



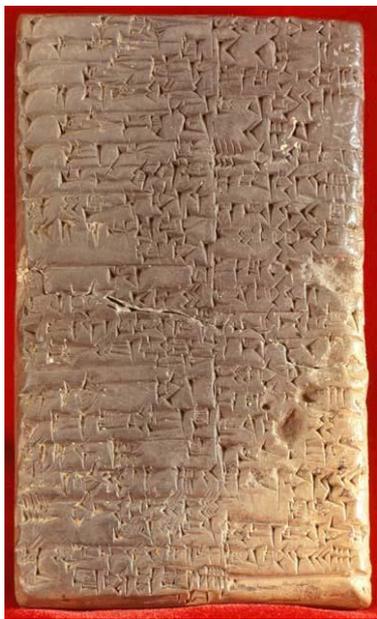
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
Laboratorio de Neurofisiología Sensorial

**Moléculas bioactivas derivadas de organismos
marinos de interés en biomedicina**

José Emilio Salceda Ruanova

V Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud

INAOE, 2014

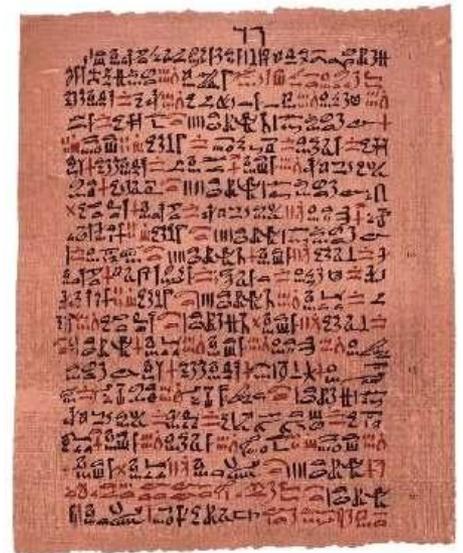


Tableta sumeria (Nippur, 2250 a.C.)

Empleo de plantas como la mandrágora, el beleño, la asafétida, etc.

Papiro de Ebers (Egipto, 1500 a.C.)

Se describen las propiedades tóxicas de varios principios y las ponzoñas de algunos animales.



“... había marchado allí Odiseo en rápida nave para buscar veneno homicida con que untar sus bronceíneas flechas.

Homero, Odisea, Canto I

"... porque parece que todas las saetas del Señor están clavadas en mí. Y el veneno de ellas va corroyendo mi espíritu..."

Levítico 10 - 9



Sócrates (470-399 a.C.)
Conium maculatum

Cleopatra (69-30 a.C.)
¿Naja haje?
¿*Echis pyramidium*?



Fuentes animales de biomoléculas de interés en medicina



Bothrops jararca
Captopril (antihipertensivo)



Heloderma suspectum
Extendin-4 (hipoglucemiante)

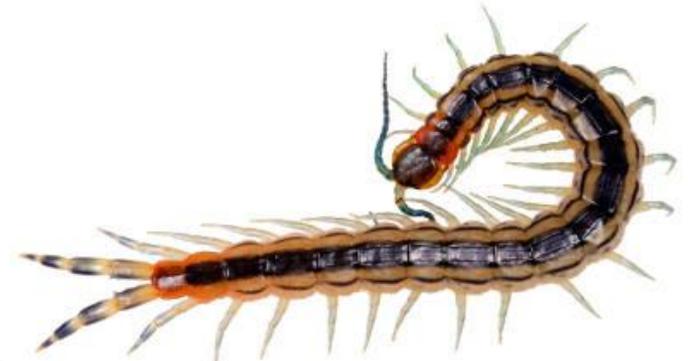


Naja naja
Hannalgesina, (analgésico)



Crotalus durissus terrificus
(Crotamina (analgésico)

Y además...



Escorpiones
Arañas
Otros artrópodos
Avispas
Abejas
Ranas
Otros reptiles
Plantas terrestres
Hongos
Algas
Bacterias



Y... las especies marinas



Anémonas
Peces
Corales
Medusas
Pulpos
Conos
Otros moluscos
Algas marinas
Plantas marinas
Hongos
Algas
Bacterias



¿Por qué buscar en el mar?

BIODIVERSIDAD

Genética

De especies

De ecosistemas

Diversidad taxonómica

¿Cuántas especies hay?

1,700,000, se calcula que existen 10,000,000 más

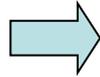
En el mar: 250,000 especies conocidas

Cálculos conservadores estiman un millón más

Caracterización de neurotoxinas: flujo de trabajo

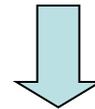
Búsqueda inicial

Bioensayos (veneno completo)



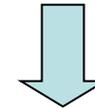
Aislamiento y purificación

Bioensayos con fracciones cromatográficas
Determinación de secuencia y PM



Caracterización funcional

Técnicas electrofisiológicas



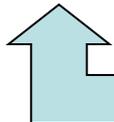
2ª Caracterización estructural

Estructura tridimensional

Aplicaciones



Modificación estructural



Síntesis



Relación estructura-función

Mutagénesis dirigida
Modificación química



El phylum Cnidaria



Actinia Blanca
(*Anthothoe chilensis*)



Chrysaora sp.



Hydra sp.



Millepora sp.



Anthopleura elegantissima

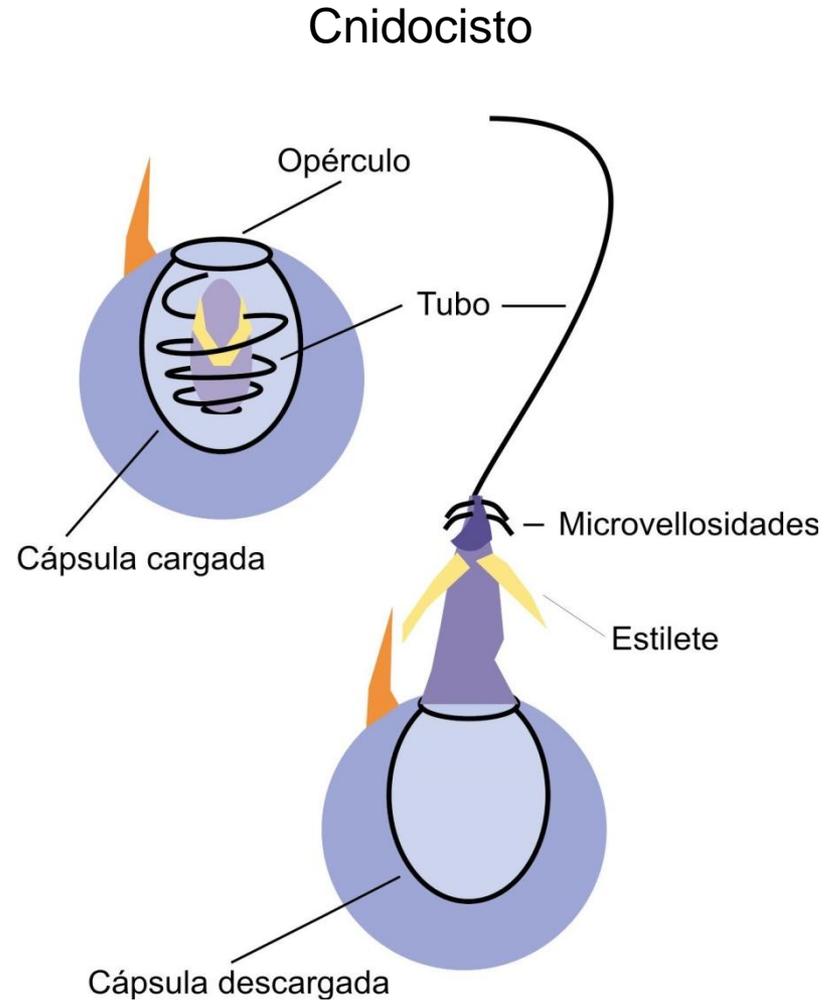
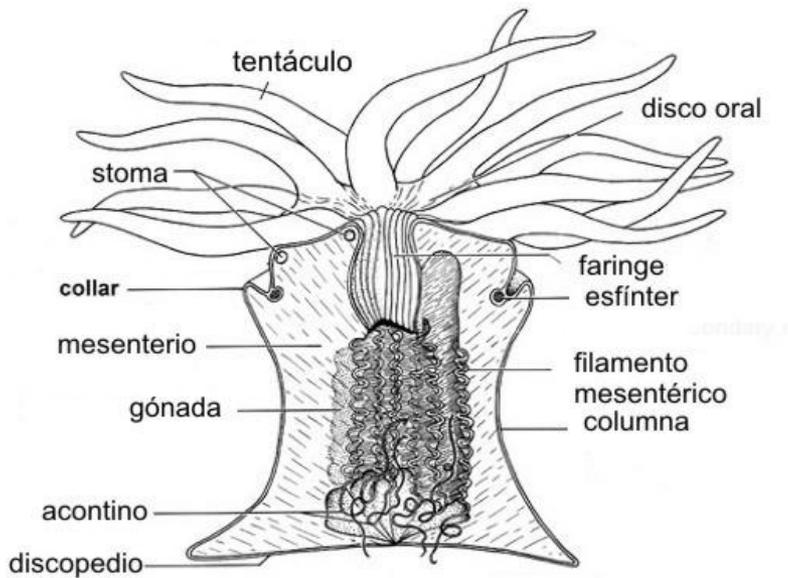


Epicystis crucifer



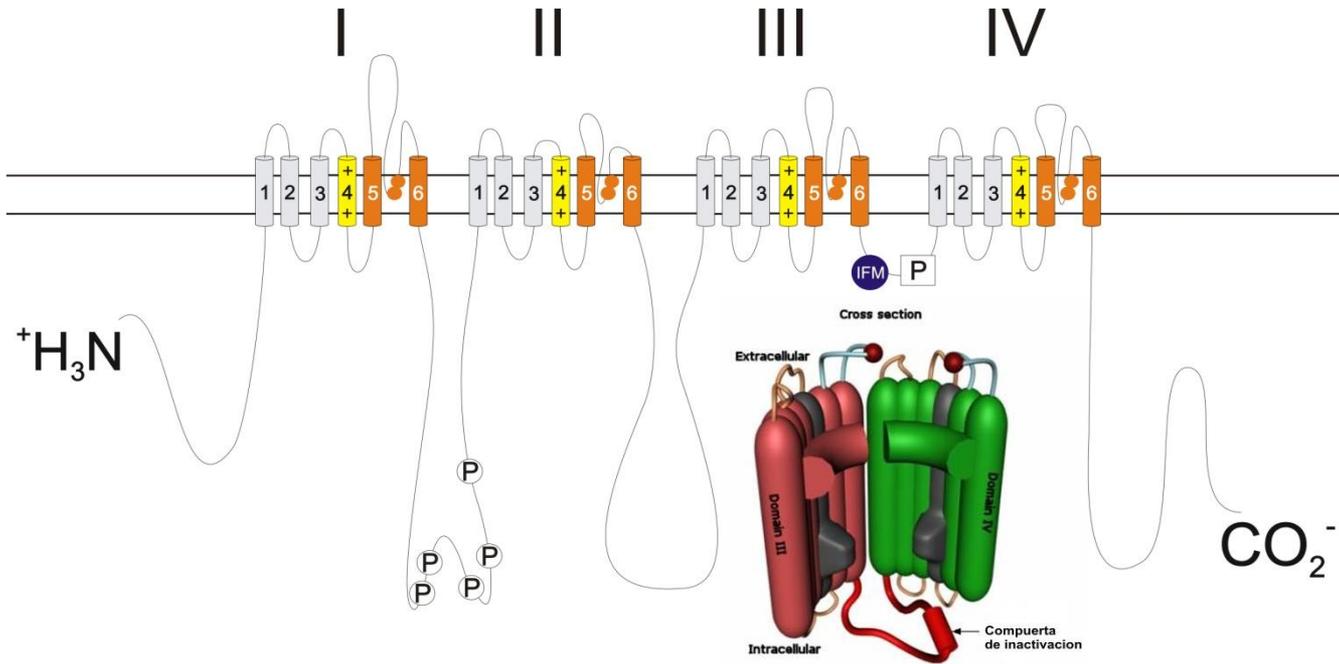
Physalia physalis

Cnidocitos y nematocistos



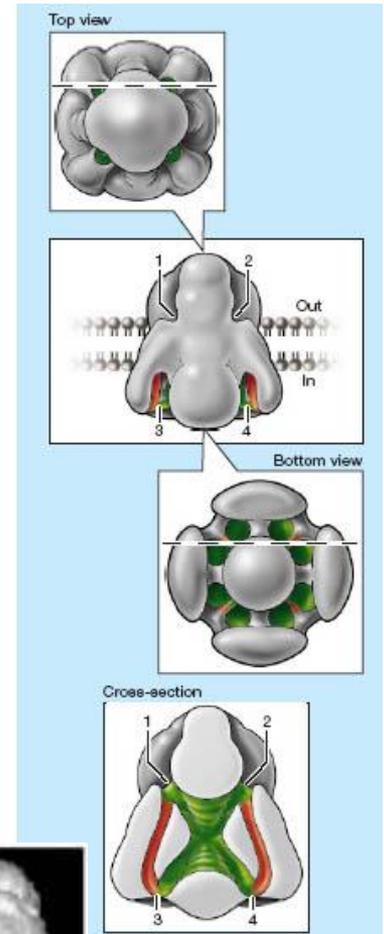
Células capsulares de doble pared

El canal de sodio dependiente de voltaje

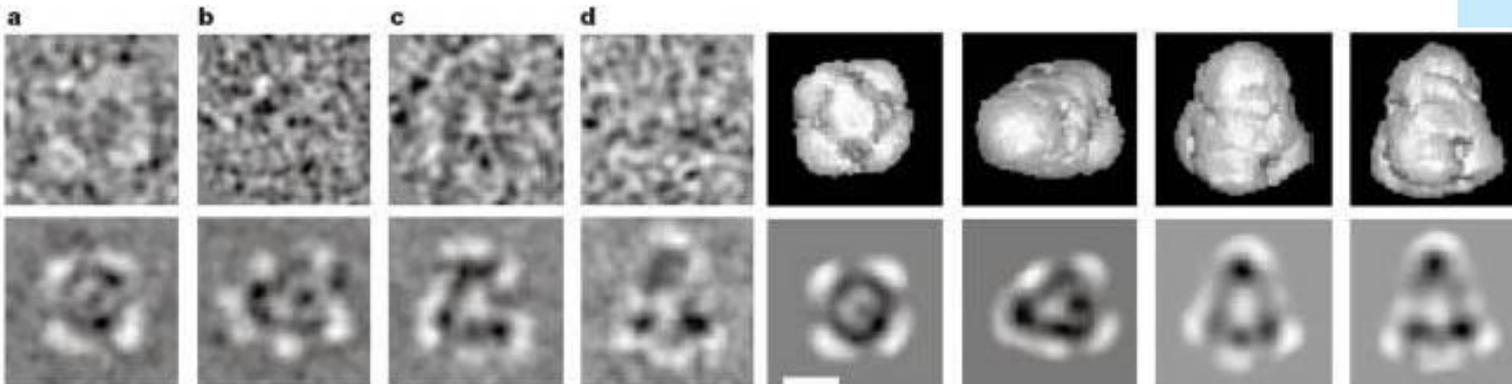


- Poro
- Sensor de voltaje
- Compuerta de inactivación

- Diámetro del poro de 1.2 nm.
- S4: arginina o lisina en cada tercera posición.
- IFM se une a Fen1651 y Leu1660 S4-S5 DI.

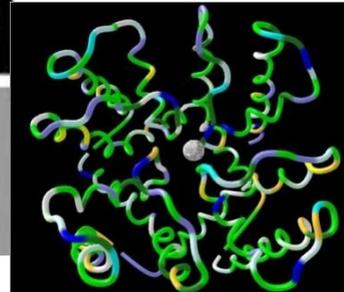


Catterall, 2001

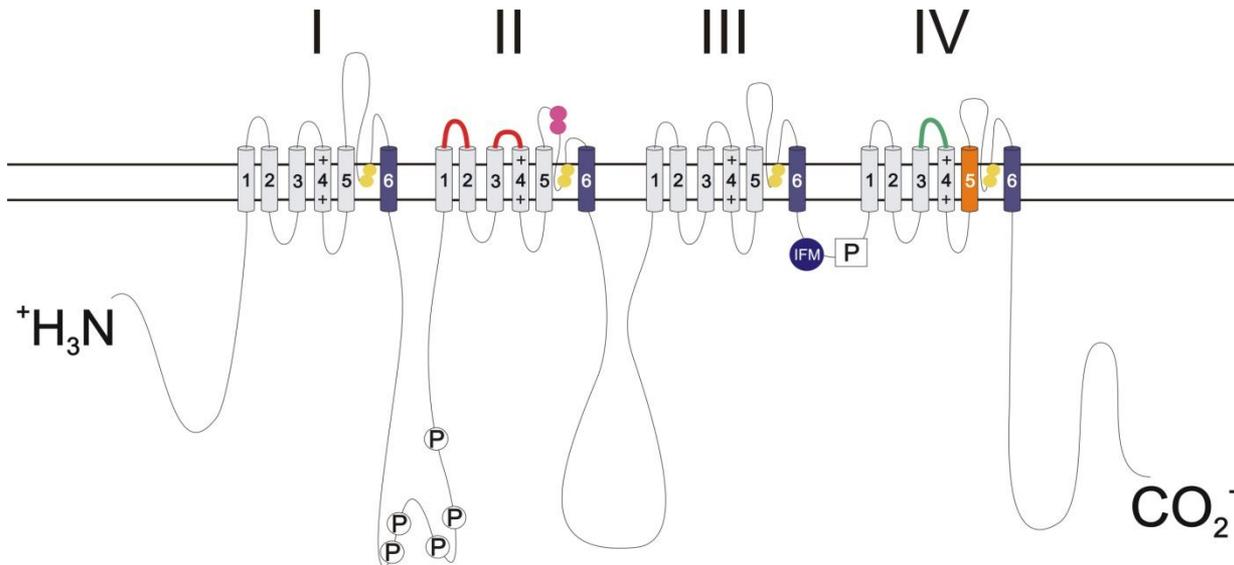


Sato et al., 2001

Salinas, 2009.



Receptores a neurotoxinas en el canal de Na⁺



- Sitio 1 TTX, STX. Bloqueadores de la conductancia iónica.
 - Sitio 1 Γ -conotoxina.
 - Sitio 2 Veratridina, Batracotoxina (BTX), Aconitina, Grayanotoxina (GTX). Activación persistente.
 - Sitio 3 Toxinas α de escorpión, de anémoma marina, δ -atractoxinas. Inhibición de la inactivación.
 - Sitio 4 Toxinas β de escorpión. Desplazan la dependencia de voltaje de la activación a potenciales cercanos al PMR.
 - Sitio 5 Brevetoxinas (PbTX), Ciguatoxinas (Ctx). Desplazan la dependencia de voltaje de la activación a potenciales más negativos.
 - Sitio 6 δ -conotoxinas. Inhibición de la inactivación.
- Sitios no identificados. *Conus striatus*, *Goniopora*.

Diferentes toxinas se unen a un mismo sitio receptor si:

1. Inducen efectos similares sobre los canales iónicos en estudios electrofisiológicos.
2. Compiten en ensayos de unión.
3. Exhiben características farmacológicas similares con respecto al sitio receptor.

“Sitio receptor”: sitios combinados de unión o sitios de reconocimiento directamente involucrados en la interacción de unión con una toxina.

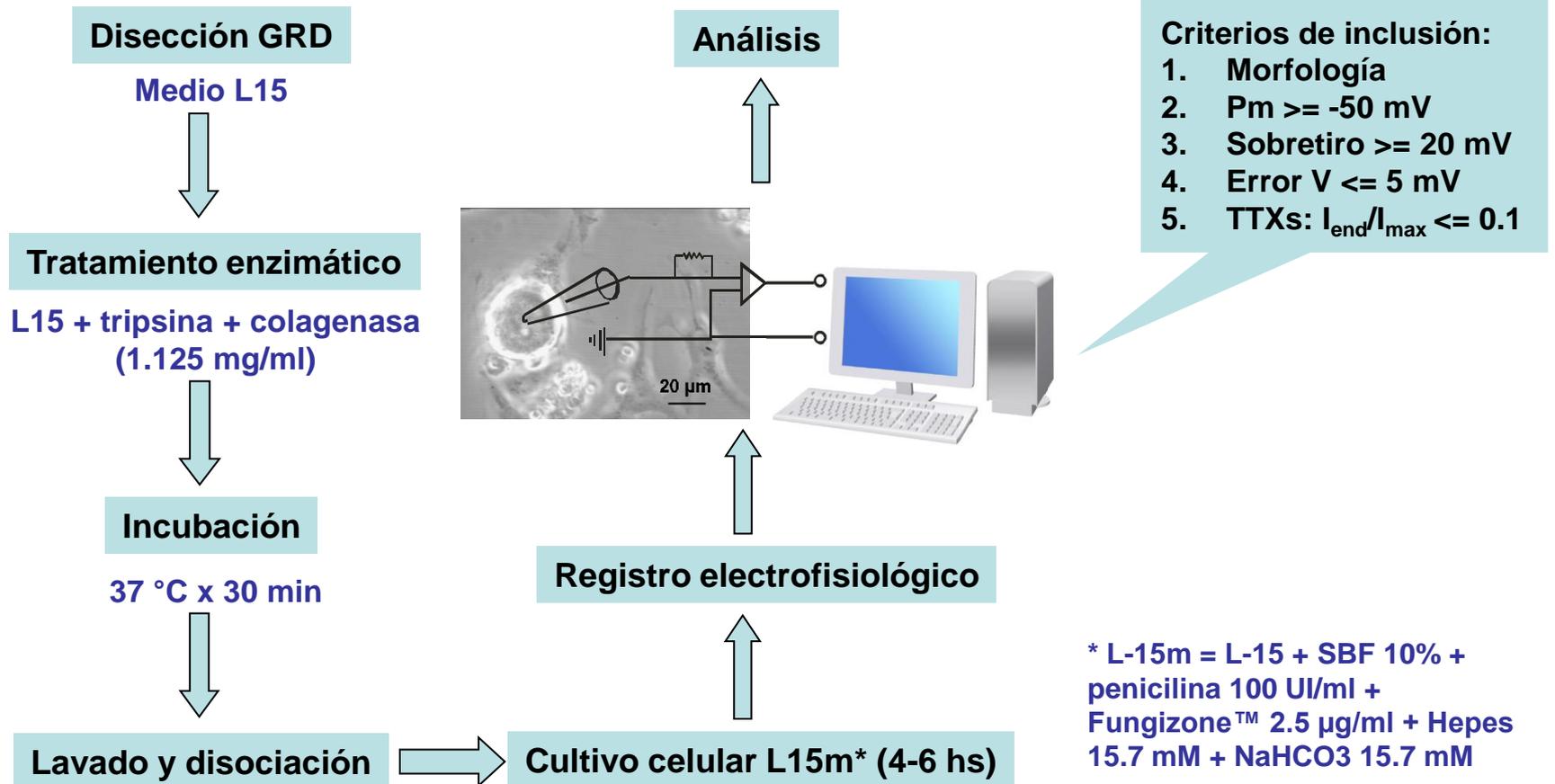
METODOLOGÍA: Cultivo celular

Toxinas:

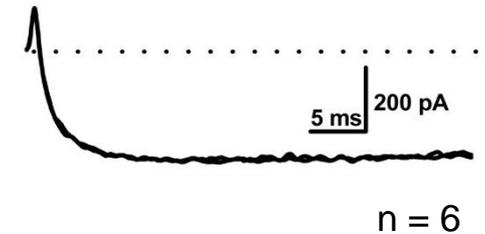
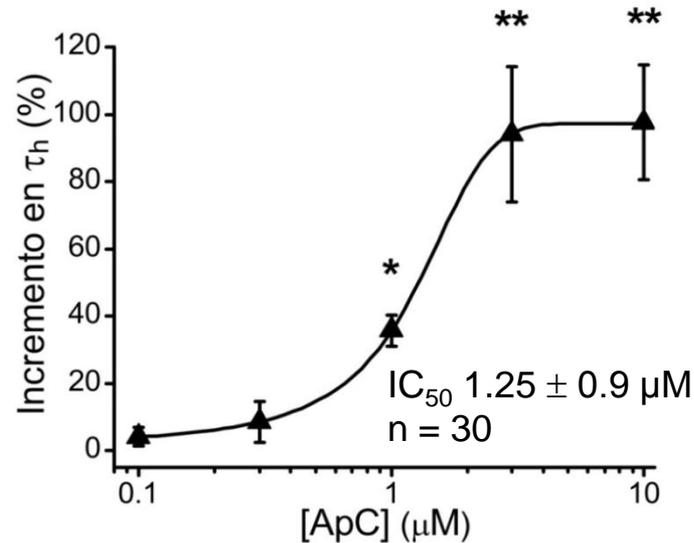
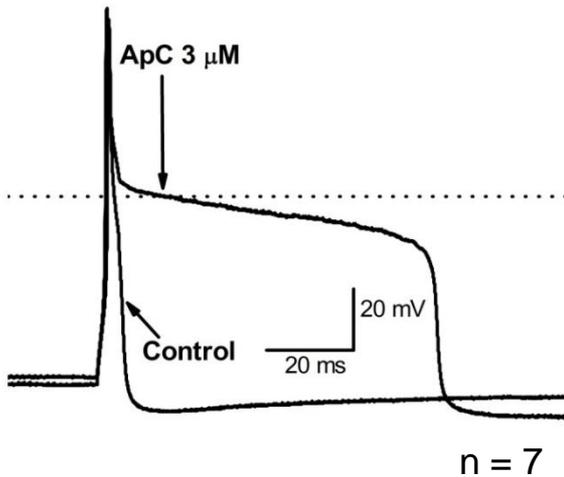
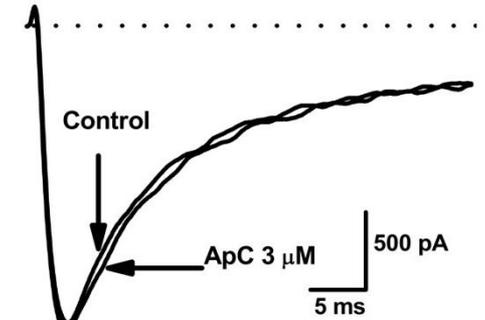
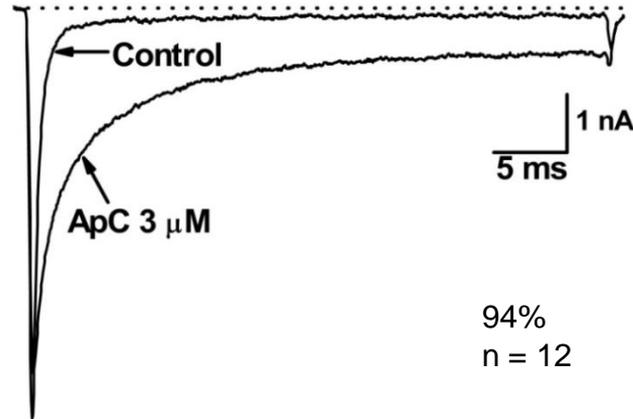
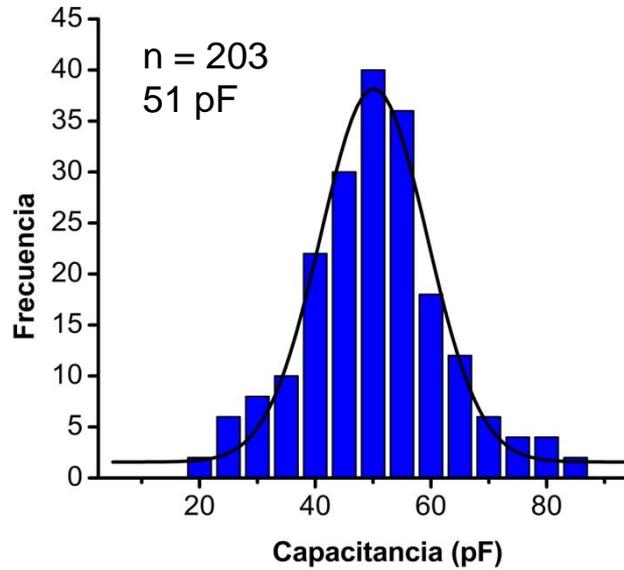
- ApC : Dr. Laszlo Beress (Universidad de Kiel, Alemania)
- CgNa: Dra. Anoland Garateix (CEBIMAR, Cuba)

Animales:

- Ratas Wistar (P5-P9)

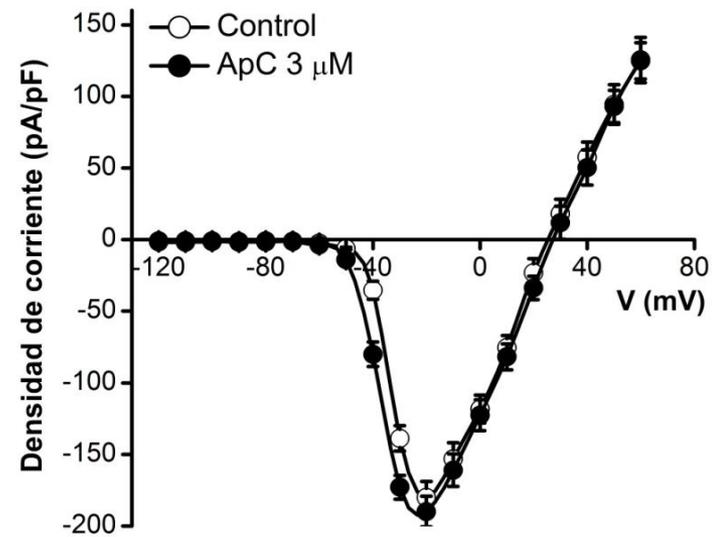
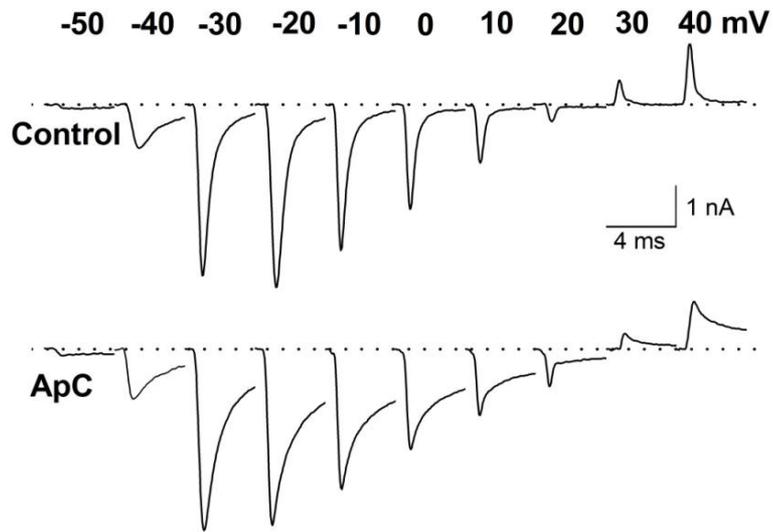


Efecto de ApC sobre corrientes de sodio TTX-S, TTX-R y PA



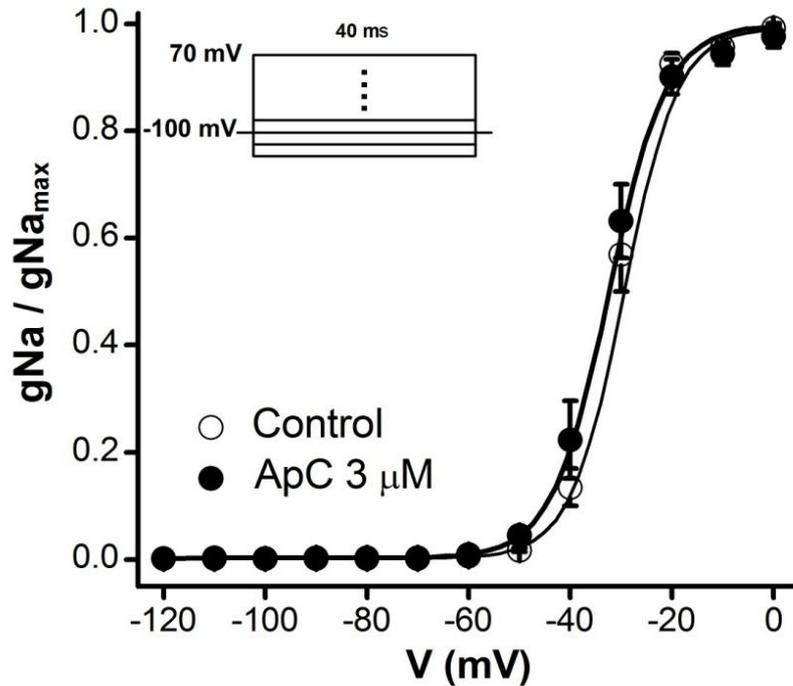
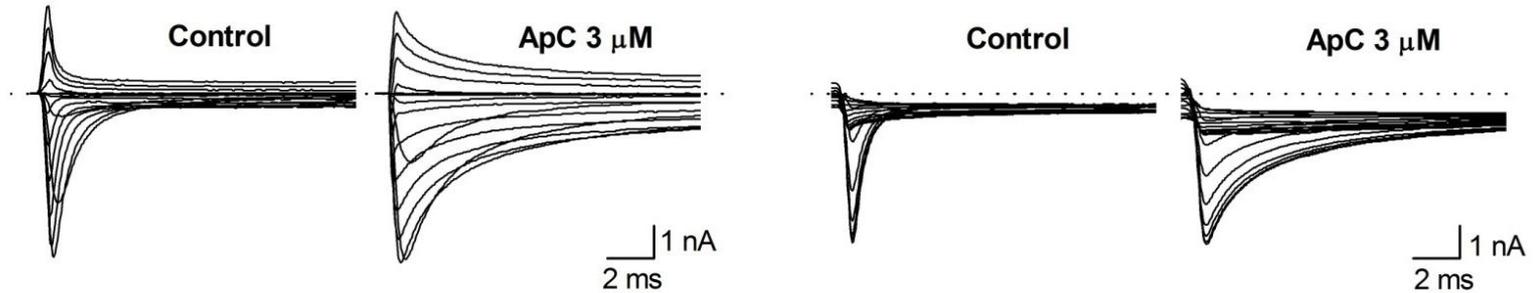
Bossu y Feltz, 1984
Elliot y Elliot, 1993
Baker y Wood, 2001
Novakovik et al., 2001

Efecto de ApC sobre la relación I-V



n = 8

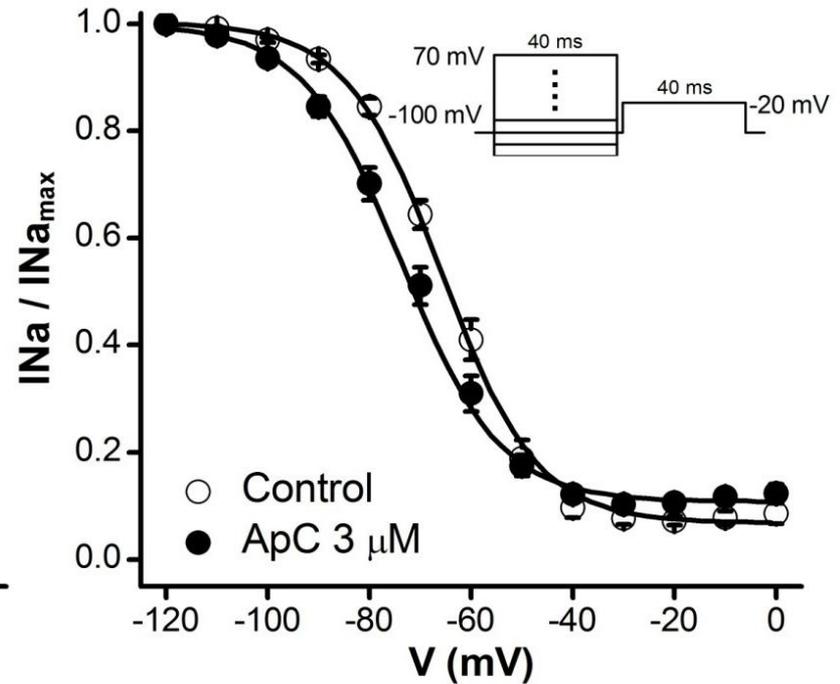
Efecto de ApC sobre las curvas de activación e inactivación



n = 8

$V_{1/2 \text{ act}}$ control = -29 ± 0.6 mV

$V_{1/2 \text{ act}}$ ApC = -32.4 ± 0.9 mV

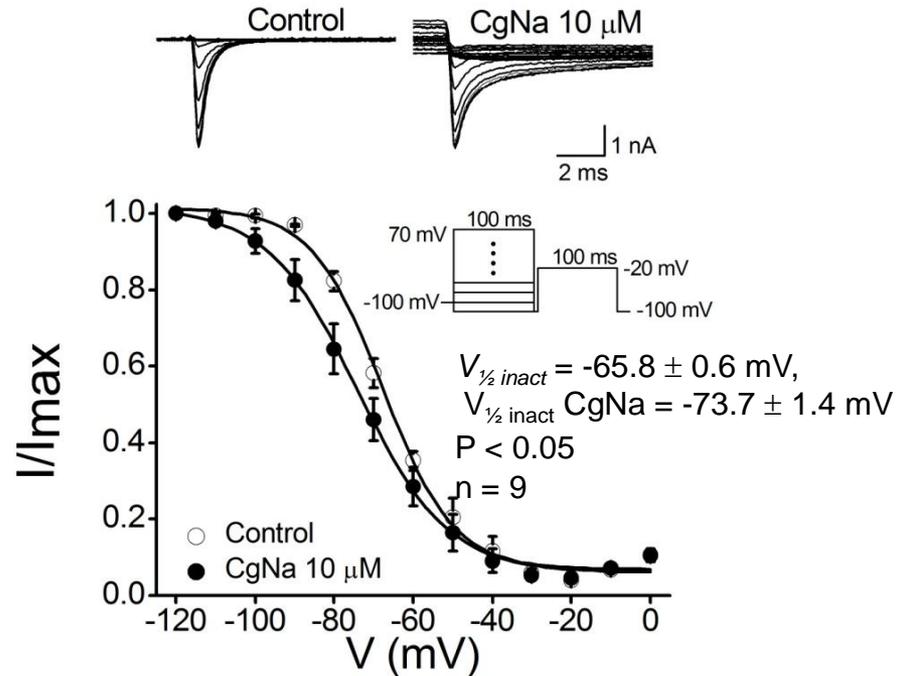
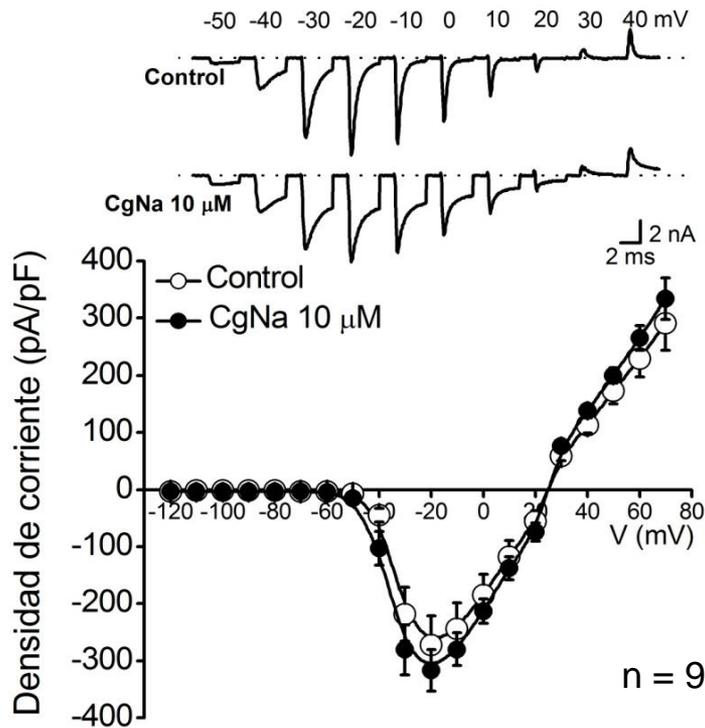
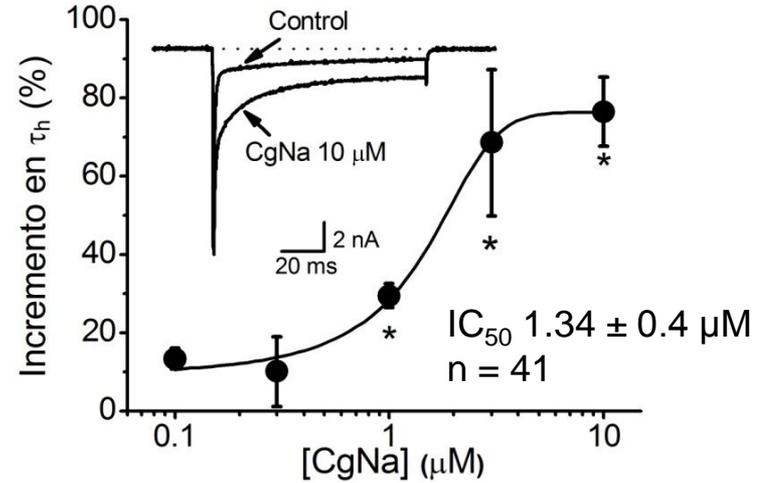
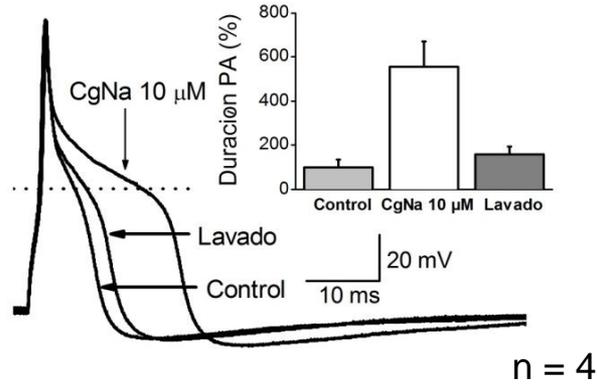


n = 8

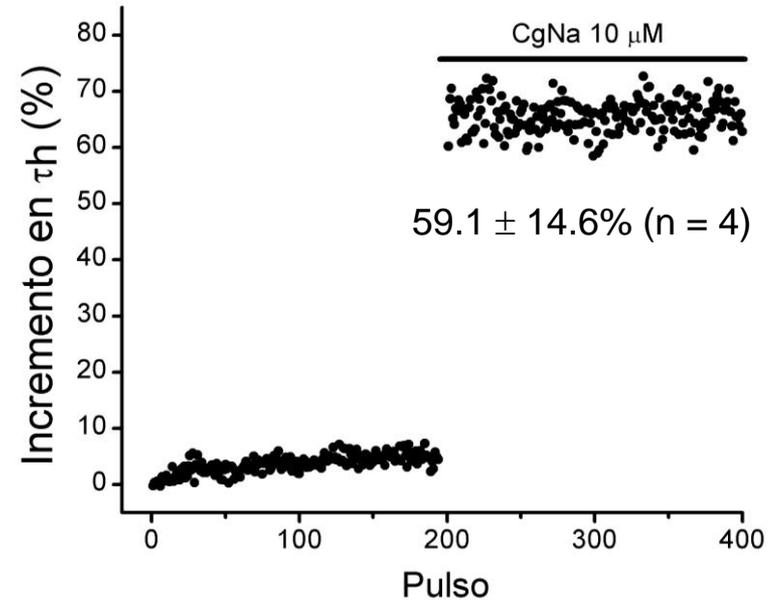
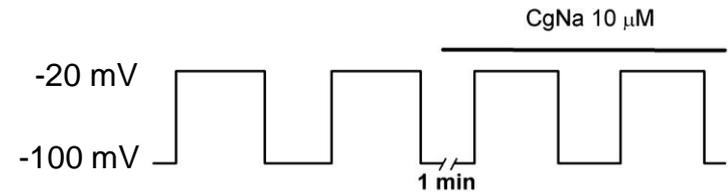
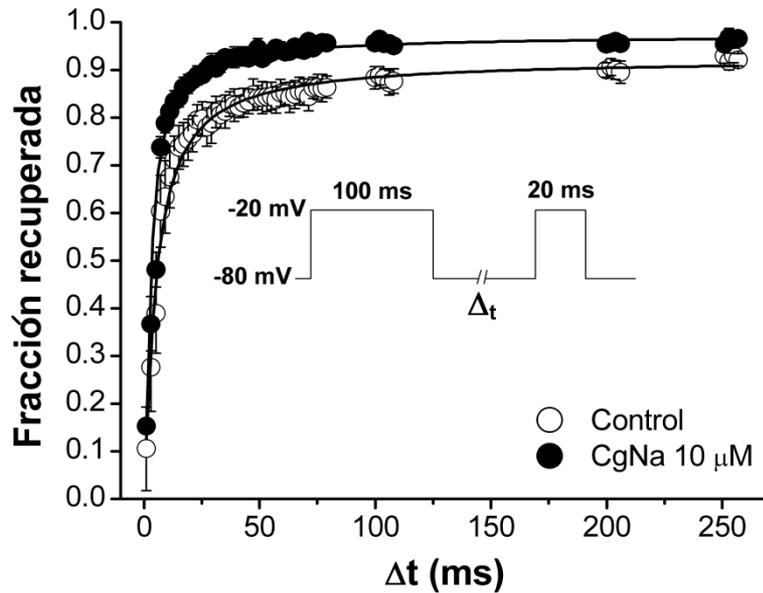
$V_{1/2 \text{ inact}}$ control = -64.5 ± 1.6 mV

$V_{1/2 \text{ inact}}$ ApC = -72.4 ± 1.5 mV ($p < 0.05$)

Efecto de CgNa sobre corrientes de sodio TTX-S y PA



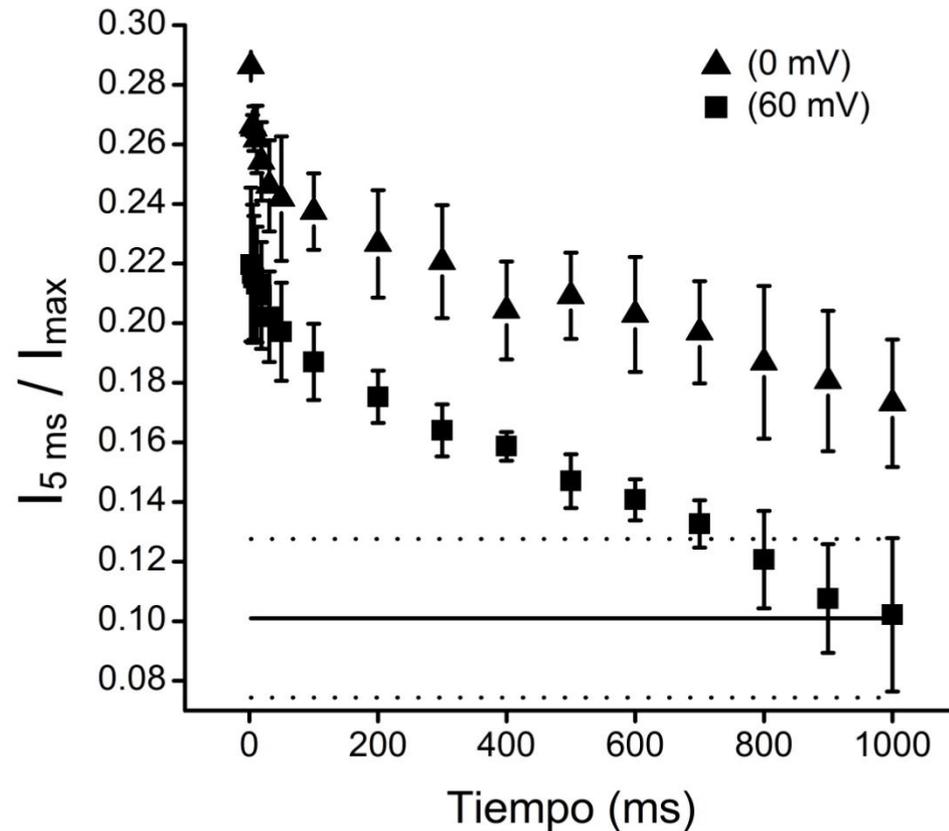
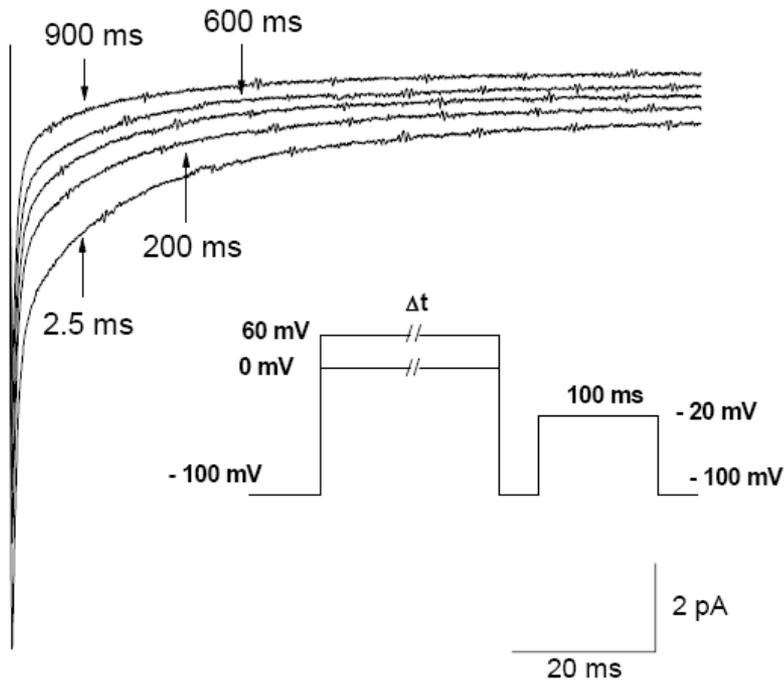
Efecto de CgNa sobre la recuperación desde la inactivación



Control: 6.1 \pm 1.3 ms ($t_{\text{rec-f}}$) y 49.2 \pm 7.4 ms (n = 4)

CgNa: 5.5 \pm 0.8 ms ($t_{\text{rec-f}}$) y 20.1 \pm 3.1 ms* ($t_{\text{rec-s}}$) (n = 4)

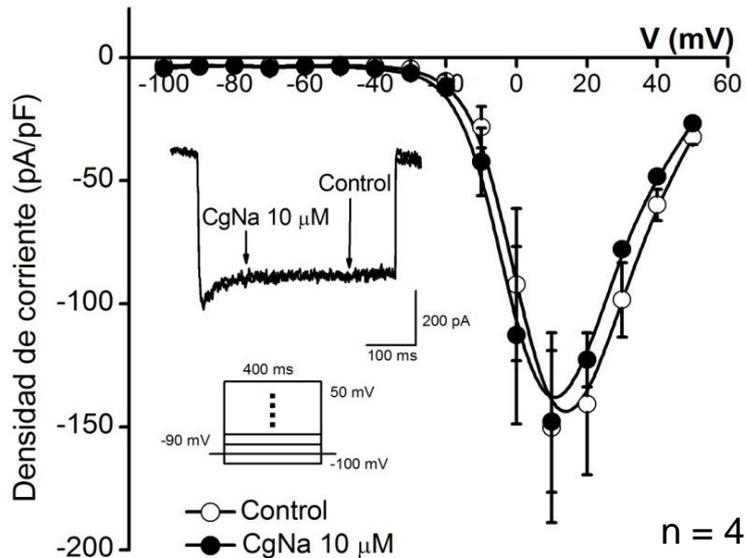
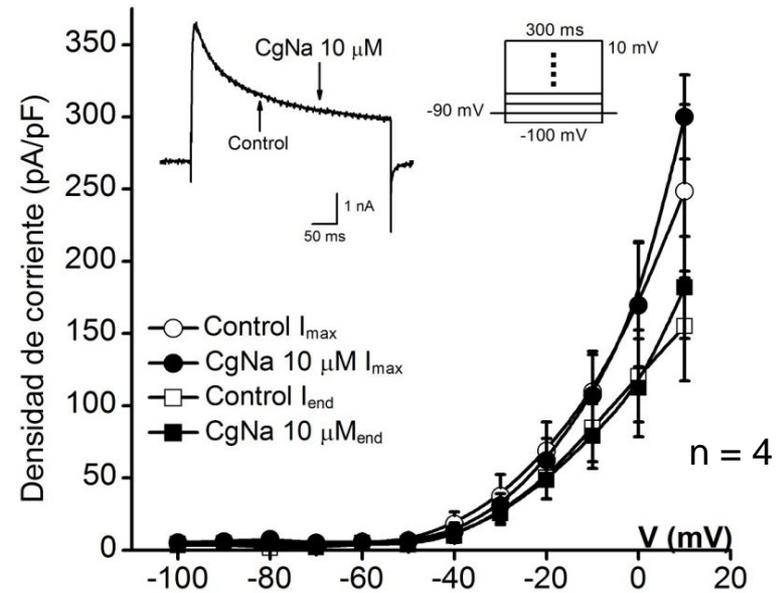
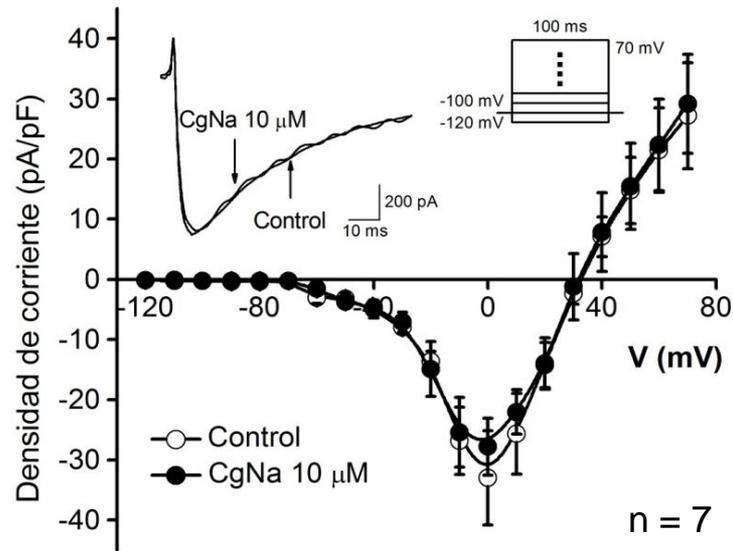
Disociación de CgNa dependiente de voltaje



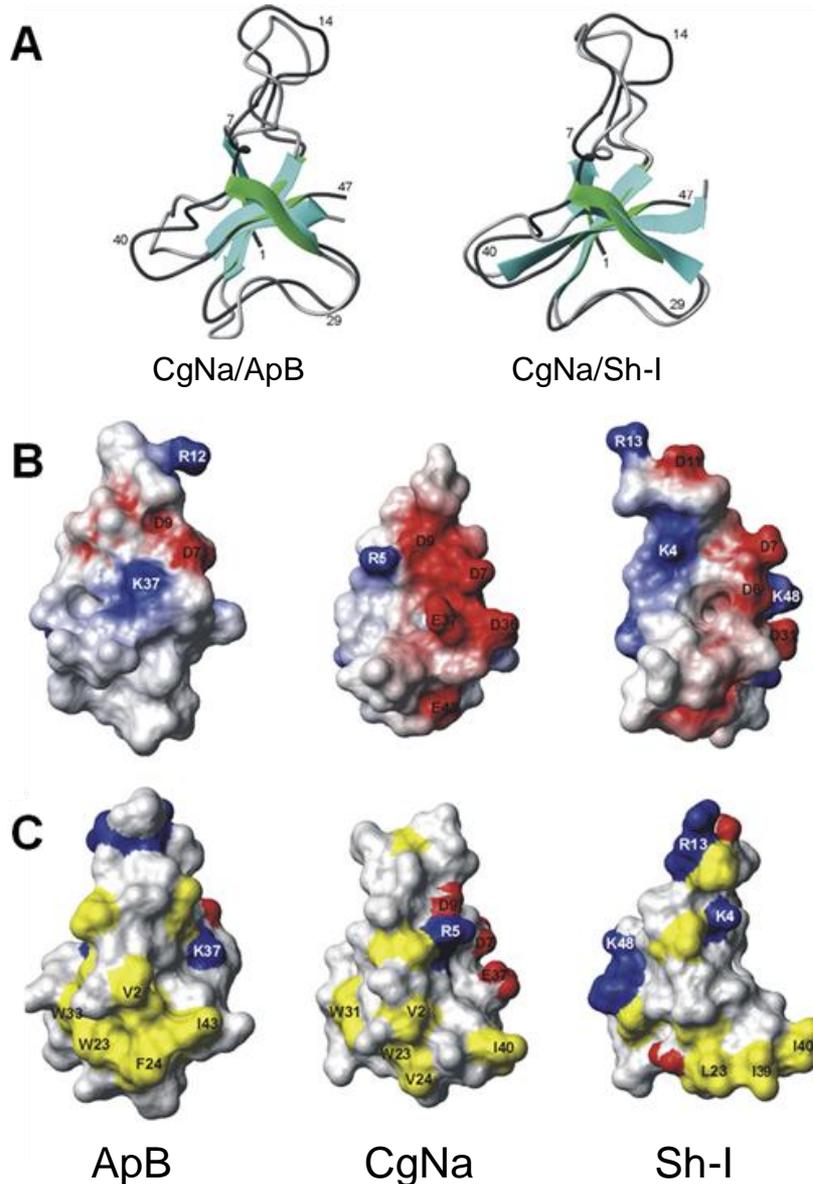
$t_{1/2}$ 0mV = 960 ± 11 ms (n = 3)

$t_{1/2}$ 60 mV = 326 ± 39 ms (n = 3)

Efecto de CgNa sobre corrientes TTX-R, de calcio y de potasio



Comparación de las estructuras de CgNa, ApB y Sh-I



(A) Representación superpuesta de las toxinas CgNa , ApB y Sh-I. CgNa se presenta en verde y gris oscuro.

(B) Representación del potencial electrostático de superficie. Azul = altamente positivo; rojo = altamente negativo.

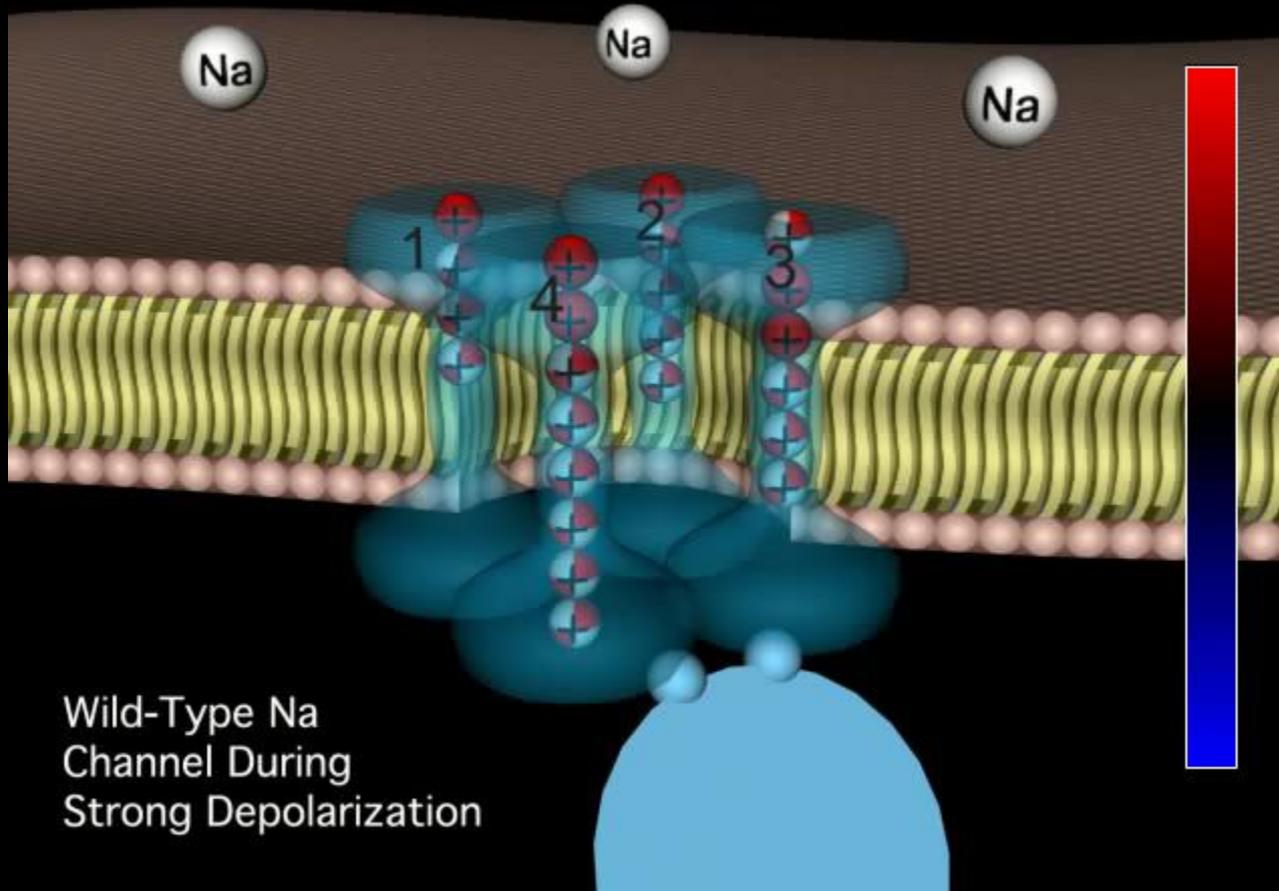
(C) Residuos hidrofóbicos de superficie (amarillo).

CgNa posee un mayor porcentaje de residuos expuestos con carga negativa y un menor porcentaje de residuos hidrófobos expuestos

Los residuos Gly-10 y Gly-15 (conservados en CgNa) son determinantes de la afinidad de ApB por el canal. Arg-12 Leu-18, Trp-33, Lys-37 Ile-43 y Trp-45 también contribuyen significativamente. Sólo dos de estos residuos se encuentran estrictamente conservados en CgNa: Leu-18 y Trp-33. La toxina carece de Arg-14.

■ Mecanismo de acción de las toxinas de sitio 3

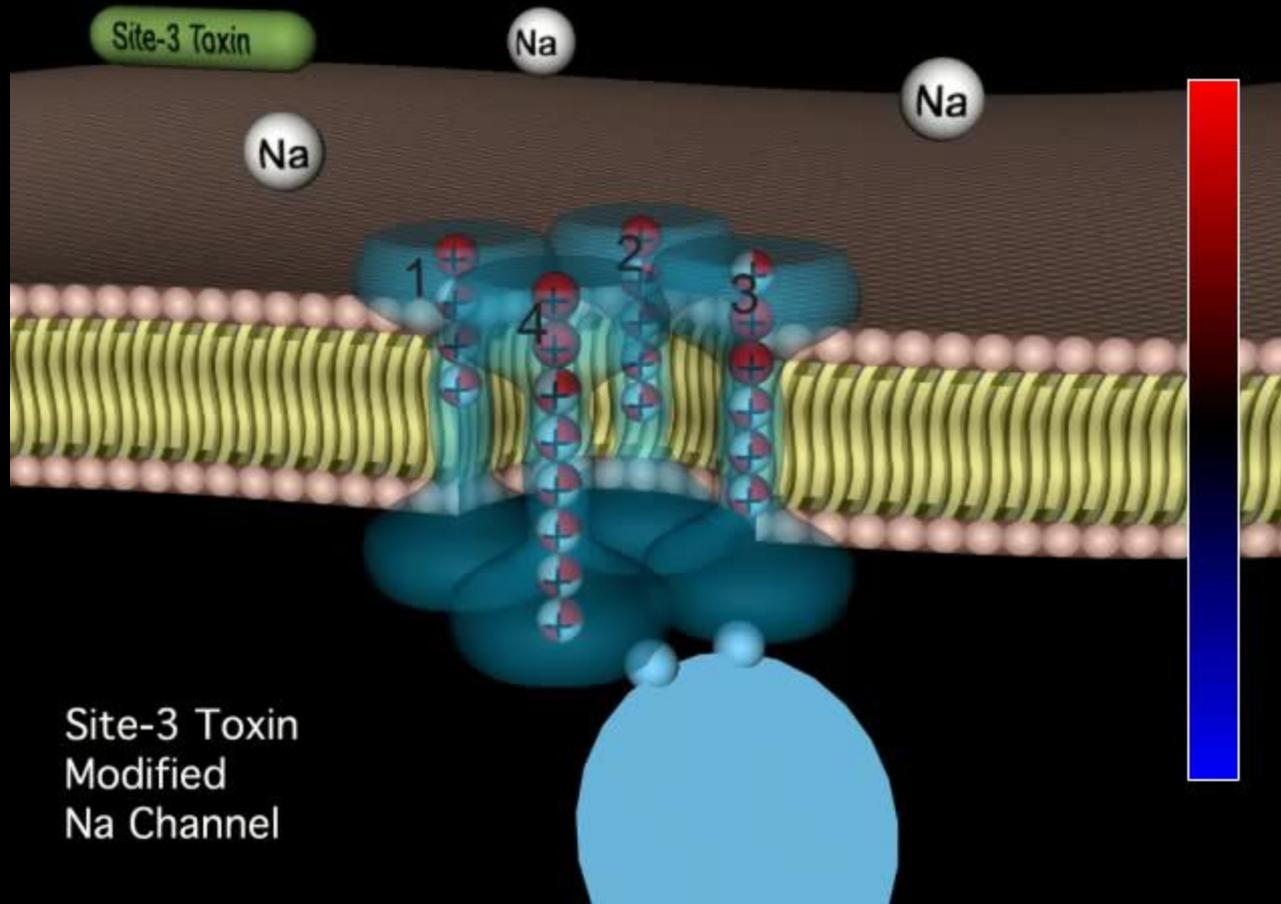
■ Mecanismo normal de inactivación



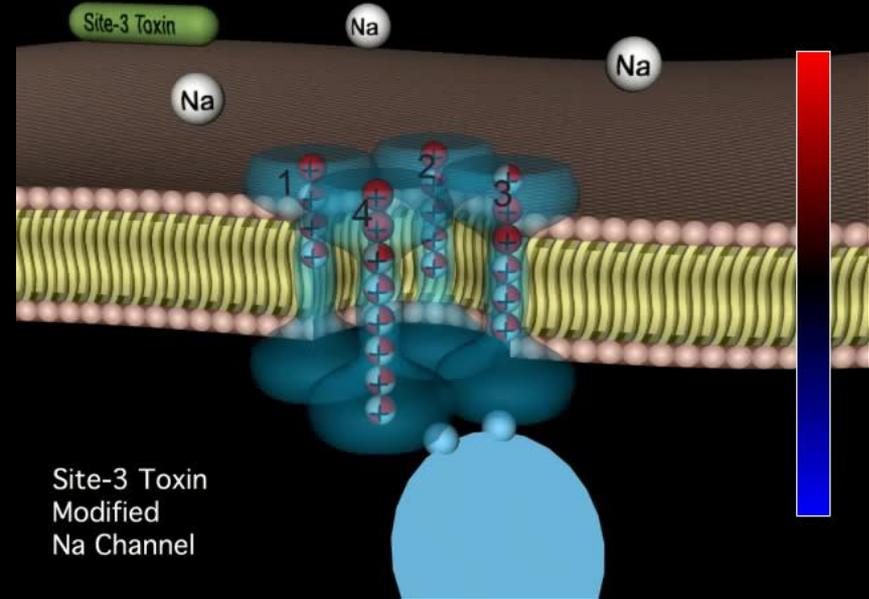
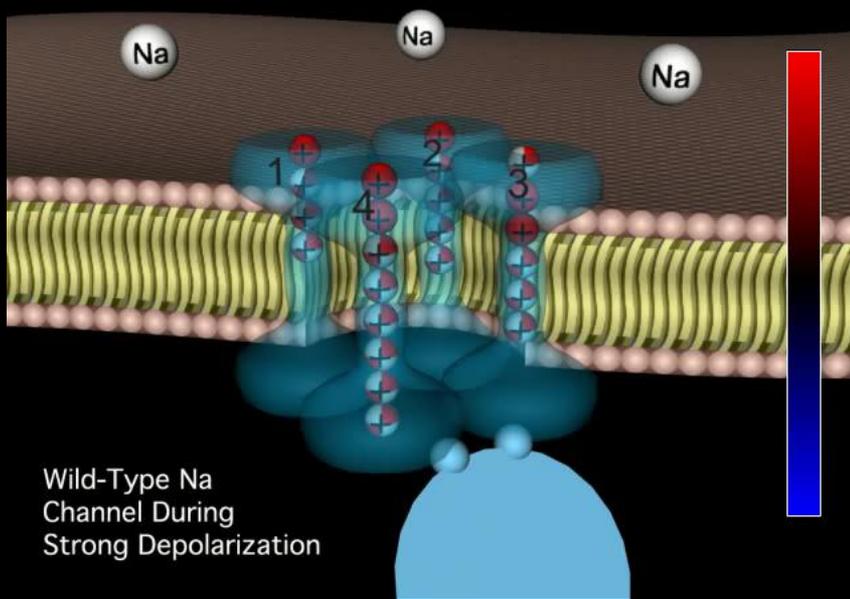
Animaciones cortesía del Dr. Michael Sheets de The Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research and Training Institute (CVRTI), University of Utah, USA.

■ Mecanismo de acción de las toxinas de sitio 3

■ Mecanismo en presencia de toxina



■ Mecanismo de acción de las toxinas de sitio 3



CONCLUSIONES

- Las toxinas ApC y CgNa enlentecen la inactivación de los canales de sodio sensibles a TTX sin modificar el curso temporal de la activación ni la amplitud de las corrientes. Este efecto es dependiente de la concentración y resulta en un incremento en la duración del PA.
- ApC y CgNa desplazan la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales más negativos.
- CgNa actúa uniéndose al estado cerrado del canal.
- CgNa se disocia de su sitio receptor de manera dependiente del voltaje. La disociación es más rápida a voltajes despolarizantes.
- El efecto de CgNa parece ser altamente selectivo, ya que no ejerció ninguna acción sobre las corrientes de sodio tipo TTX-R, sobre las corrientes de potasio ni sobre las corrientes de calcio.
- CgNa acelera la recuperación de la inactivación de los canales de sodio.

El efecto de ambas toxinas sobre el proceso de inactivación es semejante al de otras toxinas, como ATX II y las toxinas a de escorpión, por lo que es probable que actúe en el mismo sitio, aunque CgNa posee particularidades estructurales no observadas en otras toxinas de anémona, particularmente un mayor porcentaje de residuos expuestos con carga negativa y un menor porcentaje de residuos hidrófobos expuestos.



Gracias