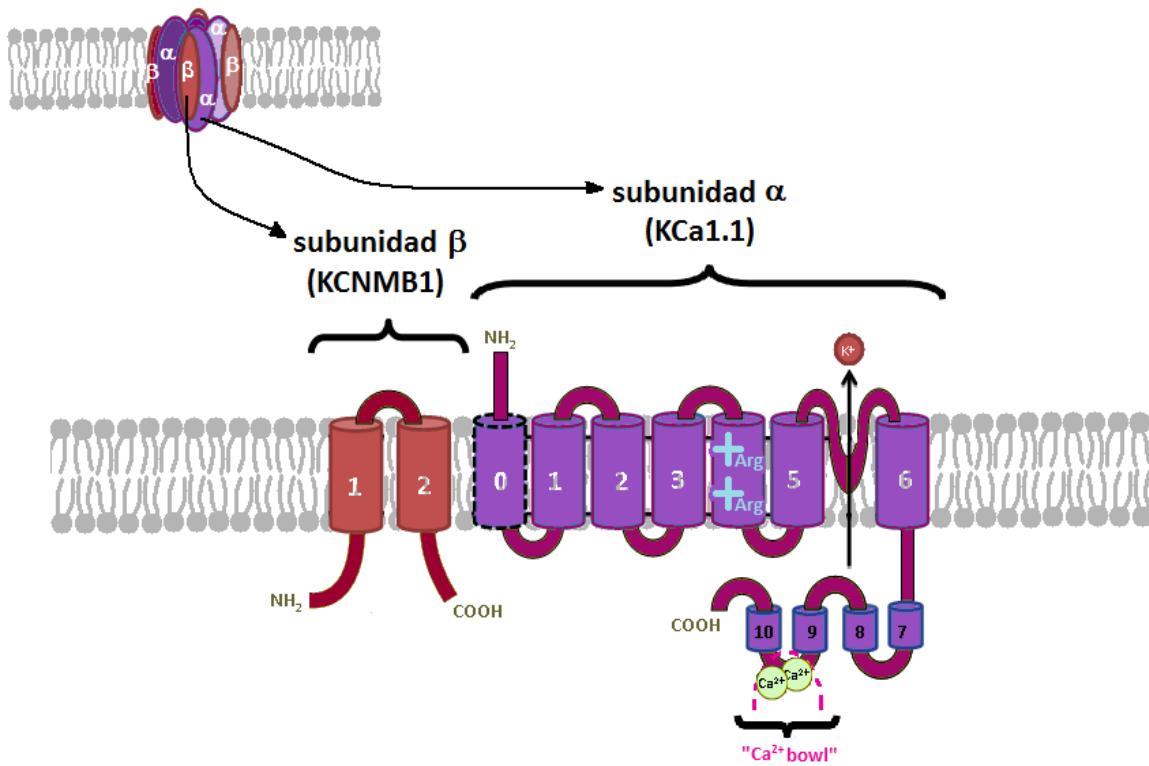


Figura 5. Esquema de la estructura del canal KCa1.1 (izquierda), formado por un homotetrámero de subunidades alfa (KCa1.1) formadoras del poro de selectividad, unidas a cuatro subunidades beta (KCNMB1); y representación esquemática de su topología de membrana (derecha), ilustrando los siete dominios transmembrana (0-6) de la subunidad alfa, con el lazo formador del poro entre los dominios 5 y 6, y el largo extremo carboxi-terminal formado por cuatro segmentos hidrofóbicos, con el “ Ca^{2+} bowl”, centro de unión de alta afinidad al calcio, responsable de la sensibilidad al Ca^{2+} , situado entre los segmentos 9 y 10 ; se señala en el segmento 4 la presencia de residuos de Arginina cargados positivamente que constituyen el dominio sensible al voltaje. Se muestra también la subunidad beta, con sus dos segmentos transmembrana que incrementan la sensibilidad del complejo al calcio. (Adaptado de (Köhler 2010)).

2.3.2 Farmacología del canal KCa1.1

2.3.2.1 Bloqueadores

El canal KCa1.1 está selectivamente bloqueado por la toxina del escorpión *Buthus tamulus*, Iberiotoxina, con una $\text{EC}_{50} \approx 2 \text{ nM}$. Además, también es bloqueado con eficacia por Caribdotoxina ($\text{EC}_{50} \approx 3 \text{ nM}$), si bien este bloqueador no puede considerarse selectivo para él (recordar que se ha descrito como bloqueador de KCa3.1 con una $\text{EC}_{50} \approx 5 \text{ nM}$, y que además bloquea otros canales de potasio regulados por voltaje) y por la pequeña molécula Paxilina ($\text{EC}_{50} \approx 2 \text{ nM}$)

2.3.2.2 Activadores

Entre las moléculas más usadas como activadores de KCa1.1 se encuentran NS1608 ($EC_{50} \approx 3 \text{ uM}$) y NS1619 ($EC_{50} \approx 30 \text{ uM}$), siendo ambos bastante selectivos, aunque NS1619 bloquea también KCa3.1 y algunos canales de Calcio regulados por voltaje. Estos activadores actúan directamente sobre las subunidades alfa, pero sin modificar la sensibilidad al calcio.

Los activadores más potentes y selectivos de este canal KCa1.1 descubiertos hasta hoy son NS11021 ($EC_{50} \approx 400 \text{ nM}$) y BMS-204352 ($EC_{50} \approx 350 \text{ nM}$).

También es activador de este canal el DHS-1, presente en algunos tratamientos contra el asma, que actúa sobre las subunidades beta1 del canal.

3. Hipótesis y Objetivo del estudio

3.1. Motivación e Hipótesis

En proyectos del grupo con colaboradores en Bruselas (Lamoral-Theys et al. 2011) se trabajó buscando y probando la eficacia de nuevos inhibidores de KCa3.1 con el objetivo de inhibir el crecimiento celular en cáncer.

Algunas de las moléculas que se encontraron como candidatas tenían una estructura molecular que hacía suponer que podrían ser buenos inhibidores de los canales KCa3.1. (Ver figura 6).

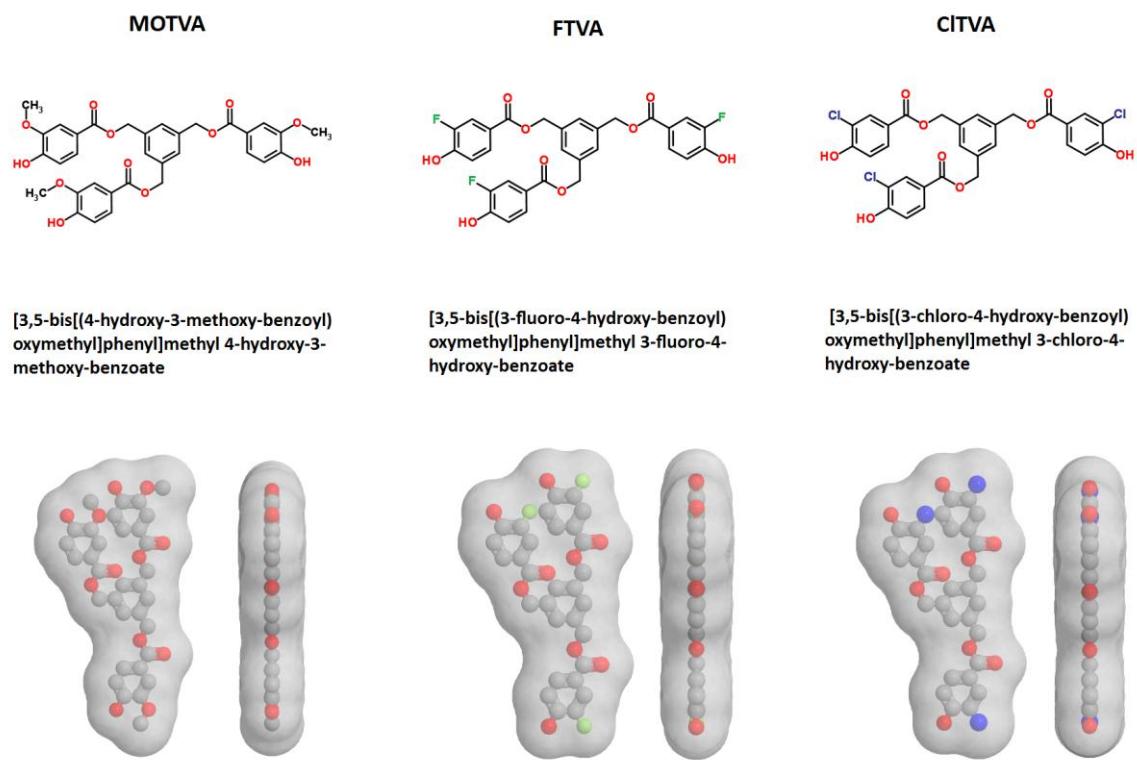


Figura 6: Nombre sistemático y estructura química bidimensional y tridimensional de los tres trivanilatos objeto de estudio: metoxi-trivanilato (MOTVA), fluoro-trivanilato (FTVA), y cloro-trivanilato (CITVA). (Modeladas con el software informático libre on-line “ChemSpider”).

La forma de estas moléculas candidatas era estructuralmente única, y en principio, demasiado grande para penetrar en la cavidad del canal, del modo en el que lo hacen los

bloqueadores conocidos. Es por esto que se decidió testar la eficacia moduladora de estas moléculas sobre el canal KCa3.1. Para ello, en el presente proyecto se han llevado a cabo ensayos electrofisiológicos mediante la técnica patch-clamp sobre células que expresaban el canal KCa3.1.

Concretamente, el objetivo de este proyecto ha sido identificar la eficacia inhibidora de nuevos derivados del ácido vinílico (ver Figura 6), los trivanilatos Fluoro-trivanilato (FTVA), Metoxi-trivanilato (MOTVA), y Cloro-trivanilato (CITVA) en un sistema modelo *in vitro*.

3.2 Tareas específicas:

1. Identificación y caracterización de canales KCa3.1 en una línea humana de fibroblastos 3T3-L1, mediante ensayos con el método Patch-clamp.
2. Prueba de la eficacia de los nuevos trivanilatos como inhibidores de canales KCa3.1 expresados en la línea de fibroblastos 3T3-L1
3. Elaboración de una relación Dosis Respuesta de los trivanilatos Fluoro-trivanilato (FTVA), Metoxi-trivanilato (MOTVA) y Cloro-trivanilato (CITVA), en los casos que proceda.
4. Prueba de la eficacia de los trivanilatos como moduladores negativos de la actividad del canal, determinando su interacción al nivel de la proteína con el modulador positivo SKA-31.
5. Caracterización de la selectividad de los compuestos sobre otros canales relacionados, los canales KCa2.3 (cercanos filogenéticamente) y KCa1.1 (más alejados filogenéticamente)

4. Materiales y Métodos

4.1 Métodos

4.1.1. Líneas celulares

Para el estudio de los canales KCa3.1 se emplearon fibroblastos 3T3-L1, que fueron cortesía del Dr. José Miguel Arbonés-Mainar (UIT del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Instituto Carlos III).

Las células COS-7, con la sobreexpresión del canal KCa2.3 humano fueron cortesía de la Dra. Heike Wulff (Farmacology University of California, Davis, EEUU).

Para el estudio de los canales KCa1.1 se emplearon fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry, que fueron una donación de Javier Gervás y Dra. MªPilar Giraldo de la UIT.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio MEM Earle's, suplementado con NCS (Newborn Calf Serum) 10% y Penicilina/Estreptomicina (Sigma, 10000 uds penicilina y 10 mg/ml Estreptomicina, al 0,9% NaCl) 6% (Medio y NCS de la empresa Biochrom KG, Berlin, Alemania).

Los 3T3-L1 y las COS-7 se dejaron crecer hasta confluencia y fueron subcultivadas, haciendo pases usando tripsina/EDTA (0,25% Y 0.02%EDTA, también de la empresa Biochrom KG, Berlín, Alemania), y resemebradas 1 a 4. (Ver figura 7)

Los fibroblastos de pacientes no fueron subcultivados más, se mantuvieron en el medio de cultivo citado, habiendo sido sembrados sobre fragmentos de vidrio (cubreobjetos fragmentados) dispuestos en la superficie de placas Petri, y crecido sobre ellos.

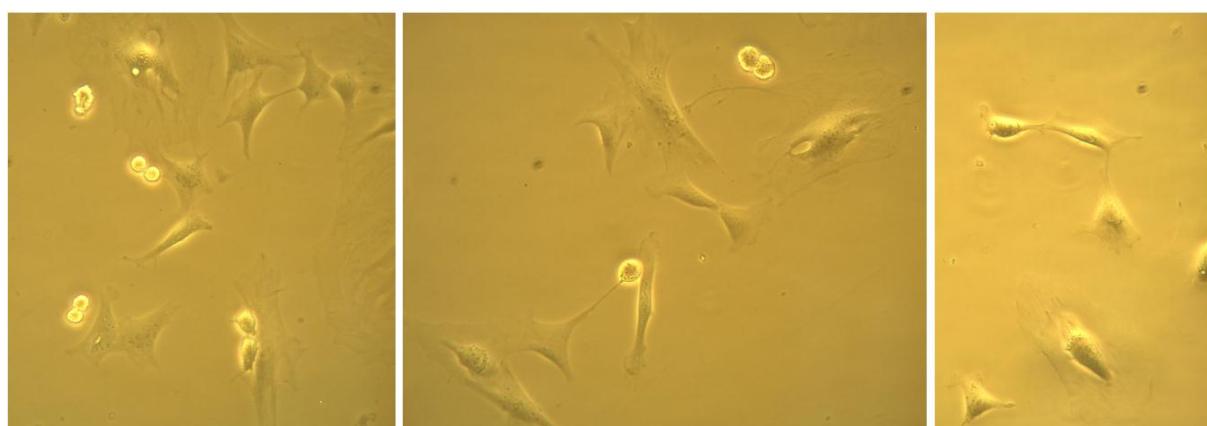


Figura 7: fibroblastos 3T3-L1 en cultivo en medio MEM Earle's suplementado con NCS al 10% y Penicilina/Estreptomicina al 6%. Imagen obtenida 24 horas después de la resiembra.

Para los ensayos patch-clamp, en el día de su estudio, los fibroblastos 3T3-L1 fueron tripsinizados y sembrados sobre pequeños fragmentos de vidrios cubreobjetos; en una solución con elevada concentración de Na⁺ compuesta por (mmol/L): 140 NaCl, 1 MgO₄S, 1 CaCl₂, 5 KCl, 10 Glucosa, 10 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH. Las células se dejaron adherir a los vidrios durante media hora, y se usaron para realizar las medidas electrofisiológicas durante hasta 8 horas.

En el caso de las células COS-7, previamente a los ensayos electrofisiológicos, las células fueron tripsinizadas y resembradas en placas Petri sobre fragmentos de vidrios cubreobjetos, en el medio de cultivo habitual, donde se dejaron adherir a los vidrios durante las 24-48 horas previas a su uso. Tras este tiempo, para la realización de los ensayos patch-clamp los vidrios fueron recogidos del medio de cultivo y depositados cuidadosamente sobre placas con la solución de elevada concentración de Na⁺ anteriormente citada. Mantenidas en esta solución, las células se usaron para los ensayos patch-clamp durante un máximo de 5 horas.

Para los ensayos con los fibroblastos de pacientes, en el momento de su uso se recogieron del medio de cultivo algunos vidrios y se depositaron cuidadosamente sobre placas con la solución de elevada concentración de Na⁺ ya mencionada, donde se mantuvieron mientras eran usados durante hasta un máximo de 5 horas (Ver figura 8).

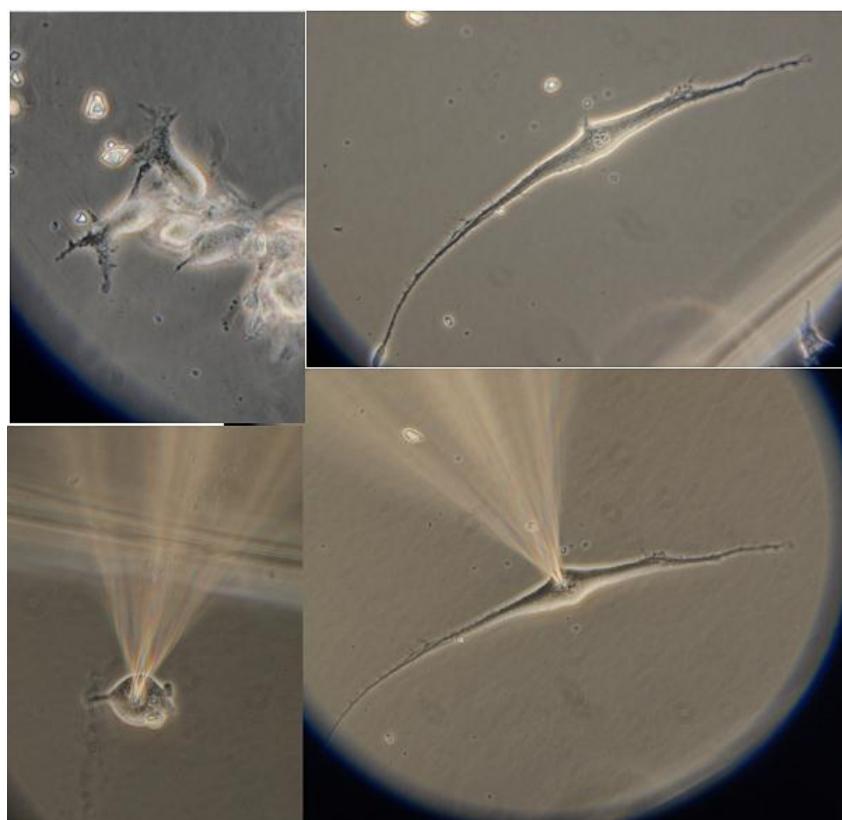


Figura 8: fibroblastos de pacientes de Fabry, adheridos a los cristales e inmersos en la solución de NaCl en donde se lleva a cabo la medición de las corrientes. Las fotografías de la parte inferior fueron tomadas durante el proceso de medición de corrientes.

4.1.2. Bases de la técnica patch-clamp

En el presente trabajo, la técnica patch-clamp se aplica para examinar las corrientes de potasio, activadas por la concentración de calcio intracelular, $[Ca^{2+}]_i$, que atraviesan la membrana celular a través de su correspondiente canal iónico.

La técnica del patch-clamp fue desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann (Neher & Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981) y es muy empleada para medir las corrientes de membrana de pequeñas células, así como para medir la actividad de canales iónicos individuales (Sakmann & Neher, 1983; Ogden & Stanfield, 1994; Numberger & Draguhn, 1996).

Una de las cuestiones más interesantes de esta técnica es que permite manipular con facilidad el fluido en los lados intracelular y extracelular de la membrana mientras se está llevando a cabo la medición.

Para llevar a cabo esta técnica se emplea una pipeta de vidrio con una abertura micrométrica en su punta, que se pone en contacto muy estrecho con una pequeña zona de la membrana plasmática de la célula estudiada, en la que se encontrará uno o un pequeño número de canales iónicos. El principio básico de su funcionamiento está en el aislamiento casi perfecto de la zona de contacto entre la pipeta y la membrana, en lo que se denomina Gigaseal (Gigasello) (Ver figura 9). Para su formación es necesario aplicar una presión negativa sobre la pipeta, que succione la membrana de tal modo que la corriente de iones no pueda escapar a través de la intersección entre ambas superficies. Este punto es crítico en la realización de la técnica, y la resistencia eléctrica que ofrece esa zona de membrana pinzada por la pipeta debe alcanzar un GigaOhmio; bajo esas condiciones la corriente de iones que atraviesa la unión entre la membrana y la pipeta no será superior a 10 pA, lo que resulta despreciable. De este modo todos los iones que fluyan a través de un canal situado en la zona pinzada fluirán a través de la pipeta.

La pipeta se llena con una solución acuosa de composición variable y contiene en su interior un microelectrodo, conectado a un amplificador que medirá la corriente a través del circuito que se completa con un electrodo insertado en el medio en el que se encuentra inmersa la célula estudiada.

El equipo así dispuesto permite mantener constante el voltaje a través de la membrana y cuantificar el movimiento de iones a partir de la cantidad de corriente eléctrica necesaria para mantener el potencial de membrana en el valor determinado.

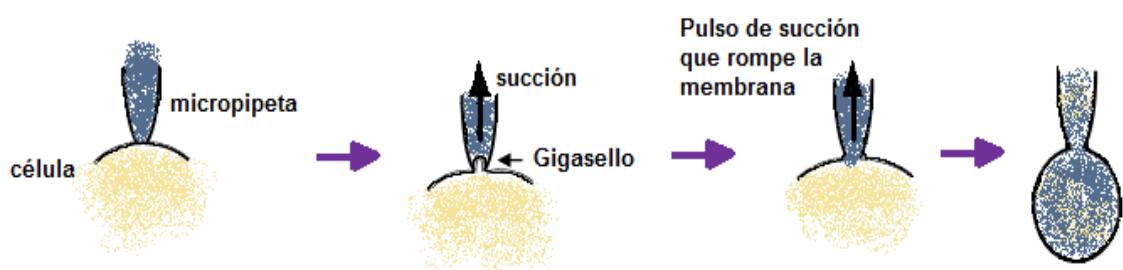


Figura 9: Representación esquemática del proceso de patch-clamp en el modo whole-cell.

Por la ley de Ohm, que establece que la intensidad eléctrica que circula entre dos puntos de un circuito eléctrico es directamente proporcional a la tensión eléctrica entre dichos puntos, siendo la constante de proporcionalidad entre esas dos magnitudes la conductancia eléctrica, G (medida en Siemens), inversa a la resistencia eléctrica, R (en Ohmios):

$$I = G \cdot V = V / R$$

siendo I la corriente que pasa a través del objeto (medida en Amperios) y V la diferencia de potencial en Voltios,

si fijamos el voltaje del circuito de patch-clamp y el amplificador nos proporciona la medida de la corriente I, podemos de esa forma calcular R y G, deduciendo así la conductividad del canal iónico.

En función del tratamiento que se haga de la zona pinzada podemos diferenciar distintas variantes de la técnica. En el presente trabajo, todos los ensayos se han realizado en el modo “whole-cell”. En este modo, tras la formación del gigasello se aumenta la succión ejercida en el interior de la pipeta y se consigue así romper la membrana pinzada, manteniéndose aún la unión hermética de la célula a la pipeta (ver figura 9). De este modo, el interior celular es continuo con el interior de la pipeta. Así, uno de los electrodos (el que genera corriente

eléctrica) queda en un lado de la membrana plasmática, y el otro (el de tierra) queda al otro lado de la membrana, y se puede medir directamente el potencial de membrana. Es uno de los usos más frecuentes, muy útil para estudiar la acción de los canales regulados por voltaje, o la acción de las vías de señalización intracelular sobre los canales de membrana, así como la respuesta global de la célula a fármacos, además de ser el único modo que permite la medida de potenciales de acción. En este modo se monitoriza la acción de todos los canales de la célula simultáneamente.

Hay que tener en cuenta que dado que el volumen de solución que hay en el interior de la pipeta es mucho mayor que el que hay dentro del interior celular, la solución de la pipeta acabará por sustituir al medio intracelular en el transcurso de la medición. Esto puede suponer un problema si factores citosólicos relevantes para el estudio son lavados en ese proceso.

Para que esto no ocurra, en los ensayos realizados en el presente trabajo se emplearon soluciones de composición similar a los medios extra e intra –celular fisiológicos, con elevada concentración de sodio, y de potasio, respectivamente. Además, se fijó una concentración de calcio libre en la solución de la pipeta tal que permitiera la activación de los canales objeto de estudio. (Ver apartado anterior para la descripción de las disoluciones, y figura 10).

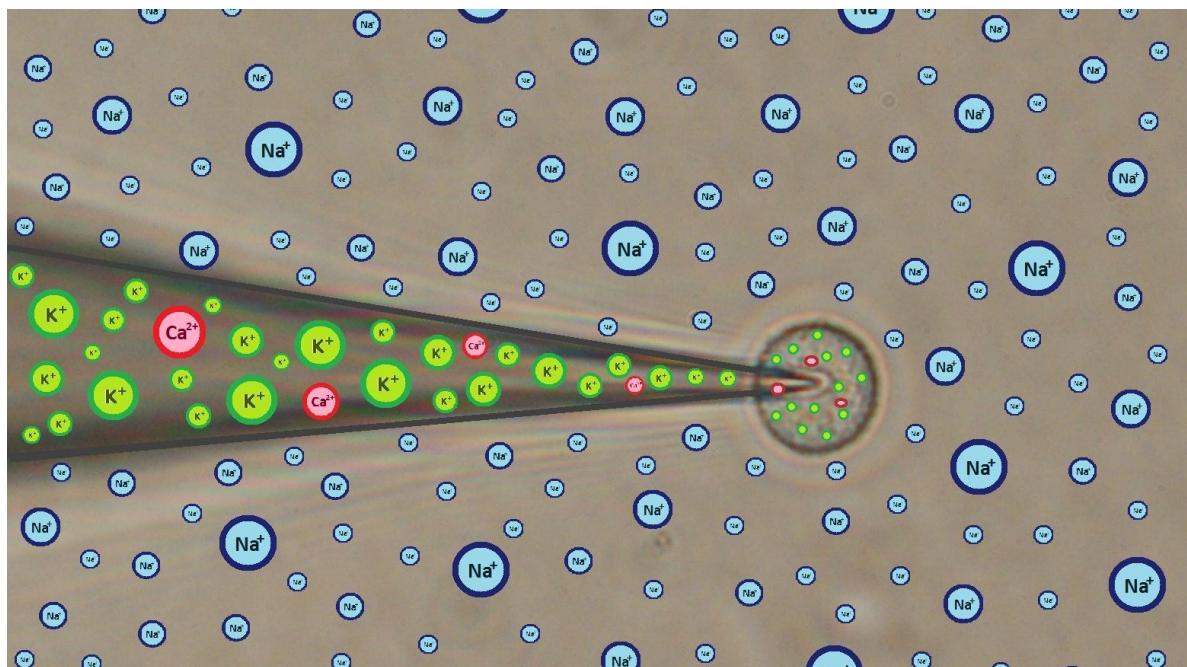


Figura 10: representación esquemática de la disposición de las soluciones. La cámara de grabación se llena con una solución de elevada concentración de sodio. La pipeta contiene una solución con elevada concentración de potasio (en verde) y Calcio (rojo); los medios internos de la célula y la pipeta se homogeneizan en el transcurso del ensayo, debido a que la apertura de $\approx 1 \mu\text{m}$ de la pipeta permite el libre paso de los fluidos.

4.1.3. Ensayos electrofisiológicos Patch-Clamp

Se midieron las corrientes de células aisladas, en el modo *whole-cell*, usando para ello un amplificador de Patch-clamp EPC10-USB (de la empresa HEKA electronics, Alemania) y se grabaron con el programa Patchmaster™.

Para las mediciones electrofisiológicas, fragmentos de vidrios con las células adheridas (como se ha descrito en el apartado anterior), se pusieron en la cámara de grabación que contenía 1 ml de la solución de NaCl anteriormente detallada.

Para visualizar las células y la micropipeta se empleó un microscopio invertido Olympus IX71. Se empleó un micromanipulador, conectado a un pequeño sistema de control de la presión, para el movimiento de la pipeta y la precisa aproximación a la célula, permitiendo la formación de una unión estrecha entre la pipeta y la membrana celular.

Todo el equipo se localizaba sobre una mesa antivibración, y dentro de una jaula Faraday. (Ver figura 11).

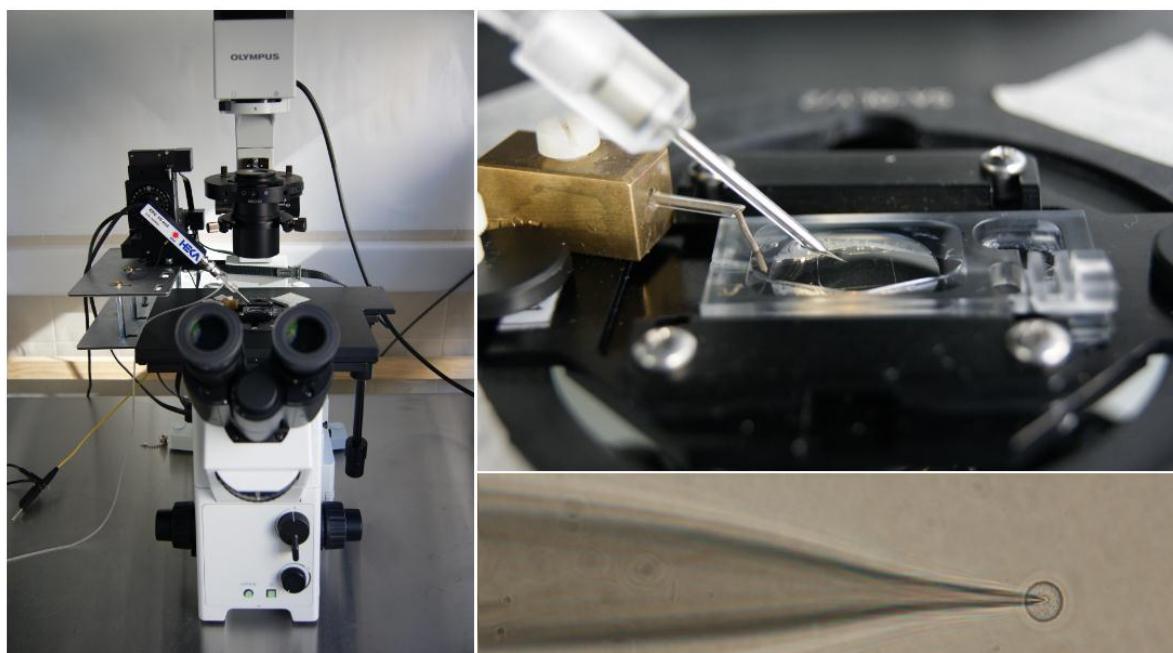


Figura 11: Imágenes del equipo para patch-clamp. A la izquierda, microscopio invertido Olympus IX71, con la cámara de grabación y el brazo del micromanipulador con la micropipeta acoplados, dispuesto sobre la mesa antivibración y dentro de la jaula Faraday. Derecha arriba, cámara de grabación sobre la platina del microscopio, llena con la solución de NaCl. Están insertos en ella el electrodo de tierra y la micropipeta (con el otro electrodo en su interior), así como un fragmento de cristal (bajo la punta de la micropipeta) al que se han adherido las células objeto de estudio. Derecha abajo, imagen de una célula 3T3-L1 durante el proceso de grabación de corrientes.

Las micropipetas, de vidrio de borosilicato, se fabricaron de modo que la resistencia en la punta fuera de 3 a 5 MΩ, empleando para ello un estirador de pipetas Zeitz DMZ (Munich, Germany).

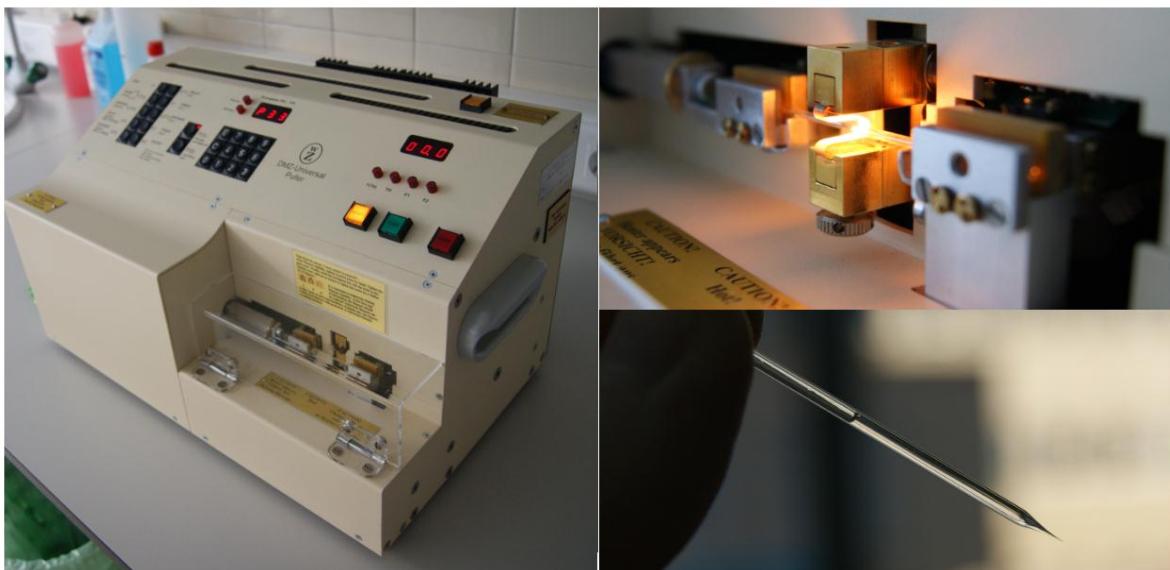


Figura 12: Izquierda, estirador de pipetas Zeitz DMZ; Derecha arriba, detalle de la resistencia que calienta el capilar de vidrio a una temperatura determinada y precisa, para permitir su estiramiento y la formación de una micropipeta capilar con un diámetro en la punta de entorno a 1μm; Derecha abajo, micropipeta capilar.

La resistencia del sello una vez establecida la conexión celular fue siempre superior a 1 GΩ. Para la grabación de los datos en el modo whole-cell, las relaciones corriente-voltaje (I-V) se obtuvieron cíclicamente cada 3 segundos. El voltaje fijado en las mediciones fue, en todos los casos, el siguiente protocolo (Ver figura 13):

- pulso a -80 mV de 500 ms de duración,
- pulso a +80 mV de 500 ms de duración,
- rampa de -120 mV a +100 mV desarrollada a lo largo de 1000 ms,
- pulso a 0 mV durante 1000 ms.

Para la interpretación de los datos obtenidos se analizó la amplitud de la corriente a 0 mV (salvo casos aislados en los que se especifique de otra manera).

Los datos fueron grabados con una frecuencia de un punto/dato cada 0.5 ms y filtrados a 1000Hz.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (~22°C).

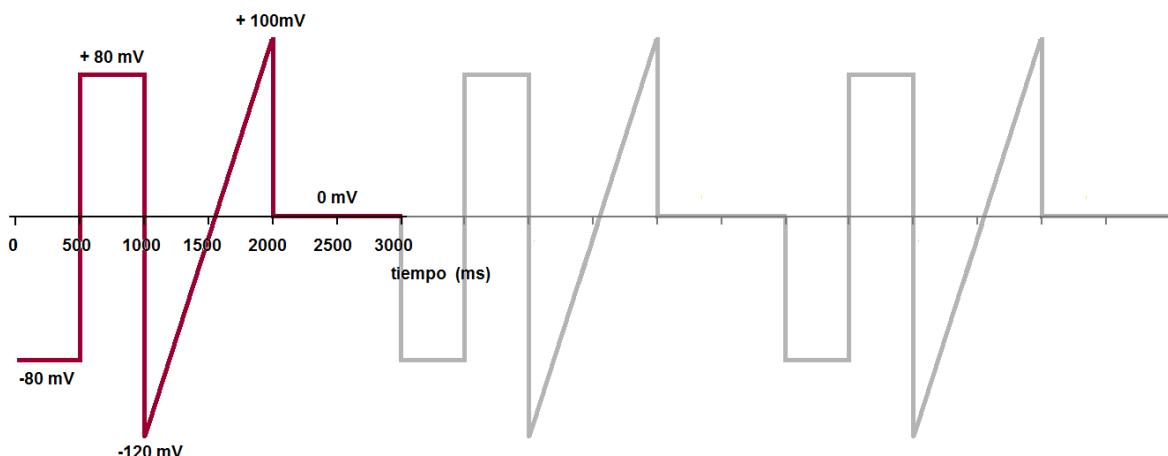


Figura 13: Protocolo de voltaje aplicado en todas las mediciones realizadas en el modo whole-cell, que se repetía cíclicamente cada 3 segundos.

Para la activación de las corrientes de canales KCa, las células fueron dializadas con la solución de KCl de la pipeta conteniendo $1 \mu\text{mol/L}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ (en mmol/L): 140 KCl, 1 MgO_4S , 2 EGTA, 1.71 CaCl_2 , y 5 HEPES (ajustado a pH 7.2 con KOH).

Para la determinación de la activación máxima de las corrientes en algunos ensayos, se añadió al baño el activador de canales KCa3.1/KCa2.X Nafto[1,2-d]tiazol-2-ilamina (SKA-31, 0.01 - 1 $\mu\text{mol/L}$) (Sankaranarayanan et al., 2009).

En los experimentos en los que fue necesario bloquear las corrientes se añadió el bloqueador selectivo de KCa3.1 1-[(2-Clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazol (TRAM-34 , 1 $\mu\text{mol/L}$)(Wulff et al., 2000).

Para la comprobacion de la eficacia de los ácidos trivanílicos (Lamoral Theys et al., 2011), [3,5-bis[(3-fluoro-4-hydroxy-benzoil)oximetil]fenil]metil 3-fluoro-4-hidroxi-benzoato (abreviado como ácido fluoro-trivanílico, FTVA), [3,5-bis[(3-cloro-4-hidroxi-benzoil)oximetil]fenil]metil 3-cloro-4-hidroxi-benzoato (ácido Cloro-trivanílico, CITVA), y [3,5-bis[(4-hidroxi-3-metoxi-benzoil)oximetil]fenil]metil 4-hidroxi-3-metoxi-benzoato (ácido Metoxi-trivanílico, MOTVA) como posibles bloqueadores, se emplearon concentraciones de 1 pmol/L – 5 $\mu\text{mol/L}$.

Se prepararon disoluciones stock de todos estos compuestos a concentración 1mmol/L con dimetilsulfóxido (DMSO). Todas las diluciones que se hicieron fueron con DMSO, de tal modo que la concentración final de DMSO en la solución de la cámara de grabación no superara el 0.5%. Se llevaron a cabo ensayos para comprobar que esa concentración de DMSO no tiene

un efecto bloqueante o activador *per se* en ninguno de los canales ensayados (ver figura 18 en apartado 5).

4.1.4. Análisis y evaluación.

El análisis de los datos proporcionados por el amplificador de patch-clamp se realizó empleando el software “Patchmaster” (HEKA, Lamprecht Pfalz, Alemania). Para la interpretación de los datos obtenidos se analizó la amplitud de la corriente a 0 mV (salvo casos aislados en los que se especifique de otra manera).

Para la recopilación de datos y los cálculos matemáticos y estadísticos básicos (cálculo de promedios, desviación estándar y error estándar) se empleó el software Excel (versión Office 2007) Para cálculos de matemáticas más avanzadas, cálculo EC50 y representaciones gráficas, se empleó el programa Origin 6.0. Las gráficas se ajustaron según curvas sigmoideas de tipo Boltzmann ($y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$) o Logística ($y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$), y a rectas lineales estándar, de la colección de formulas del programa.

4.2. Materiales

Equipos:

- Amplificador Patch-clamp EPC10 USB, HEKA electronics, Kamprecht Pfalz, Alemania.
- Estirador de Pipetas Zeitz, Empresa Zeitz, Martinsried , Alemania.
- Jaula Faraday, fabricación propia.
- Mesa flotante antivibracion Modelo Pat120, Empresa Fabreeka International, Büttelborn, Alemania.
- Micromanipulador Sutter Modelo MP225, Sutter Instruments , Novato, CA, E.E.U.U.
- Microscopio Olympus IX71, Olympus, Tokio, Japón.
- Ordenador HP Compaq Elite 8100 SFF, HP, Palo Alto, California, E.E.U.U.

Software:

- Patchmaster™
- Origin 6.0
- Excel (office 2007)

Materiales, reactivos estándar y medios/enzimas para el cultivo celular:

- Capilares de borosilicato GC150-15, Havard Apparatus, Edenbridge Kent, UK.
- Micropipetas Eppendorf, Eppendorf, Hamburg, Alemania.
- Puntas de pipeta y plásticos para cultivo celular estandar (varias empresas).
- Medio de cultivo, tripsina y suero fetal bovino, de Biochrom KG, Berlin, Alemania.
- Reactivos estándar de Sigma, Deisenhofen, Alemania.

5. Resultados

5.1. Identificación y caracterización de canales KCa3.1 en la línea humana de fibroblastos 3T3-L1, mediante ensayos con el método Patch-clamp.

Para identificar y caracterizar la presencia de canales KCa3.1 en los fibroblastos 3T3-L1 se llevaron a cabo ensayos patch-clamp en el modo whole-cell, tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

Las corrientes basales eran pequeñas y en un inicio, no eran evidentes altas conductividades de potasio.

Al infundir Calcio a la célula a través de la solución de la pipeta con el desarrollo del experimento se observó una preactivación de una corriente dirigida hacia afuera, y al mismo tiempo, un movimiento del potencial reverso hacia valores más negativos hasta cerca del potencial de equilibrio para potasio, indicando la activación de canales de potasio. La figura 14 es un ejemplo de esa activación.

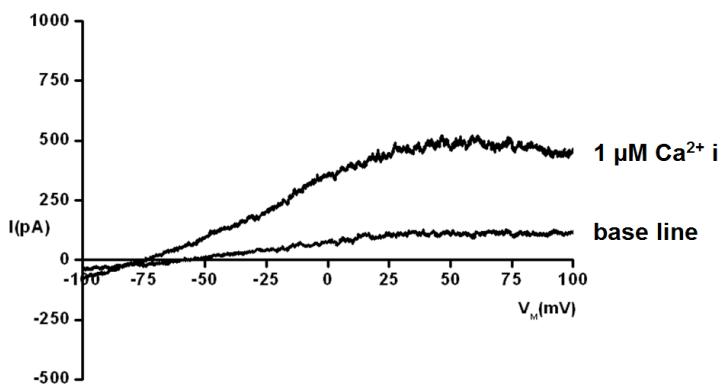


Figura 14: grabación original ejemplo de cómo las pequeñas corrientes basales al inicio de la medición se ven aumentadas con el transcurso de ésta como resultado de la activación de los canales KCa3.1 por el Ca^{2+} infundido a la célula a través de la pipeta.

Esa corriente se podía potenciar con el activador de KCa3.1 SKA-31 (Figura 15 izquierda), en un modo dependiente de la concentración empleada, y tras la adición de series de 5 concentraciones crecientes de SKA-31 (10 nM a 1 μ M) se pudo elaborar una curva de dosis-respuesta y con ella calcular una EC₅₀ de 112 nM para la activación de KCa3.1 por SKA-31 (figura 15 derecha).

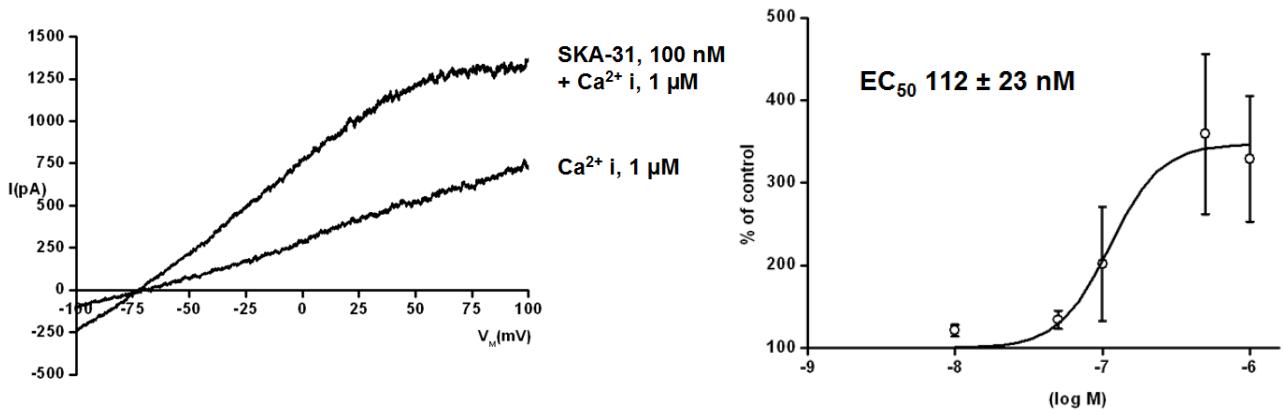


Figura 15: Izquierda, grabación original como ejemplo de corrientes activadas por Ca²⁺ y su potenciación con SKA-31. Derecha, curva dosis respuesta del efecto activador de SKA-31. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidal de Boltzmann y se calculó una EC₅₀ para la activación de los canales KCa3.1 por SKA-31 de 112 nM, como se indica. Los datos representan el promedio de activación por SKA-31 en porcentaje \pm el error estándar del promedio.

Esa corriente activada por SKA-31 se podía bloquear completamente con el bloqueador de KCa3.1 TRAM-34 1 μ M en todos los casos (número de experimentos $n > 10$) (Figura 16), indicando que, según este perfil de corrientes, la línea de fibroblastos 3T3-L1 empleada expresa canales KCa3.1.

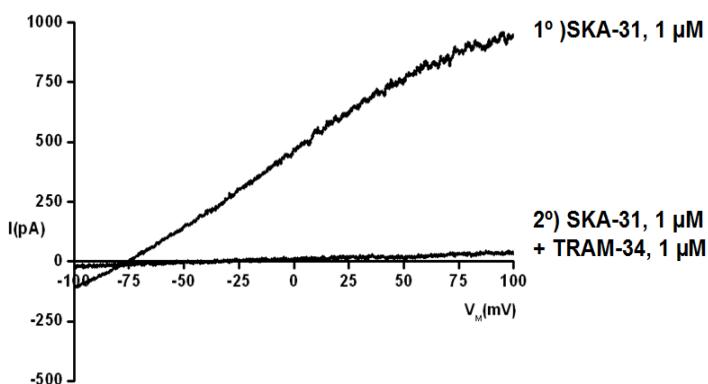


Figura 16: grabación original ejemplo de inhibición de la corriente activada por SKA-31 con el bloqueador específico de KCa3.1, TRAM-34.

5.2. Prueba de la eficacia de los nuevos trivanilatos como inhibidores

de canales KCa3.1 expresados en la línea de fibroblastos 3T3-L1

En primer lugar se llevaron a cabo experimentos con FTVA.

Para comprobar su eficacia inhibidora en canales KCa3.1, se realizaron ensayos donde la corriente era primero potenciada por SKA-31 1 μ M. Tras comprobar la activación del canal KCa3.1 por este activador típico, se añadió al sistema FTVA a una concentración de 1 μ M, y se observó el bloqueo casi total de la corriente (90%) (Ver figura 17 A y D), de un modo similar a lo observado en el bloqueo con TRAM-34.

A continuación este mismo protocolo se realizó con CITVA, pero en este caso, se observó que CITVA no producía un bloqueo fuerte en el rango de 1 μ M, disminuyendo la corriente potenciada por SKA-31 tan solo en un 39% (Figura 17 B y D); y solo se consiguió un bloqueo del 50% de la corriente potenciada por SKA-31 a la concentración más alta probada, que fue de 5 μ M de CITVA. Al realizar de nuevo este ensayo con MOTVA 1 μ M, el bloqueo de la corriente potenciada por SKA-31 fue aún menor, de un 22% (Ver figura 17 C y D).

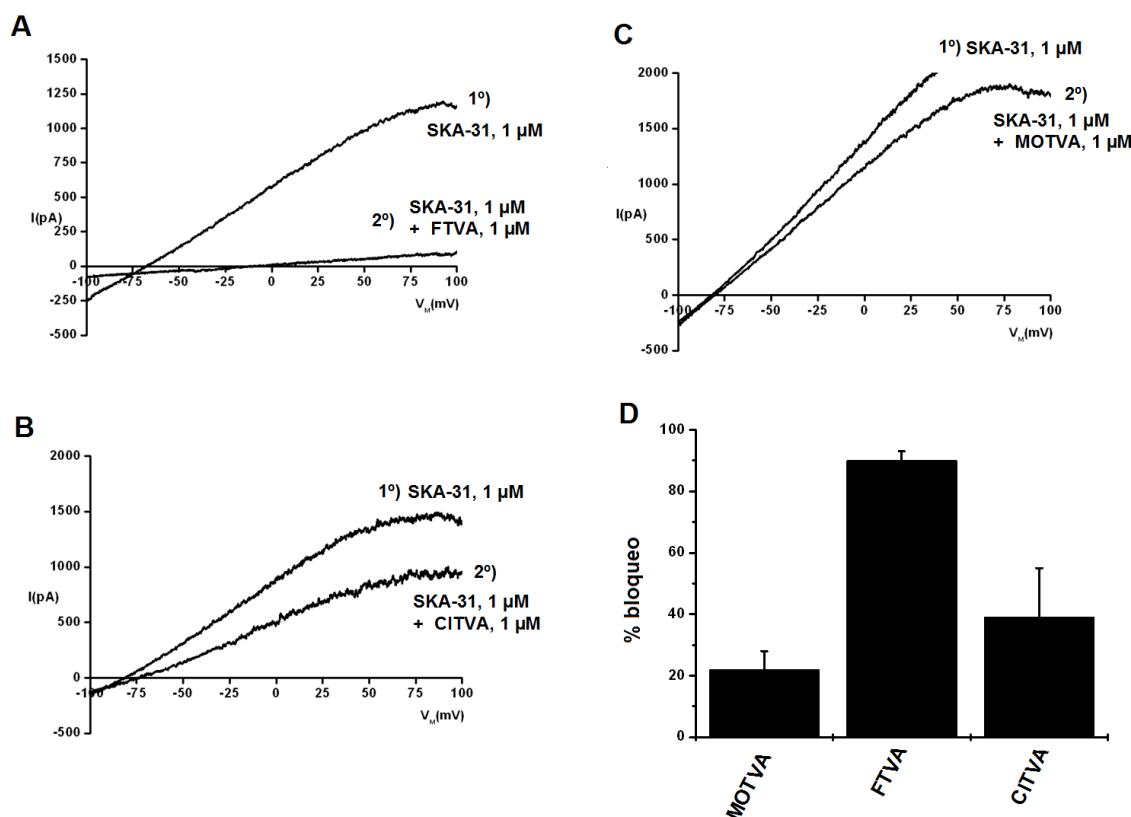


Figura 17: Grabaciones originales mostrando los efectos bloqueantes de los trivanilatos: A) inhibición de la corriente estimulada con SKA-31 con 1 μ M FTVA. B) con 1 μ M CITVA y C) con 1 μ M de MOTVA. Efectos bloqueantes débiles con CIVTA y MOTVA. D) Resumen estadístico del bloqueo por FTVA, CITVA, MOTVA. Los datos representan el promedio del bloqueo en porcentaje \pm el error estándar del promedio.

Puesto que, como ya se ha comentado, todas las moléculas activadoras o inhibidoras se encontraban en disolución en DMSO, y se adicionaban a la cámara de grabación siempre a una concentración de entre 0.1 y 0.5 % DMSO, se quiso comprobar que esa concentración de DMSO no tenía ningún tipo de efecto bloqueante o activador *per se* sobre los canales.

Para ello, se dejaron desarrollar corrientes preactivadas por calcio, y posteriormente se añadió DMSO diluido en la solución de NaCl hasta una concentración de 0.1 y 0.5 %. La figura 18 muestra como no hubo ningún cambio en las corrientes medidas tras la adición de DMSO. Los ensayos se repitieron en distintos días y posteriormente, con los otros tipos de canales evaluados, en todos los casos con idénticos resultados.

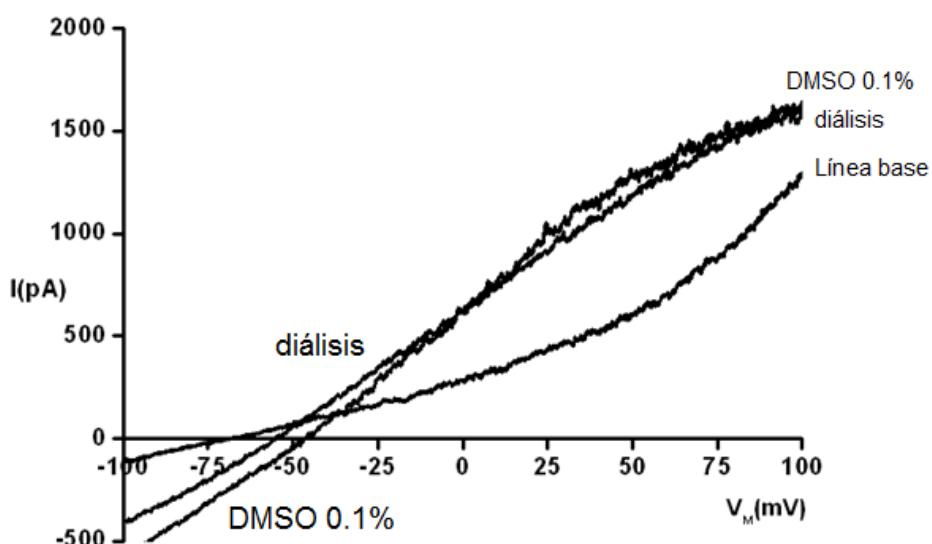


Figura 18: grabación original ejemplo de cómo la adición de DMSO (a concentraciones de 0.1 y 0.5 %) no modifica en modo alguno el desarrollo de las corrientes.

5.3. Elaboración de una relación Dosis Respuesta de FTVA.

En este caso se comprobó que la corriente que había sido preactivada por la dialización del Ca^{2+} de la solución de la pipeta, se podía inhibir con FTVA en concentraciones del rango nM. El bloqueo fue detectable a partir de concentraciones inferiores a 1 nM de FTVA, alcanzándose el bloqueo completo con una concentración de 1 μM (Figura 19 izquierda). A partir de estos datos obtenidos para series de 5 concentraciones crecientes de FTVA, se pudo realizar la curva de dosis-respuesta del efecto inhibitorio del compuesto para los canales KCa3.1, y calcular su EC₅₀, que resultó ser de 43 nM (Ver figura 19 derecha).

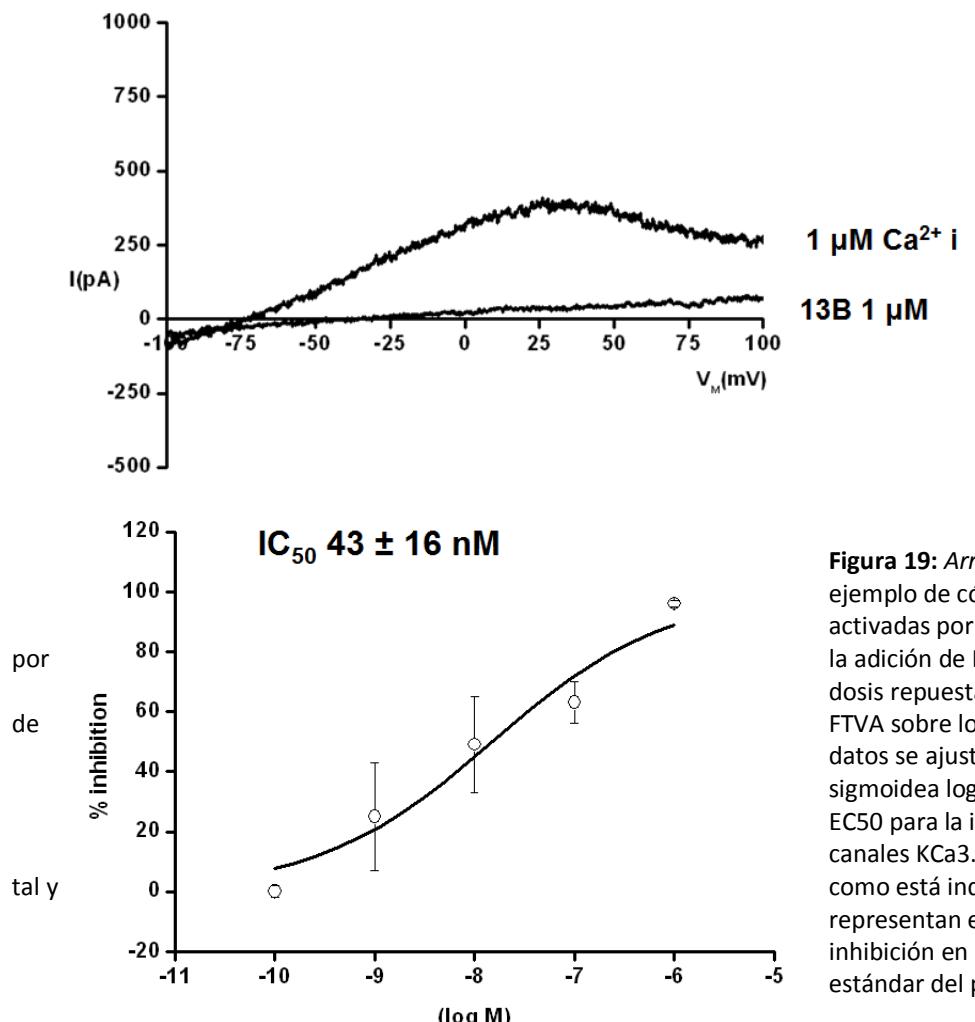


Figura 19: Arriba, grabación original ejemplo de cómo las corrientes activadas por Ca^{2+} son bloqueadas la adición de FTVA. Abajo, curva dosis respuesta del efecto inhibitorio FTVA sobre los canales KCa3.1. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea logística, y se calculó una EC₅₀ para la inhibición de los canales KCa3.1 por FTVA de 43 nM, como está indicado. Los datos representan el promedio de inhibición en porcentaje ± el error estándar del promedio.

5.4. Prueba de la eficacia de los trivanilatos como moduladores negativos de la actividad del canal, determinando su interacción al nivel de la proteína con el modulador positivo SKA-31.

Tal y como se ha explicado en los apartados anteriores, la corriente que se desarrollaba en la célula por la dialización del Ca^{2+} podía bloquearse con concentraciones bajas de FTVA de un modo significativo. En este nuevo ensayo se comprobó que ese bloqueo se podía antagonizar completamente con SKA-31 en una concentración 1 μM , al añadirse éste al sistema después del bloqueo producido por la adición de FTVA a concentraciones bajas. Se realizó el mismo experimento con concentraciones crecientes de FTVA inicial, y añadiendo siempre después SKA-31 1 μM (Figura 20).

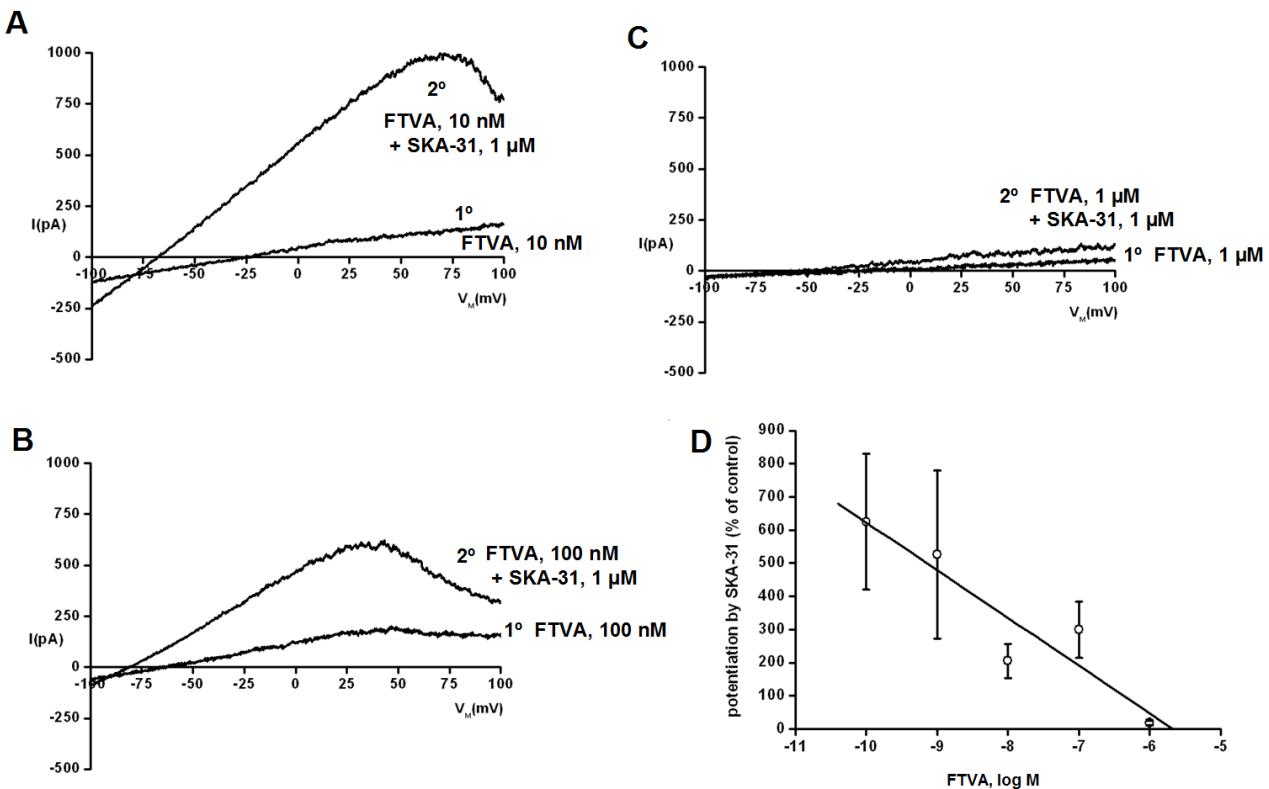


Figura 20: Grabaciones originales mostrando el efecto antagonizante de SKA-31 1 μ M sobre el bloqueo producido por FTVA de las corrientes preactivadas por calcio, a distintas concentraciones de FTVA: A) sobre FTVA 10 nM, B) sobre FTVA 100 nM y C) sobre FTVA 1 μ M. D) La capacidad de SKA-31 para antagonizar el bloqueo de FTVA es inversamente proporcional a la concentración de FTVA. Los datos representan el promedio de antagonización, de activación por SKA-31, en porcentaje \pm el error estándar del promedio. El ajuste se ha hecho con una formula lineal estándar.

A concentraciones pequeñas de FTVA, hasta el orden de 10 nM (figura 20 A), el efecto antagonizante de SKA-31 1 μ M es total, lográndose porcentajes de activación de la curva aún mayores que los observados en la caracterización de SKA-31 como activador (Ver figura 15). Si embargo, a concentraciones mayores de FTVA, de 100 nM (figura 20 B), y teniendo por tanto un bloqueo más potente, dicho bloqueo ya no se podía antagonizar de un modo tan fuerte, y el porcentaje de activación por la adición de SKA-31 se hacía menor. A una concentración de FTVA 1 μ M (figura 20 C) el antagonismo de SKA-31 era ya muy leve, inefectivo.

De un modo adicional se quiso comprobar que el efecto bloqueante de FTVA era independiente de la concentración de Calcio y el buffering con EGTA, es decir, que no ejercía su efecto mediando un secuestro del Calcio libre. Para comprobar este punto, se repitieron

los ensayos anteriores poniendo en la micropipeta una solución de KCl idéntica a la habitual, exceptuando que en esta ocasión la concentración de Calcio libre fue muy superior, de 0.1 mM. Tal y como se esperaba, los resultados de todos los experimentos realizados bajo ambas condiciones fueron equivalentes (figura 21), confirmando que el mecanismo por el que FTVA realizaba su efecto bloqueante no implicaba el secuestro de calcio .

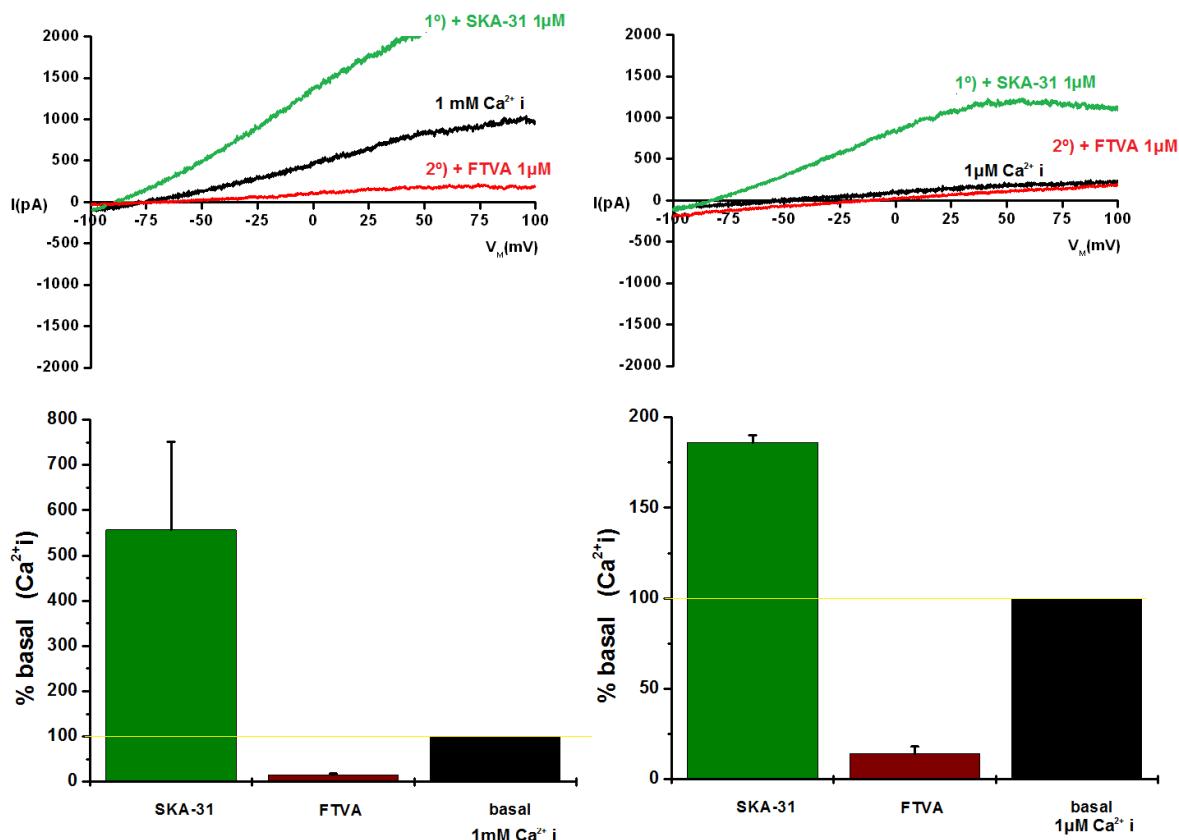


Figura 21: Comparación del mismo protocolo experimental variando exclusivamente la concentración de calcio libre presente en la solución de KCl de la micropipeta. A la izquierda, ensayos con una concentración libre de calcio de 1 mM; a la derecha, ensayos con una concentración libre de calcio de 1 μ M.
Izquierda arriba, grabación original que muestra una gran preactivación de la corriente de KCa3.1 por la perfusión del calcio de la pipeta al interior de la célula, seguida por la activación de la corriente que se produce por la adición de SKA-31, y el bloqueo prácticamente total de dicha corriente en presencia del bloqueador FTVA. *Izquierda abajo*, diagrama de barras que recoge, para $n = 8$ experimentos, los datos promedio y los errores estándar de la activación o el bloqueo de las corrientes expresados como porcentaje de la corriente basal producida por la diálisis del calcio. *Derecha arriba*, grabación original que muestra la pequeña preactivación de la corriente de KCa3.1 por la perfusión del calcio de la pipeta al interior de la célula, seguida por la activación de la corriente por la adición de SKA-31, y el bloqueo prácticamente total en presencia del bloqueador FTVA. *Derecha abajo*, diagrama de barras que recoge, para $n = 5$ experimentos, los datos promedio y los errores estándar de la activación o el bloqueo de las corrientes expresados como porcentaje de la corriente basal producida por la diálisis del calcio.

5.5. Caracterización de la selectividad de FTVA sobre otros canales relacionados, KCa2.3 y KCa1.1

Para medir efectos bloqueantes de FTVA en canales estrechamente relacionados, con casi la misma estructura y misma regulación por calcio/calmodulina se realizaron experimentos con canales KCa2.3 humanos sobreexpresados en la línea celular COS7 (una línea de fibroblastos de tejido renal de simio).

En este caso los experimentos patch-clamp se llevaron a cabo en presencia de TRAM-34 (1 μM) para eliminar interferencias de corrientes mediadas por canales KCa3.1 que pudieran estar presentes en menor concentración en estas células con características de fibroblastos. Bajo estas condiciones, la diálisis de la célula con la solución de la pipeta conteniendo 1 μM Calcio libre producía una corriente KCa2.3 de forma similar a las corrientes medidas por canales KCa3.1 en las células 3T3-L1 (Figura 23). Entonces se pudo observar como FTVA bloqueaba la corriente mediada por KCa2.3 con concentraciones desde 0.1 nM, y con una concentración de 100 nM el bloqueo era ya máximo. Realizando estos ensayos para 7 concentraciones crecientes de FTVA se pudo realizar la curva de dosis-respuesta de la eficacia inhibidora de FTVA en los canales KCa2.3, y calcularse su EC₅₀, que resultó ser de 85 pM (figura 22).

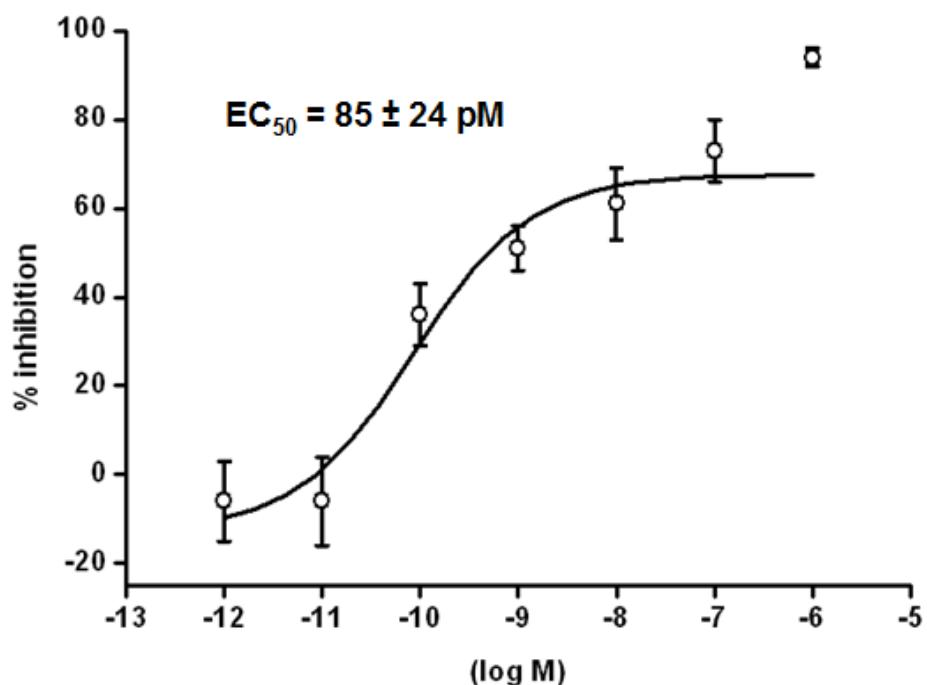


Figura 22: curva dosis respuesta del efecto inhibitorio de FTVA sobre los canales KCa3.2. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidal logística, y se calculó una EC₅₀ para la inhibición de los canales KCa3.2 por FTVA de 85 nM, tal y como está indicado. Los datos representan el promedio de inhibición en porcentaje ± el error estándar del promedio.

De un modo similar al efecto recuperador de SKA-31 sobre el bloqueo por FTVA en los canales KCa3.1, también en estos canales SKA-31 podía antagonizar el efecto de FTVA (Figura 23), y lo hacía incluso a concentraciones de FTVA elevadas (del orden de 100 nM). Este comportamiento se observó en un número de ensayos mayor de 10, pero con una variabilidad bastante elevada de porcentajes de antagonización, por lo que no se intentó establecer una relación lineal como en el caso de los canales KCa3.1.

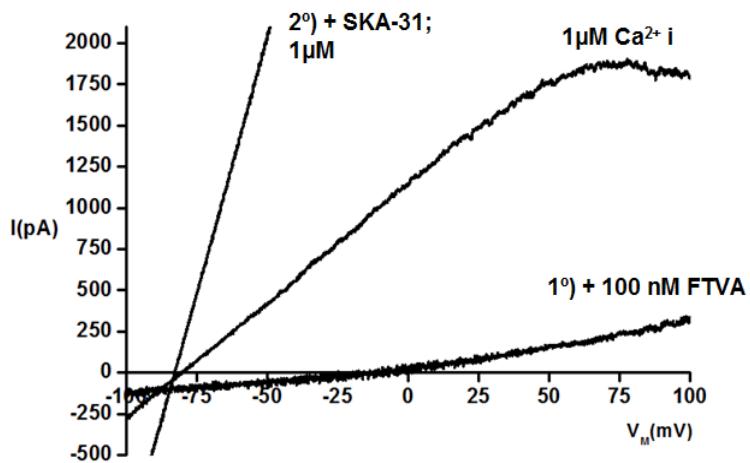


Figura 23: grabación original que muestra una gran preactivación por diálisis de calcio, que podía ser fácilmente bloqueada con FTVA, y posteriormente antagonizada con SKA-31. Notar que las corrientes alcanzan valores muy elevados, esto es razonable debido a la sobreexpresión de los canales KCa2.3 en estas células.

Los Canales KCa1.1 identificados en fibroblastos nativos de pacientes con la enfermedad de Fabry no resultaron sensibles a FTVA y tampoco a SKA-31 como ya se ha descrito anteriormente (Sankaranarayanan et al. 2009) (figura 24, 25 y 26). Por el contrario, estos canales KCa1.1, dependientes de Voltaje (más activos a potenciales positivos ;) se podían activar con un acido omega-3, el ácido docosahexaenocico, DHA, de un modo similar a como ya se había descrito previamente por otros autores (Wang et al. 2011), y podían ser bloqueados con Pimozida (Figura 27), confirmando así resultados previos (Lee et al. 1997).

Estas conclusiones se obtuvieron a partir de un total de 21 experimentos, de los cuales, solo en un caso se observó respuesta a SKA-31 y FTVA. En los 21 casos se observó respuesta a DHA y Pimozida

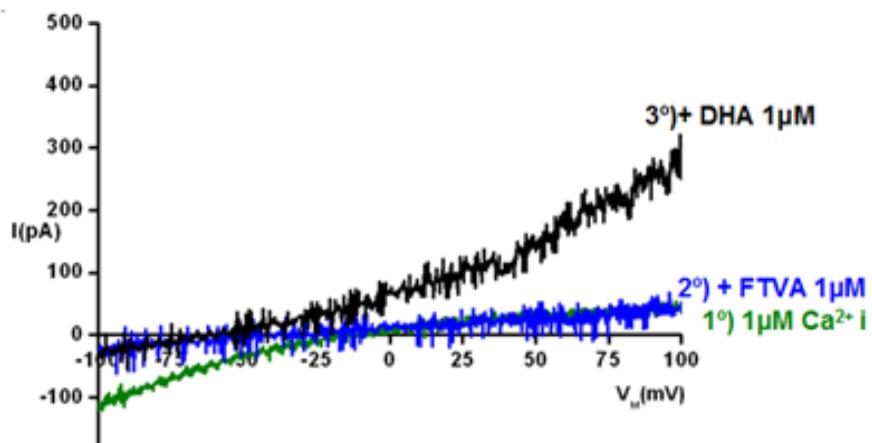


Figura 24: grabación original, ejemplo de cómo la adición de FTVA no produce efecto alguno sobre las corrientes de los canales KCa1.1, y de cómo la adición de DHA sí tiene un efecto activador en dichos canales.

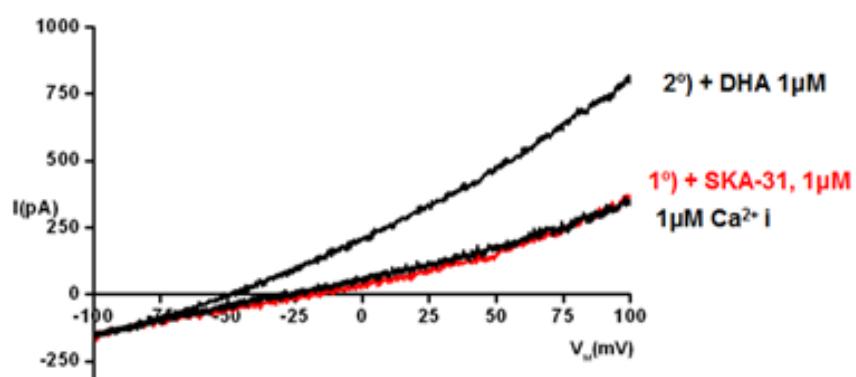


Figura 25: grabación original que da ejemplo de la insensibilidad de los canales KCa1.1 a la adición de SKA-31, en contraste con la activación que en ellos produce la adición de DHA.

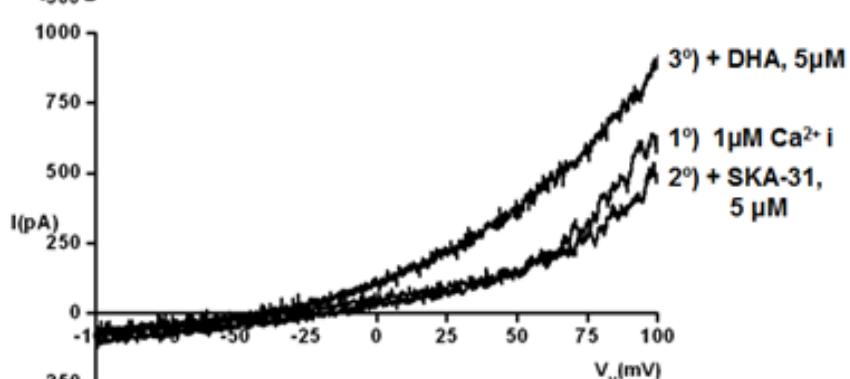


Figura 26: grabación original de la adición de SKA-31 a concentraciones superiores, que sigue sin producir efecto sobre los canales KCa1.1.

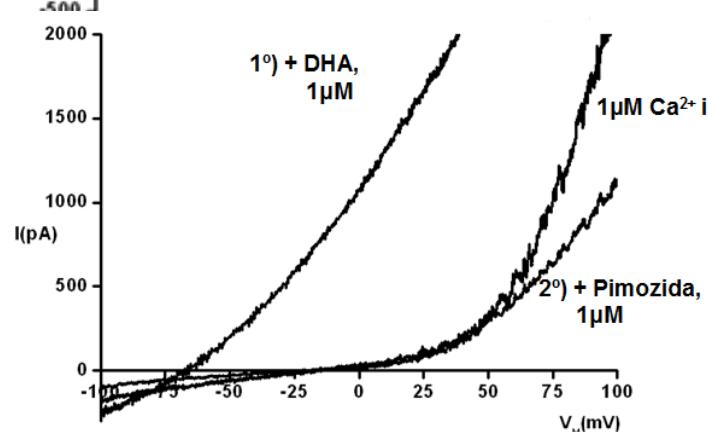


Figura 27: grabación original que muestra la activación de los canales KCa1.1 tras la adición de DHA, y la posibilidad de bloquear esta corriente desarrollada al añadir Pimozida.

También se realizaron ensayos añadiendo FTVA tras la activación de los canales KCa1.1 con DHA, comprobándose que las corrientes se mantenían inalteradas y que tampoco en esta ocasión FTVA tenía efecto alguno sobre los canales KCa1.1. (Figura 28)

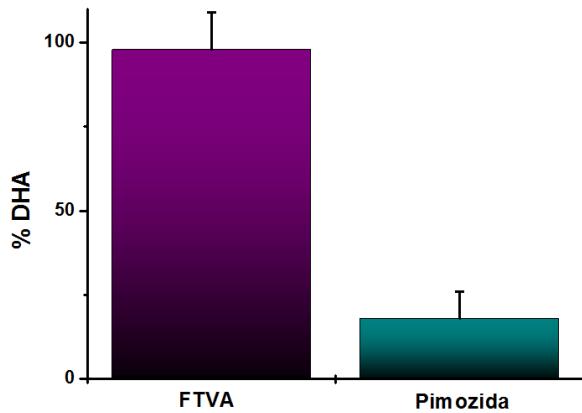


Figura 28: Porcentaje de la corriente desarrollada por la adición de DHA que permanece tras la adición de FTVA (izquierda) y tras la adición de Pimoziда (derecha). FTVA no es capaz de bloquear la corriente desarrollada por los KCa1.1 tras la adición de DHA (permanece un 98%), mientras que Pimoziда la inhibe casi completamente (solo permanece el 18% de la corriente).

6. Discusión.

Este trabajo fin de master ha tratado de identificar un bloqueador de los canales KCa3.1 que sea una pequeña molécula, estructuralmente diferente a las ya catalogadas, y con un mecanismo de inhibición del canal también diferente.

El estudio se ha llevado a cabo en fibroblastos 3T3-L1, de los que ya se conocía previamente su expresión de canales KCa3.1 (Zhang et al. 2012).

Los esfuerzos han sido exitosos, ya que los resultados electrofisiológicos y farmacológicos de este estudio proporcionan evidencias de que el ácido trivanílico FTVA, con diferente estructura química que los compuestos de trarilmelano establecidos (Wulff et al. 2007), tiene una elevada potencia bloqueadora, con una EC₅₀ en el rango nM bajo (43 nM).

Los compuestos de estructura similar, CITVA y MOTVA, que se diferencian por la sustitución de F por Cl o un grupo metilo en los tres residuos vanilato de la molécula, han mostrado nula o poca actividad inhibitoria en el rango nanomolar o micromolar bajo, sugiriendo que los átomos de F son claves para la interacción óptima con el canal. No obstante, no podemos

negar la posibilidad de que CITVA y MOTVA tengan una inferior actividad inhibidora a la de FTVA, simplemente debido a su mayor lipofilicidad y su escasa solubilidad, que son una razón alternativa para su menor efecto inhibidor sobre el canal.

Estos hallazgos procedentes de experimentos whole-cell patch-clamp han sido también confirmados con experimentos a nivel celular con canales KCa3.1 humanos clonados, realizando ensayos patch-clamp en el modo inside-out con células HEK-293 sobreexpresando el canal hKCa3.1 (datos fuera del proyecto, que no han sido presentados aquí), que han permitido comprobar que el efecto inhibidor de FTVA está relacionado con un efecto del propio canal, y no con otros procesos desconocidos, como que FTVA produjera un daño en la membrana o interfiriera la regulación por factores citosólicos.

La potencia bloqueadora de FTVA es alta, similar a la de los triarilmétanos, con potencias en el rango de 5-60 nM, pero con importantes diferencias entre estas dos clases de compuestos. De hecho, el modo de inhibición del canal de FTVA y su presunto centro de unión difieren claramente de los del bloqueador establecido, el triarilmétano TRAM-34 (Wulff et al. 2001). Esto ha quedado en evidencia con la observación de que la acción inhibidora de FTVA, pero no la de TRAM-34, era antagonizada por el activador de KCa3.1/KCa2.3 SKA-31, sugiriendo que FTVA tenga el mismo centro de unión que SKA-31, y diferente al centro de unión de TRAM-34.

Por otra parte, el antagonismo llevado a cabo por SKA-31 fue elevado a bajas concentraciones de FTVA, en el rango nanomolar, y débil a una concentración micromolar de FTVA, lo que sugiere una mayor afinidad de FTVA que de SKA-31 por el canal.

A día de hoy, los centros de unión de los moduladores característicos (TRAM-34 y SKA-31), así como el de FTVA, no han sido aún establecidos. Sin embargo, de acuerdo con los modelos informáticos de la estructura del canal KCa3.1, se ha supuesto que TRAM-34 penetra en la cavidad del canal a través del filtro de selectividad, produciendo su efecto bloqueador interfiriendo directamente con la conductividad iónica.

El centro de unión de SKA-31 no se ha caracterizado hasta ahora, pero es probable que SKA-31 active el canal utilizando un centro de unión distinto y, presumiblemente, interfiriendo con el extremo carboxi-terminal o en la proximidad del centro de unión a calmodulina, y por

lo tanto activando el canal mediante el fomento de la apertura del canal y el gating dependientes de calmodulina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen mostrar que FTVA actuaría usando también este centro de unión, o produciendo una interferencia aún desconocida con la regulación de la activación del canal dependiente de Ca^{2+} -calmodulina, necesaria también para la acción de SKA-31. Sin embargo, la caracterización de los centros de unión bien definidos requieren estudios adicionales utilizando mutagénesis dirigida y / o cristalograffía para la identificación de la verdadera estructura; estudios que están más allá del alcance de este proyecto.

De cualquier manera, el conjunto de datos obtenido sugiere fuertemente que el centro de unión está en, o cercano a, el extremo carboxi-terminal. Esta hipótesis se ve apoyada por el perfil de selectividad tan similar que FTVA y SKA-31 tienen para los canales KCa3.1 y KCa2.3, en comparación con la alta selectividad de TRAM-34 para KCa3.1 (Wulff et al. 2000), tal y como se discute con más detalle a continuación.

Basándonos en los datos actuales, es probable que FTVA represente un nuevo tipo de modulador negativo del “gating” a nivel de la regulación por Ca^{2+} /calmodulina. Hasta ahora no se ha identificado ningún modulador de este tipo, y su hallazgo podría resultar de gran utilidad como herramienta para estudiar las funciones de los canales KCa3.1/2.X bajo las condiciones de inactivación del canal. El bloqueo del gating de los canales por FTVA puede arrojar nueva luz sobre las funciones fisiológicas o fisiopatológicas de estos canales.

Con respecto a la selectividad de FTVA para el canal KCa3.1, en este proyecto también se ha investigado su efecto bloqueador sobre canales KCa2.3 humanos sobreexpresados en el sistema COS7. Teniendo en cuenta la posibilidad de que FTVA comparta centro de unión con SKA-31, y habiéndose demostrado que SKA-31 también activa los canales hKCa2.3, aunque con potencias más bajas si se comparan con los efectos en KCa3.1, se esperaba el bloqueo con FTVA de este canal tan estrechamente relacionado. Los resultados obtenidos han confirmado esa expectativa, pues se ha encontrado que FTVA bloquea los canales KCa2.3, y lo hace de un modo similar y sorprendentemente, con incluso mucho mayor potencia (EC50 85 nM) que si se compara con la EC50 de 43 nM de FTVA para KCa3.1. En la misma línea, se ha encontrado que SKA-31 antagoniza este efecto de bloqueo en una medida similar o

incluso mayor, a la observada para el canal KCa3.1. Estos datos indican que FTVA no puede considerarse como un modulador negativo del gating exclusivamente para KCa3.1 sino para ambos KCa3.1 y KCa2.3, con una potencia mayor ($\approx 500x$) en KCa2.3.

En contraste con lo observado en los canales KCa3.1/2.3, FTVA no ha mostrado efectos bloqueantes sobre los canales KCa1.1, regulados por voltaje, relacionados de un modo muy lejano y con una estructura muy diferente, en las pruebas que se han realizado sobre fibroblastos humanos de pacientes de enfermedad de Fabry. Estos canales, como ya se ha comentado en anteriores apartados, tienen un mecanismo completamente diferente de sensibilidad al calcio, mediado por la unión de éste a los denominados “Ca²⁺ bowl” situados en los extremos carboxi-terminales del canal, tal y como se ilustra en la Figura 5. Esto era de esperar también, ya que los canales KCa1.1 son insensibles a SKA-31 (Sankaranarayanan et al. 2009). Además, se observó que los KCa1.1 eran activados por el ácido graso omega-3 DHA (Wang et al. 2011) y se mostraban sensibles a la pimozida, un medicamento anti-psicótico (Lee et al. 1997) comprobando aspectos farmacológicos de este canal en estos fibroblastos de pacientes. FTVA no tiene efectos tampoco sobre esta activación con DHA, o bloqueo con pimozida.

Otros ensayos del grupo han encontrado que los canales Kv no regulados por calcio y regulados por voltaje, que están expresados constitutivamente en células HEK-293 son igualmente insensibles a FTVA (datos no realizados en este proyecto y no mostrados).

Tomando todos los datos en su conjunto, este perfil de selectividad sugiere que FTVA es un bloqueador selectivo de los canales KCa3.1/KCa2.X de la familia de canales de potasio regulados por calcio/calmodulina, sin efecto aparente sobre los canales Kv o KCa1.1.

7. Conclusiones y perspectivas.

Los canales KCa3.1/KCa2.X juegan papeles fisiológicos y patofisiológicos en una gran variedad de tejidos y órganos, si bien no debemos olvidar que todas sus funciones no son aún conocidas.

En base a esto, el compuesto FTVA podría ser de gran utilidad para estudiar y manipular los canales KCa3.1 / KCa2.X en condiciones fisiológicas y en estados de enfermedad. Por ejemplo, FTVA podría ser una herramienta farmacológica (o incluso una posible molécula terapéutica) para estudiar el papel patofisiológico de KCa3.1 en casos de proliferación anormal de células de la musculatura lisa, fibroblastos o macrófagos durante procesos de restenosis después de intervenciones angioplásticas (Köhler et al. 2003) o durante procesos de arteriosclerosis (Toyama et al. 2008). FTVA podría ser útil también para inhibir canales KCa3.1 y KCa2.X en macrófagos y de este modo impedir su migración y activación que daña las neuronas después de ictus o isquemia cerebrovascular (Chen et al. 2011). Además, una inhibición de KCa3.1 y KCa2.3 en la barrera hematoencefálica después de un trauma podría ser útil para reducir el flujo de K^+ y agua hacia el interior del cerebro y así poder impedir o reducir la formación de edema cerebral, como ya se ha sugerido anteriormente (Mauler et al. 2004). También es conocido que los canales KCa3.1 y KCa2.X son importantes para la explosión oxidativa (“oxidative burst”) de microglia activada, y una inhibición de los canales posiblemente fuera útil para impedir una actividad excesiva de la microglia, que va en detrimento de las neuronas.

En conclusión, FTVA podría ser un buen neuroprotector durante procesos de neuroinflamación (Kaushal et al. 2007; Schlichter et al. 2010; Bouhy et al. 2011).

8. Referencias

Abdullaev, I. F., A. Rudkouskaya, et al. (2010). "Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation." PLoS One 5(8): e12304.

Ataga, K. I., M. Reid, et al. (2011). "Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the Gardos channel blocker senicapoc (ICA-17043)." Br J Haematol 153(1): 92-104.

Begenisich, T., T. Nakamoto, et al. (2004). "Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4." J Biol Chem 279(46): 47681-47687.

Bouhy, D., N. Ghasemlou, et al. (2011). "Inhibition of the Ca²⁺-Dependent K⁺ Channel, KCNN4/KCa3.1, Improves Tissue Protection and Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury." J Neurosci 31(45): 16298-16308.

Chen, Y. J., G. Raman, et al. (2011). "The KCa3.1 blocker TRAM-34 reduces infarction and neurological deficit in a rat model of ischemia/reperfusion stroke." J Cereb Blood Flow Metab 31(12): 2363-2374.

Devor, D. C., A. K. Singh, et al. (1996). "Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K⁺ channel." Am J Physiol 271(5 Pt 1): L775-784.

Grgic, I., I. Eichler, et al. (2005). "Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(4): 704-709.

Grgic, I., B. P. Kaistha, et al. (2009). "Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery." Br J Pharmacol 157(4): 509-526.

Grgic, I., B. P. Kaistha, et al. (2009). "Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly." Pflugers Arch 458(2): 291-302.

Ishii, T. M., C. Silvia, et al. (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A 94(21): 11651-11656.

Kaushal, V., P. D. Koeberle, et al. (2007). "The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration." J Neurosci 27(1): 234-244.

Köhler, R. (2010). "Single-nucleotide polymorphisms in vascular Ca²⁺-activated K⁺-channel genes and cardiovascular disease." Pflugers Arch 460(2): 343-351.

Köhler, R., C. Degenhardt, et al. (2000). "Expression and function of endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ." Circ Res 87(6): 496-503.

Köhler, R. and P. Ruth (2010). "Endothelial dysfunction and blood pressure alterations in K⁺-channel transgenic mice." Pflugers Arch 459(6): 969-976.

Köhler, R., H. Wulff, et al. (2003). "Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis." Circulation 108(9): 1119-1125.

Lamoral-Theys, D., N. Wauthoz, et al. (2011). "Trivanillic polyphenols with anticancer cytostatic effects through the targeting of multiple kinases and intracellular Ca(2+) release." J Cell Mol Med.

Lee, K., F. McKenna, et al. (1997). "The effects of neuroleptic and tricyclic compounds on BKCa channel activity in rat isolated cortical neurones." Br J Pharmacol 121(8): 1810-1816.

Mauler, F., V. Hinz, et al. (2004). "Selective intermediate-/small-conductance calcium-activated potassium channel (KCNN4) blockers are potent and effective therapeutics in experimental brain oedema and traumatic brain injury caused by acute subdural haematoma." Eur J Neurosci 20(7): 1761-1768.

Sankaranarayanan, A., G. Raman, et al. (2009). "Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa2 and KCa3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure." Mol Pharmacol 75(2): 281-295.

Schilling, T. and C. Eder (2007). "TRAM-34 inhibits nonselective cation channels." Pflugers Arch 454(4): 559-563.

Schlichter, L. C., V. Kaushal, et al. (2010). "The Ca²⁺ activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro." J Neuroinflammation 7: 4.

Singh, S., C. A. Syme, et al. (2001). "Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease." J Pharmacol Exp Ther 296(2): 600-611.

Strobaek, D., L. Teuber, et al. (2004). "Activation of human IK and SK Ca²⁺ -activated K+ channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime)." Biochim Biophys Acta 1665(1-2): 1-5.

Toyama, K., H. Wulff, et al. (2008). "The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherosclerosis in mice and humans." J Clin Invest.

Wang, R. X., Q. Chai, et al. (2011). "Activation of vascular BK channels by docosahexaenoic acid is dependent on cytochrome P450 epoxygenase activity." Cardiovasc Res 90(2): 344-352.

Wei, A. D., G. A. Gutman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels." Pharmacol Rev 57(4): 463-472.

Wulff, H. and N. A. Castle (2010). "Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends." Expert Rev Clin Pharmacol 3(3): 385-396.

Wulff, H., G. A. Gutman, et al. (2001). "Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1." J Biol Chem 276(34): 32040-32045.

Wulff, H., A. Kolski-Andreaco, et al. (2007). "Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications." Curr Med Chem 14(13): 1437-1457.

Wulff, H., M. J. Miller, et al. (2000). "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant." Proc Natl Acad Sci U S A 97(14): 8151-8156.

Zhang, X. H., Y. Y. Zhang, et al. (2012). "Functional ion channels and cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes." J Cell Physiol 227(5): 1972-1979.

Agradecimientos

... a Dr. José Miguel Arbonés-Mainar (UIT del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Instituto Carlos III), que nos ha facilitado los fibroblastos 3T3-L1

... a Javier Gervás y Dra. MªPilar Giraldo (UIT Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza), que nos han facilitado los fibroblastos de pacientes de enfermedad de Fabry

... a la Dra. Heike Wulff (Farmacology University of California, Davis, EEUU), que nos ha facilitado las células COS-7, con la sobreexpresión del canal KCa2.3 humano,

... a la Dra. Delphine Lamoral-Theys y el Dr. Robert Kiss (Labroatorie de Chimie Analytique, Toxicologie et Chimie Physique Appliquée, Université Libre de Bruxelas), que nos han facilitado los tres compuestos objeto de nuestro estudio: fluorotrvanilato, clorotrvanilato y metoxitrvanilato.

... a mi director de proyecto, el Dr. Ralf Köhler, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y con una técnica tan atractiva como lo ha sido esta

... a mis padres y a mi novio, para los que no existen palabras de suficiente agradecimiento