

## EN BUSQUEDA DE NUEVOS FARMACOS ANTIPARASITARIOS

Dr. Juan Bernal Martínez/Profesor Investigador/Depto. de Medicina/Centro Biomédico/Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas/Universidad Autónoma de Aguascalientes

### PROYECTO DE INVESTIGACION:

PIBB-92-2: Estudio de las propiedades fisiológicas y farmacológicas del canal de calcio presente en protozoarios de vida silvestre y en protozoarios invasivos del ser humano.

### IDEAS QUE DEBEN DESTACARSE:

1.- Existe un incremento en la incidencia de enfermedades parasitarias que afectan al ser humano.

2.- Muchos de los fármacos comúnmente usados como drogas antiparasitarias ya no son efectivos para controlar la infestación por parásitos.

3.- Se requiere de nuevos fármacos que sean eficientes para el tratamiento de las parasitosis humanas y de los cuales se pueda conocer su mecanismo de acción a nivel celular y subcelular.

4.- En este trabajo se describe cómo nuevos fármacos con posible acción antiparasitaria regulan la permeabilidad iónica al calcio de membranas celulares de protozoarios.

### TRABAJOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON ESTE ARTICULO:

1.- Barry, S. and Bernal, J. Antimalarial drugs modulate calcium currents in *Paramecium*. *J. Gen. Comp. Physiol.* 1993; 172, 457-466.

2.- Bernal, J. Calvillo, M. y García, E. El antiparasitario gossypol modula la permeabilidad de calcio en *Paramecium*. *Arch. del ISEA*, 1993, Vol. III, No. 12; 613-622.

3.- Bernal J. Citotoxicity of gossypol in *Paramecium* is mediated by an increase of calcium permeability. Enviado a la revista *Toxicology Letters*.

### ANTECEDENTES:

1.- Recientemente se ha observado un incremento en la incidencia de enfermedades parasitarias invasivas del ser humano. La resistencia que presentan distintos parásitos a las drogas utilizadas en los esquemas convencionales de tratamiento, así como la presencia de zonas endémicas de contagio en grandes regiones de países del tercer mundo, son factores aceptados por la Organización Mundial de la Salud para explicar el por qué nuevamente estas plagas afectan a la humanidad.<sup>1</sup>

2.- Más aún, estudios epidemiológicos sugieren que la incidencia de enfermedades parasitarias en el ser humano se ha visto incrementada, debido a la presencia de procesos patológicos que deprimen el sistema inmunológico en el hombre, como es el caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).<sup>2</sup>

3.- Los pacientes infestados con parasitosis presentan diversas respuestas al tratamiento farmacológico convencional, dando como resultado que la terapia antiparasitaria sea controversial. Lo anterior implica que es necesario buscar distintas alternativas terapéuticas antiparasitarias, de las cuales se puede conocer el mecanismo de acción a nivel celular y subcelular.

4.- El mecanismo de acción de las drogas antimalaria tales como quinina, quinacrina, cloroquina, primaquina y mefloquina aún no se entiende completamente. Estas drogas comparten similitudes de estructura química con compuestos que inhiben las corrientes iónicas en protozoarios, como es el caso del compuesto W-7.

5.- El W-7 [N-(6-aminohexi)-5-cloro-1-naftalen-sulfonamida], es un compuesto que inhibe la conducta de nado hacia atrás dependiente de calcio y las corrientes de calcio en *Paramecium caudatum* y *Paramecium tetraurelia*, sin afectar las corrientes de calcio en células nerviosas y musculares de vertebrados.<sup>3,4</sup>

6.- Además de su acción como contraceptivo en varones<sup>5,6</sup>, el gossypol es un compuesto que a concentraciones en el rango nanomolar modifica la actividad enzimática y reduce marcadamente la tasa de crecimiento del *Trypanozoma cruzi*<sup>7</sup>; *Entamoeba histolytica*<sup>8</sup> y del *Plasmodium falciparum*<sup>9</sup> y tiene una acción antiviral contra el virus HIV<sup>10</sup>. El mecanismo de acción de este compuesto a nivel celular y subcelular aún no está bien conocido.

7.- Considerando que muchos protozoarios invasivos del ser humano presentan distintas dificultades técnicas en cuanto al estudio de sus propiedades bioeléctricas de membrana, en este trabajo se decidió estudiar al ciliado *Paramecium* como modelo experimental. Del *Paramecium* se conocen sus propiedades conductuales, bioeléctricas, de modulación metabólica de permeabilidades iónicas, así como los efectos celulares y subcelulares de distintos compuestos farmacológicos<sup>3,4,11,12,13,14,15,16,17</sup>.

8.- Partiendo de la premisa de que existe la posibilidad de que distintos parásitos del *phylum protozoa* pueden compartir propiedades de membrana, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencia experimental de cómo nuevas drogas antiparasitarias pueden actuar a nivel celular y subcelular en protozoarios.

**OBJETIVO:**

Realizar experimentos conductuales y electrofisiológicos en el protozoario *Paramecium calkinsi* para estudiar la acción del gossypol y algunas drogas antimalaria sobre la permeabilidad iónica de membrana de este protozoario.

**MATERIAL Y METODOS:**

*Preparación biológica:*

La preparación utilizada en el presente trabajo fue el ciliado marino *Paramecium calkinsi*. Este protozoario fue mantenido en un medio de cultivo artificial de agua de mar al 25% y alimentado con *Enterobacter aerogenes* 24 hrs. antes de ser utilizado para los experimentos<sup>15,16</sup>.

**SOLUCIONES:**

I).- Solución de agua artificial de mar para cultivo del *Paramecium*: Stigmasterol, 5.0 mg/l; Caseaminoácidos, 0.3 gr/l; NaCl, 125 mM; Citrato de Sodio, 1 mM; KCl, 10mM; CaCl<sub>2</sub>, 5 mM; MOPS, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; pH 7.3

II).- Soluciones usadas en los experimentos conductuales:  
a) Solución normal o "de reposo": (en mM) NaCl, 125; CaCl<sub>2</sub>, 1; MOPS, 5. El pH se ajustó a un valor de 7.3.  
b) Solución de alto potasio o "de prueba": (en mM): NaCl, 62.5; KCl, 62.5; CaCl<sub>2</sub>, 1; MOPS, 5. El pH se ajustó a un valor de 7.3.

III).- Solución de prueba con O-Na; O-K conteniendo bloqueadores de canales de potasio (en mM): TEA-Cl, 125, CsCl, 5; 4-AP, 5; 3,4-diaminopiridina, 5; CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mM and MOPS, 10; pH 7.3

IV).- Solución extracelular usada en los experimentos electrofisiológicos (en mM): TEA-Cl, 125; CsCl, 5; 4-AP, 5; CaCl<sub>2</sub>, 15; MOPS, 5; pH 7.3.

**Protocolo desarrollado en los experimentos conductuales de *Paramecium***

Cuando el *Paramecium* está en su medio normal, al encontrarse con alguna barrera mecánica, percibir algún estímulo químico o eléctrico, etc., presenta la conducta de huida o de nado hacia atrás. La duración de nado hacia atrás del *Paramecium* en condiciones normales es de 1-3 segundos<sup>12</sup>. Para propósitos experimentales, dicha duración resulta ser un periodo muy corto para evaluarse en forma objetiva y sistemática. Es por lo anterior que en el presente trabajo se incrementó experimentalmente la duración de nado hacia atrás del ciliado, al depositar a la célula en un medio

conteniendo alto potasio (ver solución de prueba, en el apartado de soluciones). En estas condiciones experimentales, la duración de la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium calkinsi* varía entre 100 y 150 segundos, tiempo al cual el *Paramecium* logra adaptarse al alto potasio y reinicia a nadar nuevamente hacia adelante<sup>4,12,16</sup>.

El *Paramecium* es el organismo más primitivo que presenta canales de calcio voltaje dependientes<sup>4,12,13,16</sup>. Estos canales están localizados fundamentalmente en la membrana de las centenas de cilios que cubren al protozoario<sup>12,18,19</sup>. Ha sido postulado que la activación de estos canales modula la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium*<sup>3,4,12,15,16,21</sup>. Más aún, se ha propuesto que existe correlación entre la duración de la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium* y la magnitud de la corriente entrante de calcio<sup>3,20</sup>.

En base a esto último, se puede postular que cualquier fenómeno o sustancia química que modifique la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium*, es una indicación indirecta de la modificación de los canales de calcio que dependen del voltaje de transmembrana presentes en el *Paramecium*. Durante el desarrollo de los experimentos presentados en este trabajo, los *Paramecium* fueron incubados (de 1-15 min.) en solución de reposo que contenía distintos compuestos de interés. Tales compuestos fueron aplicados a concentraciones similares en ambas cámaras, la de solución normal o "de reposo" y la que contenía solución de alto potasio o "de prueba".

**Registros electrofisiológicos en *Paramecium***

Para lograr la realización de experimentos de registro intracelular en el *Paramecium*, éste fue atrapado en un medio de agarosa siguiendo el procedimiento descrito previamente<sup>16</sup>. La cámara de registro que contenía a los *Paramecium* fue llenada con la solución extracelular y colocada en la platina de un microscopio invertido y se observó a una ganancia de 800X. Los experimentos electrofisiológicos de registro intracelular en el *Paramecium*, se realizaron en condiciones de fijación de corriente y fijación de voltaje en los cuales se monitorearon los potenciales de acción cálcicos (PACa<sub>2</sub><sup>+</sup>) y las corrientes entrantes de calcio (ICA<sub>2</sub><sup>+</sup>) en condiciones control y después de la administración de distintos compuestos. Se usó un preamplificador Dagan 8500 (Dagan Co., Minneapolis Mn). La aplicación de pulsos de corriente (tanto despolarizante como hiperpolarizante). La adquisición de datos y el análisis de los potenciales de acción, se llevó a cabo usando una computadora AT (Gateway 200), acoplada a un convertidor analógico Digital (Axon instruments) con la ayuda del programa Pclamp (Axon instruments).

**RESULTADOS:**

**Efecto de las drogas Antimalaria y del W-7 sobre la Conducta de Nado y las Corrientes de Calcio del *Paramecium***

Las drogas antimalaria, tales como la quinacrina,

cloroquina, quinina, primaquina y mefloquina presentan varias similitudes de estructura con el compuesto W-7<sup>22</sup>. El W-7 es un compuesto que inhibe la conducta de nado hacia atrás dependiente de calcio y las corrientes de calcio en *Paramecium*<sup>3,4,15,16</sup>. Por lo tanto, nosotros probamos si las drogas antimalaria también inhiben el nado hacia atrás y las corrientes de calcio en *Paramecium*. Cuando el *Paramecium* es transferido al medio de alto potasio, éste se despolariza, abriéndose los canales de calcio presentes en la membrana ciliar y por consiguiente el ciliado marino nada hacia atrás. Al ser aplicados inhibidores de los canales de calcio, tales como el W-7 se observó una reducción en la duración de la conducta de nado hacia atrás. Similares resultados fueron encontrados cuando se probaron la quinacrina, mefloquina, quinina, cloroquina y primaquina. Todos estos compuestos redujeron la duración de la conducta de nado hacia atrás con diferente potencia (ver. Fig. 1). Estos efectos fueron encontrados tanto en soluciones de alto potasio conteniendo sodio y libres de éste, así como en las soluciones despolarizantes libres de sodio con bloqueadores de potasio. En esta última solución la cual contenía baja concentración de calcio, el nado hacia atrás del *Paramecium* fue inhibido en un 50% a concentraciones de 100 nM hasta 30 uM.

Los efectos de la quinacrina y del W-7 fueron probados directamente sobre las corrientes de calcio utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. En un medio con 15 uM de calcio, la quinacrina y el W-7 a concentración de 100 uM redujeron la corriente de calcio al pico en un 51 y un 42% respectivamente (ver. Fig. 2). Lo anterior sugiere que las drogas antimalaria reducen las corrientes de calcio en *Paramecium calkinsi*.

#### Efecto del Gossypol sobre la duración de la conducta de nado y sobre el potencial de acción del *Paramecium*

El gossypol es un compuesto que, a concentraciones en el rango nanomolar, ha mostrado ser efectivo para modificar la actividad enzimática de ciertas enzimas de parásitos y reducir marcadamente la tasa de crecimiento del *Tripaenozoma cruzi*<sup>7</sup> de *Entamoeba histolytica*<sup>8</sup> y del *Plasmodium falciparum*<sup>9</sup>. A pesar de lo anterior, el posible efecto del gossypol a nivel de membrana celular, para regular flujos iónicos, es aún desconocido. Por lo tanto, decidimos estudiar el papel del gossypol sobre la conducta de nado del *Paramecium*. Dicha conducta fue medida en condiciones control y cuando las células fueron incubadas de 1-15 min. a diferentes concentraciones de gossypol, se encontró que el gossypol incrementó la CNHA en un 57.5, 177, y 989.4% cuando las células fueron tratadas con gossypol a concentraciones de 0.1, 1 y 10 uM respectivamente, durante 5 minutos (ver. Fig. 3 tabla 1).

Los resultados obtenidos en los experimentos conductuales del *Paramecium* sugieren que el gossypol podría modular la permeabilidad iónica de membrana del ciliado pero no aportaron hechos experimentales concluyentes al respecto. Por lo tanto decidimos evaluar la acción del gossypol sobre la

permeabilidad iónica del canal de calcio que subyace al potencial de acción cálcico del *Paramecium*. Dicha señal eléctrica fue medida en condiciones control (durante 5 min., registrándose a una frecuencia de 15 hertz), y cuando se aplicó extracelularmente el gossypol (4 uM). Se encontró que el gossypol (4 uM) incrementó la duración del potencial de acción cálcico en un 159 + 13% D.E. n = 4 células. El incremento producido por gossypol se presentó al minuto de haberse perfundido la droga y se mantuvo después de 10 minutos (Fig. 4-A). El efecto reversible del gossypol fue observado después de 20 minutos de lavado. Cuando se trató a la célula con 4 uM de gossypol y 100 uM de W-7 (un bloqueador selectivo de canales de calcio) se observó una disminución total del incremento en la duración del potencial de acción cálcico inicialmente producido por el gossypol (ver. Fig. 4-B).

#### DISCUSION

1. El mecanismo de acción por medio del cual distintas drogas caracterizadas como antiparasitarias afectan a protozoarios es aún controversial.

2. En el presente trabajo nosotros hemos encontrado que el gossypol modula la conducta de nado hacia atrás (ver Fig. 3, tabla 1) y la duración del potencial de acción cálcico (ver figs. 4-A y 4-B). Contrario a lo anterior, las drogas antimalaria, en particular la quinacrina, inhibieron la conducta de nado y disminuyeron la magnitud de las corrientes de calcio en el ciliado marino *Paramecium calkinsi*.

3. Considerando que tanto la duración de la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium*, así como la duración del potencial cálcico y las corrientes de calcio de este ciliado, son mediciones indirectas de la activación del canal de calcio que dependen del voltaje, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, tanto el gossypol como las drogas antimalaria regulan la permeabilidad iónica al calcio de protozoarios.

4. Los canales de calcio que dependen del voltaje de transmembrana juegan un papel determinante en la regulación de distintos procesos celulares<sup>21,23,24</sup>. Por lo tanto es factible el suponer que cualquier substancia que afecte la función de dichos canales, repercutirá en las propiedades fundamentales de los seres vivos. Como fue el caso de los hallazgos experimentales obtenidos en este trabajo.

#### CONCLUSIONES

1. Los resultados experimentales presentados en este trabajo sugieren que tanto el gossypol como las drogas antimalaria modulan la permeabilidad de calcio en el *Paramecium*. El gossypol incrementa dicha permeabilidad, mientras que las drogas antimalaria y el compuesto W-7 la inhiben. Siendo ambos fenómenos críticos para la fisiología del protozooario *Paramecium*, existe la posibilidad de que éste sea el mecanismo por el cual el gossypol y las drogas antimalaria ejercen su acción antiparasitaria sobre distintas especies de protozoarios invasivas del ser humano.

2.- Para esclarecer con mayor objetividad el mecanismo de acción del gossypol y de las drogas antimalaria sobre la permeabilidad de calcio en protozoarios, se deberán realizar distintos experimentos tales como el análisis de corrientes unitarias a través de canales únicos de calcio, así como la evaluación de los niveles de calcio intracelular (usando colorantes sensibles al calcio).

**AGRADECIMIENTO**

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo que el CONACYT otorgó al Dr. Juan Bernal Martínez con el proyecto No. 0051-N9106, así como al apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes en el proyecto PIBB-92-2. Se agradece la asistencia técnica profesional del Biól. Mario Calvillo, y del Dr. Eduardo García. Se agradece la revisión del manuscrito y el apoyo secretarial y administrativo de la Sra. Teresa Villalobos.

**BIBLIOGRAFIA**

1.- Una estrategia mundial para combatir el paludismo. 1. Paludismo-Prevención y Control. Organización Mundial de la Salud, Ginebra 1994; ISBN 92 4 356161 8.

2.- Estambale, B.B. and Knight, R. Protozoan infection and HI-V-1 infection: a review. *East. Afr. Med. J.* 1992; 69 (7): 373-7.

3.- Hennessey, T. and Kung, C. An anticalmodulin drug W-7, inhibits the voltage-dependent calcium current in *Paramecium caudatum*. *J. exp. Bio.* 1984; 110,169-181.

4.- Ehrlich, B.E., Jacobson, A.R., Hinrichsen, R., Sayre, L.M. and Forte, M.A. *Paramecium* calcium channels are blocked by a family of calmodulin antagonists. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85, 5718-5722.

5.- Wu D. an overview of the clinical pharmacology and therapeutic potential of gossypol as a male contraceptive agent and in gynaecological disease. *Drugs*, 1989; 38;333.

6.- Randel, R.D.; Chase, C.C. Jr and Wyse, S.J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals. *J. Anim. Sci.* 1992; 70 (5): 1628-38.

7.- Montamat, E.E., Burgos, C., Gerez de Burgos, M.N., Rovai E.L., Blanco, A., Segura I.S., Inhibitory Action of Gossypol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 1982 218: No. 15,288-289.

8.- González-Garza, M.T., Matlin, S.A., Cárdenas-Mata, B.D. and Fernández, S. Further Studies on the In Vitro Activity of Gossypol as Antiamebic Agent. *Archives of Medical Research*, 1992 23: No. 2, 69-70.

9.- Royer, R.E.; Deck, M.L.; Campos, M.N.; Hunsaker, A.L., Vander Jagt, L.D., Biologically Active Derivatives of gossypol: Synthesis and Antimalarial Activities of Peri-Acylated Gossylic Nitriles. *J. of Medicinal Chemistry* 1986; 29, 1799.

10.- Lin T.S.; Chinazi, R., Griffith, B.P.; August, E.M., Eriksson, B.F.H., Zheng, D.K., Huag, L., Prusoff, W.H. Selective inhibition of human immunodeficiency type 1 replication by the (-) but not the (+) enantiomer of gossypol. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 2149.

11.- Eckert, R. Bioelectric control of ciliary activity. *Science*. 1972; 176: 473-480.

12.- Eckert, R. and Brehem, P., Ionic Mechanisms of excitation in *Paramecium*. *A. Rev. Biophys. Bioeng.* 1979; 8, 353-383.

13.- Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., Forte, M., and Kung, C. Voltage-dependent calcium channels from *Paramecium* cilia incorporated into planar lipid bilayers. *Science* 1984; 225, 427-428.

14.- Preston R.R.; Saimi Y., and Kung Ch. Evidence for two K+ Currents Activated Upon Hyperpolarization of *Paramecium tetraurelia*. *J. Membrane Biol.* 1990; 115-41.

15.- Bernal, J., Kelsey, A.M. and Ehrlich, B.E. GTP-Gama-S increases the duration of backward swimming behavior and the calcium action potential in marine *Paramecium*, *J. Exp. Biol.* 1991; 155: 505-518.

16.- Bernal, J. and Ehrlich B.E. Guanine nucleotides modulate calcium currents in a marine *Paramecium*. *J. exp. Biol.* 1993; 176: 117-133.

17.- Barry, S. Bernal, J. and Ehrlich, B. Calcium currents in *Paramecium* are blocked by antimalarial drugs. *Biophys. J.* 1991; 59: 277a.

18.- Dunlap, K., Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J. Physiol., Lond.* 1977; 271, 119-133.

19.- Machemer, H. and Ogura, A., Ionic conductances of membranes in ciliated and deciliate. *J. Physiol., Lond.* 1979; 296, 46-60.

20.- Haga, N., Forte, M., Siami, Y. and Kung, C. Microinjection of cytoplasm as a test of complementation in *paramecium*. *J. Cell. Biol.* 1982; 96, 1072-1080.

21.- Hille, B; Calcium channels in: *Ionic Channels of Excitable Membranes*; Sunderland, Mass. Sinauer; 1984; 76-98.

22.- Hidaka, H., Yamaki, T., Totsuka, T. and Asano, M., Selective inhibitor of Calcium-Binding modulator of phosphodiesterase produce vascular relaxation and inhibit actin-myosin alteration. *Molec. Pharmac.* 1979; 15, 15-59.

23.- Tsien, R.W., Calcium channels in excitable cell membranes. *A. Rev. Physiol.* 1983; 45, 341-358.

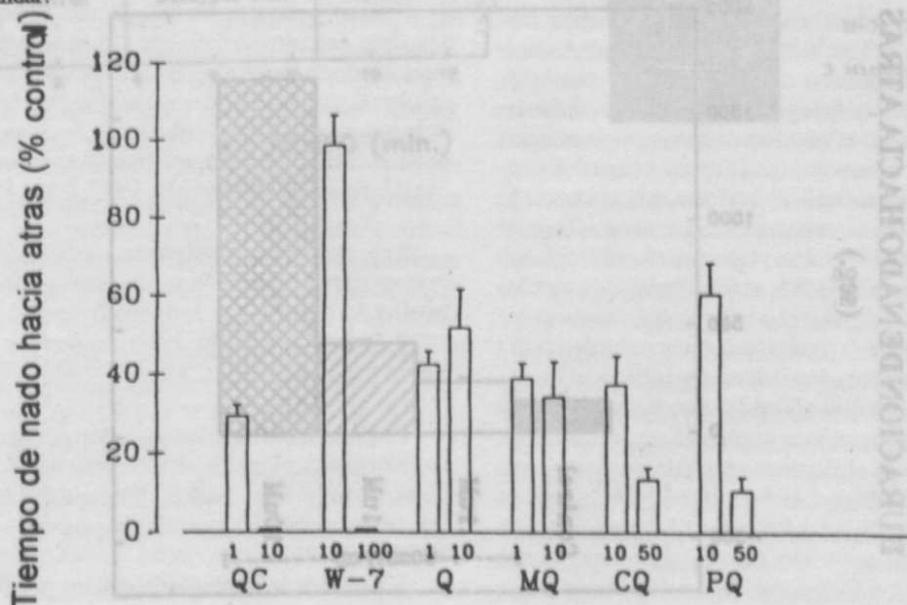
24.- Tsien, R.W., Hess, P. McCleskey, E.W. and Rosenberg, R.L. Calcium Channels: mechanism of selectivity, permeation, and block. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 1987; 16: 265-290.

**Tabla 1.- EFECTO DEL GOSSYPOL SOBRE LA DURACION DE LA CONDUCTA DE NADO HACIA ATRAS (CNHA) DEL *Paramecium*. (seg. + D.E.)**

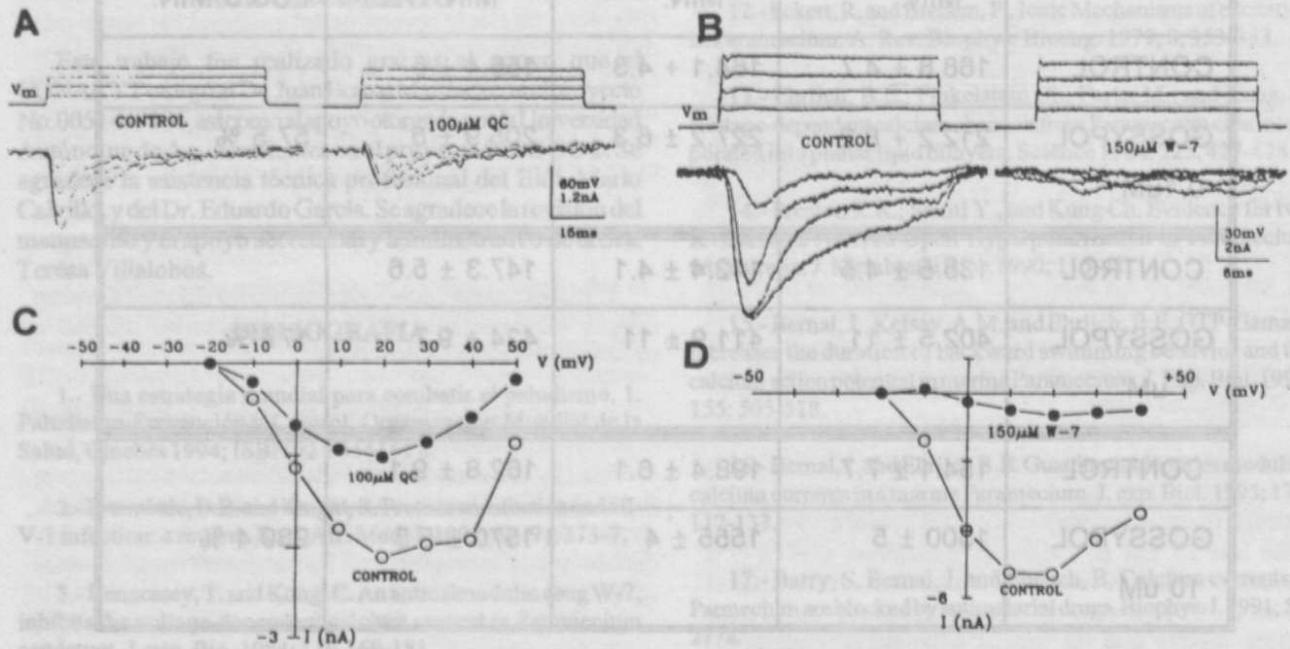
	DESPUES DE 1 MIN.	DESPUES DE 5 MIN.	DESPUES DE 10 MIN.	% DE AUMENTO A LOS 5 MIN.
CONTROL	168.8 ± 4.7	164.1 ± 4.3	156.4 ± 5	
GOSSYPOL 0.1uM	212.2 ± 8.2	227.2 ± 6.3	205.9 ± 5	57.5 %
CONTROL	135.5 ± 4.5	142.4 ± 4.1	147.3 ± 5.6	
GOSSYPOL 1 uM	402.5 ± 11	411.9 ± 11	424 ± 9.7	177 %
CONTROL	154.1 ± 7.7	198.4 ± 6.1	162.8 ± 9.1	
GOSSYPOL 10 uM	1500 ± 5	1555 ± 4	1570 ± 5.5	989.4 %

31

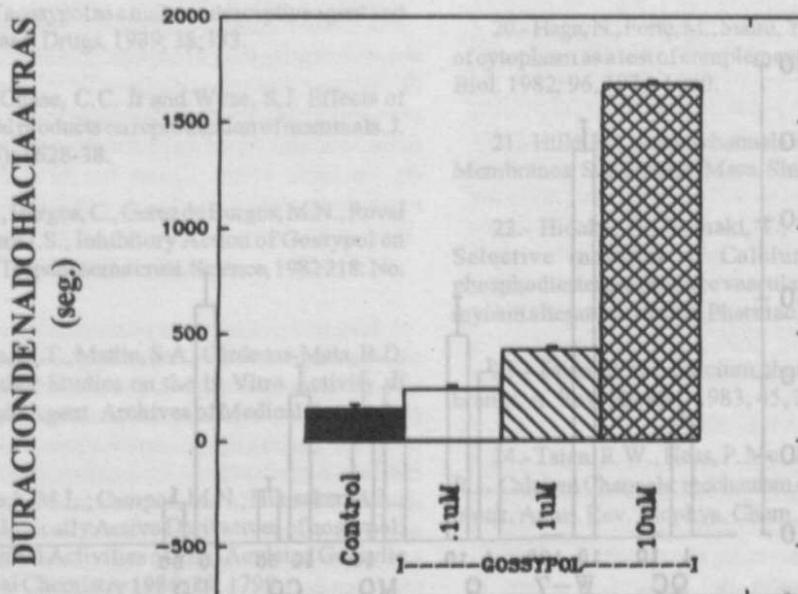
**Figura 1.- EFECTO DE DROGAS ANTIMALARIA SOBRE LA CONDUCTA DE NADO DEL *Paramecium*:** Quinacrina (QC), W7, Quinina (Q), Mefloquina (MQ), Cloroquina (CQ) y Primaquina (PQ) reducen la duración de la conducta de nado hacia atrás del *Paramecium*. En estos experimentos las células fueron expuestas a una solución de prueba con TEA (ver apartado de soluciones). Los números debajo de las barras indican la concentración de la droga en uM. Todos los efectos fueron significativos, excepto para el W-7 a concentración de 10 uM. Las columnas representan el promedio de la duración de la conducta de nado hacia atrás de 10-18 células y las barras representan la desviación estándar.



**Figura 2.- QUINACRINA Y W-7 REDUCEN LA CORRIENTE DE CALCIO EN *Paramecium*:** A. Quinacrina a una concentración de 100  $\mu$ M reduce el pico de la corriente de calcio en un 52%. La célula fue fijada a un potencial de membrana de -20mV y despolarizada con pulsos comando con incremento de +10mV (trazos superiores) para producir las corrientes de calcio (trazos inferiores). B. Muestra la relación corriente-voltaje de las corrientes de calcio en presencia y en ausencia de 100  $\mu$ M de quinacrina. C. A una concentración de 150  $\mu$ M, el W-7 reduce la corriente de calcio en un 88%. La célula fue fijada a un potencial de membrana de -20mV y despolarizada con pulsos comando con incremento de +10mV (trazos superiores) para producir las corrientes de calcio (trazos inferiores). D. Muestra la relación corriente-voltaje de las corrientes de calcio en presencia y en ausencia de W-7 150  $\mu$ M.

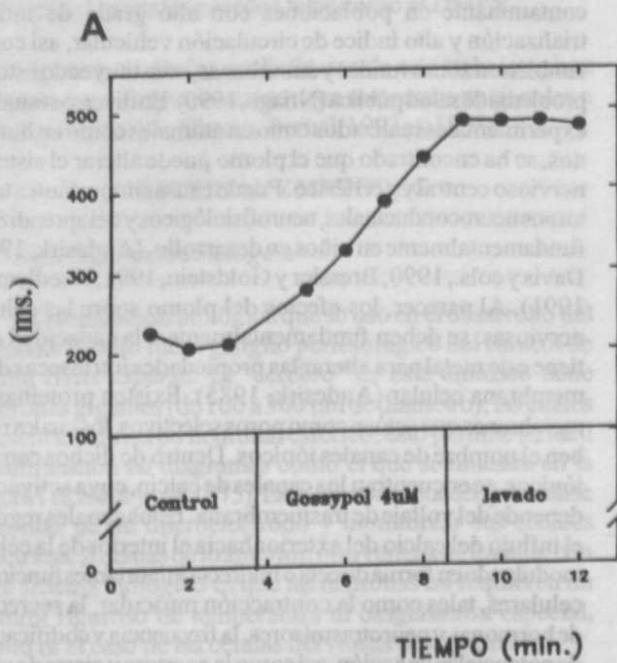


**Figura 3.- EFECTO DEL GOSSYPOL SOBRE EL TIEMPO DE NADO HACIA ATRAS DEL *Paramecium*:** La duración de la conducta de nado hacia atrás de *Paramecium* (en segundos) es graficada en condiciones control (columna negra) y cuando las células fueron tratadas con gossypol a diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10  $\mu$ M), durante 5 minutos de exposición a las drogas. Todas las columnas representan el promedio de al menos 50 células y las barras representan los valores de la desviación estándar.



**Figura 4.-EL GOSSYPOL MODULA EL POTENCIAL DE ACCION CALCICO DEL *Paramecium*:** A) En esta figura se grafica la duración del potencial de acción (en mseg.) contra el tiempo, en condiciones control, cuando la célula es expuesta a gossypol (4  $\mu$ M), y después del lavado de gossypol. B) Se presentan registros típicos del potencial de acción cálcico del *Paramecium* en condiciones control (panel superior), cuando la célula fue expuesta al gossypol a una concentración de 4  $\mu$ M (panel de en medio), y después de la aplicación de la solución extracelular que contenía gossypol (4  $\mu$ M)+W-7 (100  $\mu$ M). El trazo superior de cada panel representa el monitor de corriente. El trazo inferior representa los cambios de potencial de membrana producidos por la inyección de corriente. Los valores de escala son 40mV/seg.

**DURACION DEL POTENCIAL DE ACCION CALCICO**



**B**

