

---

# **UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

## **Facultad de Ciencias Marinas**



### **Evaluación experimental del uso del corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*) como modelo biológico en Farmacología Marina**

#### **T E S I S**

que para obtener el grado de

#### **MAESTRA EN CIENCIAS**

presenta:

#### **GRACIELA GUERRA RIVAS**

**Evaluación experimental del uso del  
corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*)  
como modelo biológico en  
Farmacología Marina**

**Tests  
que presenta:**

**GRACIELA GUERRA RIVAS**



**Dr. Jorge de la Rosa Velez**  
Presidente del Jurado



**M.C. Hilda Corina Garza González**  
Sinodal



**M.C. Rafael Solana Sansores**  
Sinodal



El presente trabajo se realizó dentro del proyecto de investigación "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California" gracias al apoyo de la Secretaría de Educación Pública (convenio 90-01-380) y de la Universidad Autónoma de Baja California

*A LOS ALUMNOS*

*Gracias por ser  
fuerza impulsora*

# Indice

|                                                                  | pag. |
|------------------------------------------------------------------|------|
| Lista de Figuras .....                                           | II   |
| Lista de Tablas .....                                            | III  |
| Resumen .....                                                    | 1    |
| 1.- Introducción .....                                           | 2    |
| 2.- Antecedentes .....                                           | 4    |
| 3.- Objetivo .....                                               | 12   |
| 4.- Metodología .....                                            |      |
| 4.1. Diseño Experimental .....                                   | 13   |
| 4.2. Colecta y mantenimiento de organismos .....                 | 14   |
| 4.3. Extirpación del ventrículo .....                            | 14   |
| 4.4. Cámara de prueba .....                                      | 15   |
| 4.5. Registro de la fuerza de contracción del ventrículo .....   | 15   |
| 4.6. Montaje .....                                               | 19   |
| 4.7. Bioensayo .....                                             | 20   |
| 4.8. Determinación de alcohol en el preparado comercial .....    | 21   |
| 4.9. Tratamiento de datos .....                                  | 23   |
| a.- Cálculo de la fuerza de contracción                          |      |
| b.- Tiempos de duración de cada momento de la sístole            |      |
| c.- Cálculo de la velocidad                                      |      |
| d.- Cálculo de la frecuencia cardíaca                            |      |
| 4.10. Análisis estadístico .....                                 | 28   |
| 5.- Resultados .....                                             | 29   |
| 5.1. Observaciones preliminares .....                            | 29   |
| 5.2. Parámetros biofísicos del ventrículo sin tratamiento .....  | 30   |
| 5.3. Efecto de la digoxina sobre la actividad mecánica del ..... | 31   |
| 6.- Discusión .....                                              | 47   |
| 7.- Conclusiones .....                                           | 58   |
| 8.- Bibliografía .....                                           | 60   |
| 9.- Apéndices .....                                              | 67   |
| Apéndice 1. ....                                                 | 68   |
| Apéndice 2. ....                                                 | 69   |
| Apéndice 3. ....                                                 | 75   |

## Lista de Figuras

|        |                                                                                                                                                                                                        |            |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Fig.1  | Representación esquemática del corazón de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> (Mawe, 1823). . . . .                                                                                                | 10         |
| Fig. 2 | Secuencia ilustrativa de la preparación del ventrículo de <i>T. stultorum</i> para su uso en el bioensayo. . . . .                                                                                     | 16,17 y 18 |
| Fig. 3 | Disposición del Sistema de Thornton para el registro de la función cardíaca (En base a Sandel, 1983). . . . .                                                                                          | 19         |
| Fig. 4 | Cámara de prueba preparada a partir de una jeringa de plástico cortada a 3 cm de altura. El volumen total de perfusión fue de 31 ml en todos los casos. . . . .                                        | 20         |
| Fig. 5 | Esquema del registro de la actividad mecánica del corazón de <i>T.stultorum</i> , obtenidos en condiciones isométricas por medio del fisiógrafo Thornton. . . . .                                      | 24         |
| Fig. 6 | Diagrama de la evolución del trazo generado por el transductor de fuerza durante la exposición del ventrículo de <i>T. stultorum</i> a digoxina $10^5$ M en un medio de agua de mar sintética. . . . . | 31         |
| Fig. 7 | Esquema de varios trazos de la actividad mecánica sobrepuestos. . . . .                                                                                                                                | 32         |

# Lista de Tablas

|                                                                                                                                                                                                                                  | pag. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1 Parámetros biofísicos del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> .                                                                                                                                        | 30   |
| Tabla 2 Valores de fuerza de contracción total ( $F_1$ ) y frecuencia cardíaca del ventrículo de <i>T. stultorum</i> suspendido en agua de mar sintética (columna A) y en agua de mar sintética con etanol al 0.05% (columna B). | 33   |
| Tabla 3 Efecto de la digoxina sobre la fuerza de contracción ( $F_1$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                          | 36   |
| Tabla 4 Efecto de la digoxina sobre la fuerza de llenado ( $F_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                              | 37   |
| Tabla 5 Efecto de la digoxina sobre la fuerza de contracción total ( $F$ ) durante la sistole del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                   | 38   |
| Tabla 6 Efecto de la digoxina sobre la velocidad de desarrollo de fuerza de contracción ( $V_1$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> suspendido en agua de mar sintética.                                 | 39   |
| Tabla 7 Efecto de la digoxina sobre la velocidad de desarrollo de fuerza de llenado ( $V_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                   | 40   |
| Tabla 8 Efecto de la digoxina sobre la duración de la contracción ( $t_1$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                     | 41   |
| Tabla 9 Efecto de la digoxina sobre la duración de llenado ( $t_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                            | 42   |
| Tabla 10 Efecto de la digoxina sobre la duración de la sistole (T) del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                              | 43   |
| Tabla 11 Efecto de la digoxina sobre la frecuencia de latido del ventrículo de la almeja pismo <i>Tivela stultorum</i> , suspendido en agua de mar sintética.                                                                    | 44   |
| Tabla 12 Tiempo de ocurrencia del máximo efecto de digoxina en la fuerza de contracción ventricular de <i>T. stultorum</i> y duración del efecto.                                                                                | 46   |

## Resumen

Se realizó la evaluación del uso potencial del corazón de la almeja pismo *Tivela stultorum* como modelo biológico en Farmacología Marina para la búsqueda de actividad cardiotónica. Se llevaron a cabo 20 experimentos, en cada uno de los cuales, se utilizó un ventrículo suspendido en agua de mar sintética y conectado a un registrador de actividad cardíaca por medio de un transductor de fuerza. Después de estabilizar el sistema se realizaron registros de los siguientes parámetros biofísicos: fuerza, velocidad y tiempo para la contracción y el llenado ventricular, las dos etapas de la sístole. Además, se midió la frecuencia cardíaca. Posteriormente, se agregó al medio el digitálico digoxina en forma de lanoxín, preparado comercial actualmente usado como cardiotónico, ajustando la concentración a  $10^{-6}$  M. A partir de este momento (tiempo cero) se realizó el registro de la actividad mecánica ventricular hasta que se observó el máximo efecto sobre la fuerza de contracción.

La comparación entre cada parámetro biofísico antes y después de la adición de lanoxín mostró que este digitálico ocasiona aumento significativo ( $P < 0.001$ ) en la fuerza y la velocidad de la concentración y el llenado ventricular, efecto conocido como inotropía positiva. En la frecuencia cardíaca, se observó una disminución significativa ( $P < 0.001$ ), es decir, ocurrió respuesta cronotrópica negativa. Con base en ambos efectos, se concluyó que el corazón de la almeja *T. stultorum* es una herramienta útil para la evaluación de materiales biológicos con uso potencial como agentes cardiotónicos de tipo digitálico.

# 1.-Introducción

La ingerencia de la farmacología en el estudio de los recursos naturales marinos como proveedores de fármacos es reciente (De Feo, 1968). Los animales y las plantas terrestres han proporcionado medicamentos al ser humano de forma tradicionalmente reconocida (Anzures, 1989). En cambio, las especies marinas llamaron la atención de la Farmacología hace apenas tres décadas (De Feo, 1968). Esto no es sorprendente, ya que los organismos marinos plantean una serie de problemas en la recolección y en la seguridad respecto al abastecimiento de material (Der Marderosian, 1968). A pesar de esta dificultad, en los últimos años se ha insistido sobre la necesaria realización de estudios sobre el potencial oceánico, estimulando con ello el interés respecto al mar como fuente de nuevos compuestos medicinales y de otros estructuralmente relacionados con fármacos ya existentes (Evans, 1991).

La obtención de medicamentos a partir de materiales biológicos requiere la aplicación de metodologías para detectar y evaluar la actividad farmacológica durante el proceso (Baslow, 1977). Muchos de los procedimientos con los que cuenta la farmacología marina son los que se han utilizado en los estudios de la farmacología de productos naturales terrestres (Martín y Padilla, 1973). Sin embargo, por su reciente origen, la Farmacología Marina se encuentra en un grado de menor avance que la Farmacología y muchas de las herramientas de esta última son demasiado sofisticadas para aquélla (De Feo, 1968).

En Farmacología Marina la mayor parte de los estudios se encuentran

en fase laboratorio (Evans, 1991); es decir, en una etapa en la que la aplicación del bioensayo es crucial para la investigación (Rossum y Hurkmans, 1986) y aunque su extrapolación al hombre es siempre una incógnita, es inaceptable la administración de fármacos a seres humanos si no existen estudios previos en animales (Planas y Rodríguez, 1988; Cohn, 1988).

Lo anterior pone de manifiesto que, en general, una de las necesidades de la Farmacología Marina para su desarrollo es la experimentación en animales. En lo particular, los estudios que se han realizado sobre el pepino de mar *Stichopus parvimensis* han generado la necesidad de un modelo biológico para la evaluación del potencial de este pepino como productor de sustancias cardioactivas (Usabiaga-Del Moral, 1990; Iñiguez-Martínez, 1990; Perez-Plascencia, 1991).

Por las características biológicas que varios autores han reportado sobre la almeja pismo *Tivela stultorum*, se puede considerar a esta especie como un buen animal de laboratorio para la investigación biomédica (Menzer, 1987). Por su respuesta bioquímica a los digitálicos, (sustancias cardioactivas de uso común), es posible suponer que este organismo o su corazón aislado constituyen un buen modelo para el estudio de las sustancias de este tipo (Cuellar-Roheri, 1991). Los resultados que se describen en el presente trabajo, permitirán determinar si la respuesta fisiológica de *T. stultorum* a compuestos digitálicos es la adecuada para la utilización de este organismo como detector de cardioactividad.



## 2 - Antecedentes

El corazón es un órgano cuyo funcionamiento mecánico depende de una serie de fenómenos electroquímicos. La contracción (sístole) y relajamiento (diástole) del músculo cardíaco (miocardio) ocurre periódicamente para promover el envío de sangre a todo el cuerpo en un continuo bombeo. Esta acción se genera por un complejo sistema de señales transmitidas al corazón, secuencia que culmina con el enlazamiento de iones ( $\text{Ca}^{++}$ ) a la troponina C, que es contráctil (Guyton, 1987).

La troponina constituye el elemento principal de las miofibrillas o unidades contráctiles de las células (miocitos) que forman las fibras del músculo cardíaco. Estos filamentos de troponina sólo se contraen cuando el calcio se une a ellas, fenómeno que ocurre si el calcio es liberado del retículo sarcoplasmático del miocito (Opie, 1991) . Para que esta liberación suceda, debe ocurrir un incremento de iones sodio ( $\text{Na}^{+}$ ) en el citoplasma del miocito (Guyton, 1987).

Durante la sístole, el ingreso de  $\text{Na}^{+}$  al miocito ocasiona una corriente eléctrica (onda despolarizante) que abre los canales de salida de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplasmático, con la consiguiente provocación de la contracción. Durante la diástole, el  $\text{Ca}^{++}$  es eliminado del miocito y ocurre la relajación del músculo (Ferrari y Opie, 1992).

Debido a la influencia del  $\text{Ca}^{++}$  en el proceso contracción-relajación, el

control de la concentración de este ión en el citoplasma es de primordial importancia. Una adecuada contracción en duración e intensidad está determinada por el aumento paulatino del  $\text{Ca}^{++}$  en este compartimento celular; mientras que una permanencia limitada en el mismo garantiza la relajación (Reiter, 1963). Uno de los principales mecanismos para la remoción del  $\text{Ca}^{++}$  del citoplasma es el intercambio sodio-calcio, que introduce  $\text{Na}^+$  a medida que transporta  $\text{Ca}^{++}$  al fluido extracelular (Weingart, 1981). Como consecuencia, al terminar la diástole existe un exceso de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma del miocito, el cual debe ser eliminado para permitir la ocurrencia de otra onda despolarizante y con ello, el inicio de un nuevo ciclo sístole-diástole.

El transporte del  $\text{Na}^+$  al exterior de la membrana citoplasmática de cualquier tipo de célula se debe al sistema fisiológico conocido como bomba de sodio-potasio (Lehninger y col., 1993). A nivel bioquímico, este proceso es realizado por la enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (adenosín trifosfatasa de sodio y potasio, activada por magnesio y dependiente de sodio y potasio; E. C. 3.6.3.1) . Por su importancia en la contracción muscular y en la regulación de la concentración de iones en las células y fluidos extracelulares, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa ha sido objeto de detallados estudios. Se le ha encontrado ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en los organismos terrestres como en los marinos y en una gran variedad de órganos y tejidos (Skou, 1957; Bonting y Col, 1961; Gibbs y Col, 1965; Saintsing y Towle, 1978; Towle 1981).

Hasta ahora es concluyente la información respecto a la función que la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa desempeña en el inicio del ciclo contracción-relajación, pero aún existe incertidumbre sobre su nivel de actividad en condiciones patológicas (Haustein y Col, 1987; Dixon y Col 1992; Shatttock y Matsuoka, 1993), aunque su papel como receptor de medicamentos ha sido ampliamente documentado (Akerá, 1981; Repke and Schonfeld, 1984; Nogrady, 1988; From y Col., 1990; Akerá y Ng, 1991). Se sabe que

los glucósidos cardíacos (llamados también digitálicos) como la digoxina, ouabaína y digitoxina, son capaces de inhibir a la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPasa y de incrementar la fuerza de contracción del corazón, efecto conocido como inotropía positiva (Aker, 1981; Goodman y Col, 1988; Schuurmans y Stekhoven, 1981; Schwartz, 1975). Se cree que esta enzima es el receptor celular de los glucósidos cardíacos y que la acción farmacológica sobre el miocardio puede ser ocasionada por la inhibición enzimática (Dixon, 1992). Este efecto inotrópico positivo de los digitálicos ha determinado su uso como medicamento desde hace más de 200 años en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Erhardt, 1987; Lewis, 1990).

A pesar de su utilidad, los glucósidos cardíacos están ubicados entre los denominados de alto riesgo, ya que provocan reacciones adversas en el 30% de los pacientes, y pueden llegar a causar la muerte en el 20 % de los casos (Davis, 1983; Aker y Ng, 1991). Este carácter dual fármaco-tóxico de los digitálicos ha motivado una intensa búsqueda de nuevas sustancias con el mismo efecto terapéutico pero con propiedades farmacocinéticas superiores, o bien, propiedades tóxicas disminuidas, factores que permitirían su uso terapéutico con mayor seguridad (Fullerton, 1982).

La evaluación de las fuentes potenciales para la obtención de nuevos fármacos requiere de la aplicación del bioensayo (Rossum y Hurkmans, 1986); es decir, necesita utilizar modelos biológicos sensibles bioquímica y fisiológicamente, que permitan apreciar los efectos farmacológicos de las sustancias a probar (Repke y Weiland, 1988; Klir y Pravenec, 1989).

La búsqueda de modelos animales para la valoración de digitálicos surgió desde la incorporación de estos compuestos a la práctica médica, ya que su uso se inició en forma de preparados galénicos o mezclas de polvos de plantas. Fagge y Stevenson hicieron experimentos con sapos y varios animales de sangre caliente (Thorp y Cobbin, 1967). Sus métodos eran simplemente pruebas de toxicidad en las

que se medía el tiempo en el que un extracto del preparado digitálico causaba la desaparición del latido cardíaco en el animal; o bien, se determinaba la cantidad de digitálico que se requería para causar la eliminación del latido en un tiempo fijo.

A principios de este siglo el método más aceptado para la valoración de glucósidos cardíacos era el de Hatcher y Brody, quienes administraban por vía intravenosa soluciones del glucósido a gatos anestesiados y registraban el tiempo y la dosis necesaria para causar paro cardíaco (Thorp y Cobbin, 1967). En cambio, Meyers (1954) y Davis y col. (1955; cit. por Thorp y Cobbin, 1967) usaron perros con insuficiencia cardíaca inducida como modelos animales para medir dosis terapéuticas.

Con base en la preparación de Langendorff, que usaba corazón de cochinillo de indias en baño de soluciones fisiológicas, se idearon las técnicas de perfusión de órganos para el estudio de cardiotónicos. La aplicación de estas técnicas fué realizada por Walker y col., Boniface y col. y Wrigth, quienes usaron corazón-pulmón de perro, corazón de perro y corazón de embrión de pollo respectivamente para evaluar la potencia de digitálicos (Thorp y Cobbin, 1967). Además del uso de corazones íntegros en perfusión fisiológica se han utilizado segmentos de músculo de diferentes regiones del corazón, como el ventrículo de rata, que fué usado para demostrar el efecto cardiotónico de la ouabaína; o bien, el músculo papilar de gato; la aurícula de cochinillo de indias o la aurícula de gallina (Thorp y Cobbin, 1967).

Tratando de demostrar el mecanismo bioquímico de la acción de los digitálicos, en los últimos 30 años el uso de modelos en esta área ha sido dedicado al estudio de la interacción de dichas sustancias con la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa en diferentes niveles de organización biológica y en una gran variedad de especies. Con este fin se han usado suspensiones y membranas de eritrocitos, segmentos de músculo cardíaco y esquelético, homogenados de cerebro, hígado y corazón, fluidos biológicos y corazones aislados, además de estudios en organismos intactos. Entre las especies

usadas se encuentra la rata, el gato, el conejo, el perro y el cochinillo de indias.

Gracias a la información obtenida por el uso de modelos hay un gran número de investigadores que aceptan que la inhibición de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  es el primer momento de la acción inotrópica positiva de los digitálicos (From y col., 1990; Akera y Ng, 1991; Dixon y col. 1992). Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad de una sustancia para inhibir a la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  no garantiza su efecto inotrópico positivo (Fullerton, 1982; Goodman y col. 1985; Repke y Weiland, 1988; Dixon, 1992). De lo anterior se desprende que el nivel de organización biológica más adecuado para el cribado de materiales en la búsqueda de nuevos agentes cardiotónicos es aquél en el que se puede observar el efecto inotrópico positivo. Si además de ello en tal sistema se pueden realizar estudios con la enzima receptora de los digitálicos, la especie resulta ser una herramienta indispensable para la investigación de relaciones estructura-actividad de agentes cardiotónicos de tipo digitálico (Repke y Weiland, 1988).

Se considera que los invertebrados son una fuente de modelos con un gran potencial, ya que constituyen la porción más grande de los recursos animales del planeta (Kaiser, 1980). En 1985 una reevaluación sobre el manejo de modelos para la investigación biomédica concluyó recomendando el uso de invertebrados como una alternativa a la utilización de mamíferos, con las mismas posibilidades de obtención de información relevante (National Research Council, 1988). El *Institute of Laboratory Animal Resources* (ILAR) define como modelo animal a aquél que permite una derivación analógica sobre las propiedades y comportamiento del fenómeno original estudiado (Klir y Pravanec, 1989).

Aunque la comprensión de la fisiología, la bioquímica y la patología de los invertebrados marinos se ha desarrollado lentamente (ILAR, 1981), el conocimiento actual sobre el corazón de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) permite

considerar a este organismo como un modelo animal en potencia. Su biología, que incluye hábitos alimenticios, características de desarrollo y sexualidad se conoce desde hace tiempo (Coe, 1947). La anatomía y fisiología del corazón de los moluscos, phylum al que pertenece *T. stultorum* han sido revisadas por varios autores (Hill y Welsh, 1966; Jones, 1983). La pesquería, el papel ecológico y los requerimientos ambientales se publicaron la década pasada (Shaw y Hassier, 1989) y en México se conoce bien su distribución geográfica (Ruiz-Dura, 1992).

El corazón de *T. stultorum* (Fig. 1) consiste en un par de aurículas laterales que descargan en un ventrículo que rodea el recto; alrededor de éste y saliendo del ventrículo, se encuentran una aorta anterior y otra posterior (Jones, 1983). La aorta anterior se abre y constituye un ensanchamiento al que se denomina bulbo aórtico. Este se encuentra ubicado frente al pericardio, membrana que rodea al corazón. Las aurículas son también membranosas, con aspecto de pequeños sacos transparentes que se insertan por su longitud media al ventrículo en dirección perpendicular al intestino. En el bulbo aórtico nacen las arterias paliales y viscerales, que proveen de sangre a todo el cuerpo del molusco. Las primeras surten al manto y el pie, mientras que las segundas se internan hacia el estómago y retornan por debajo del pericardio para conectarse con el intestino y la glándula digestiva. Básicamente el funcionamiento del sistema circulatorio es similar al del hombre: la sangre fluye alrededor del cuerpo, se oxigena en las estructuras respiratorias y retorna al corazón previo mezclado con la sangre desoxigenada que retorna de las vísceras (Booth y Mangum, 1978). La recolección de sangre venosa se realiza por medio de la vena longitudinal, la que a su vez recibe la descarga de dos sistemas colectores en el manto: la vena horizontal y la vena marginal. La vena longitudinal vacía su contenido a las branquias por medio de pequeños capilares que se conectan a la vena aferente branquial. Después de su paso por las branquias la sangre vuelve a la vena longitudinal, de donde asciende hasta la aurícula para su descarga en el ventrículo.

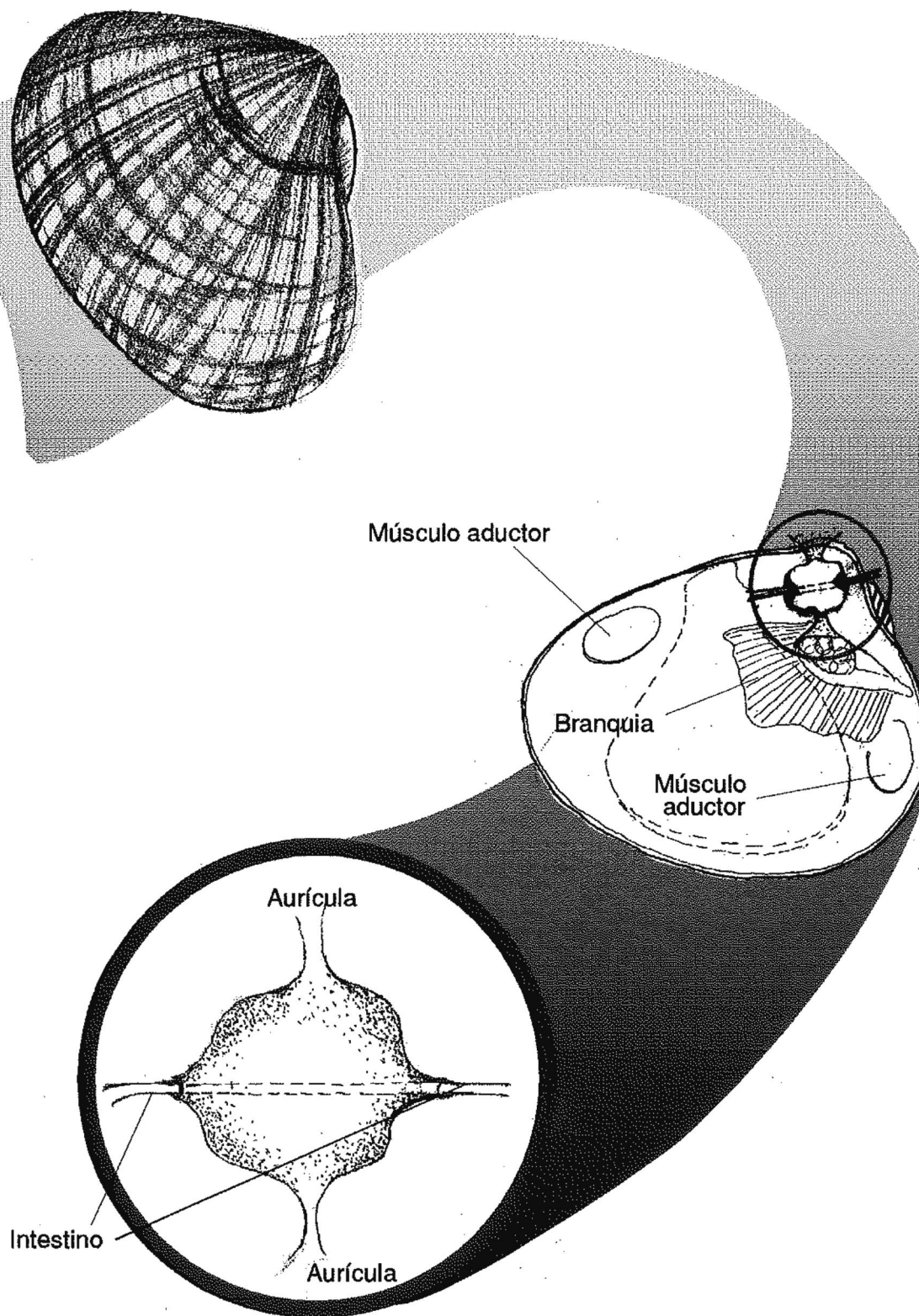


Fig. 1 .- Representación esquemática del corazón de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823)

El patrón de organización del corazón de un molusco, la secuencia de eventos hemodinámicos durante el bombeo sanguíneo y la presencia de un marcapaso natural son una "fina ilustración de la operación de la evolución convergente" hacia los vertebrados (Martin, 1980). Hill llamó la atención hacia el "impresionante paralelismo" que existe entre el corazón de los moluscos y el de los vertebrados: en ambos, el latido es miogénico, mientras que la frecuencia y amplitud son controladas por nervios reguladores extrínsecos. En ambos, una inervación colinérgica está generalmente presente y usualmente es responsable de disminuir la frecuencia y reducir la amplitud. En ambos, existen nervios cardioexcitadores, siendo la única diferencia el mediador químico presente (Hill, 1966). Más recientemente, Cuéllar (1991) demostró que la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ , receptora de los glucósidos cardíacos en vertebrados, se encuentra también en el corazón de *T. stultorum* y que, como en aquéllos, esta enzima muestra inhibición por dichas sustancias. Estas características ponen de manifiesto el potencial de la almeja pismo como modelo biológico para el estudio de la acción de los digitálicos. Sin embargo, como se señaló, sólo la respuesta inotrópica positiva demuestra la utilidad de esta especie en el cribado de la acción cardiotónica. Por lo anterior, se hace necesario estudiar el efecto de este tipo de compuestos sobre la fisiología del corazón de *T. stultorum*, con especial énfasis en los parámetros biofísicos que definen la acción mecánica del mismo.



### 3.-Objetivo

Evaluar la acción de la digoxina sobre la mecánica de la contracción muscular de la almeja *Tivela stultorum* (Mawe, 1823)

## 4.- Metodología

### 4.1. Diseño Experimental

El efecto de la digoxina sobre el ventrículo de *T. stultorum* se evaluó mediante la medición de diferentes parametros biofísicos que definen su funcionamiento mecánico durante la sístole. En todos los casos se comparó el comportamiento del ventrículo antes y después del tratamiento con digoxina. El modelo se expresa como:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

**Donde:**

$Y_{ij}$  = Diferencia entre el parámetro biofísico antes y después del tratamiento con digoxina para el i-ésimo ventrículo

$\mu$  = media general de todas las observaciones

$\tau_i$  = efecto de la digoxina

$\beta_j$  = efecto del etanol, solvente de la digoxina

$\epsilon_{ij}$  = error experimental  $N(0,1)$

## 4.2 Colecta y mantenimiento de organismos.

Los especímenes de *Tivela stultorum* fueron adquiridos por compra en el mercado negro de la ciudad de Ensenada. Inmediatamente fueron trasladados al laboratorio de Farmacología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas. Ahí fueron enjuagados y colocados en tanques de fibra de vidrio con flujo continuo de agua de mar y aireación.

Para la utilización de las almejas se dejaron transcurrir de 3 a 5 días, manteniendo un flujo de 30 ml de agua por segundo y alimentándolas con microalgas de la especie *Isochrysis galbana* o *Monochrysis lutheri*. Se midió diariamente el pH, la temperatura y la salinidad, los que se mantuvieron entre 7.4-7.8; 16°-18° y a 34 0/00 respectivamente. El nivel de agua en los tanques se controló para tener siempre 30 cm de altura.

## 4.3 Extirpación del ventrículo.

El animal fué extraído del tanque introduciendo un desarmador entre las valvas para permitir el corte del músculo aductor con tijeras de disección. Una vez expuesto el cuerpo del espécimen se practicó un corte sagital superficial a lo largo de la parte dorsal del mismo para exponer la cavidad pericardial. Con ayuda de las pinzas curvas se realizó un corte con bisturí cerca de cada una de las uniones aurícula-ventrículo y del recto anterior y posterior liberando así el ventrículo. Toda la operación

de disección (Fig. 2 a,b,c,d,e y f) fué realizada con inmersiones continuas del animal en una charola con agua de mar y burbujeo de aire para evitar la desecación y la hipoxia, basando todo el procedimiento en la técnica de Florey (Florey, 1968). Una vez eliminados todos los remanentes de aurícula e intestino se colocó el ventrículo en agua de mar sintética (Apéndice 1) y aireación hasta la recuperación del latido.

#### **4.4 Cámara de prueba**

En cada experimento el ventrículo fué colocado en una cámara de prueba de aproximadamente 40 ml de capacidad preparada con una jeringa de plástico de 2 cm de diámetro interno, cortada a una altura de 3 cm. En el interior de la misma se insertó la punta de una aguja para líquido cefalorraquídeo adaptada para sujetar al ventrículo y a la vez permitir la aireación. En la parte inferior de la jeringa se colocó un pequeño tapón de hule. En cada experimento se colocó el volumen adecuado de agua de mar sintética (Apéndice 1), a 16°-18° centígrados, y se aireó durante 1 hora antes de introducir el ventrículo, ajustando un burbujeo continuo pero suave.

#### **4.5 Registro de la fuerza de contracción del ventrículo.**

La señal mecánica de contracción se capturó con el transductor de fuerza Thornton tipo 420, el que se conectó a una unidad de amplificación de señal Thornton tipo 414/400 adaptada al sistema registrador Thornton tipo 462 de pluma electromagnética. El efecto se imprimió sobre papel calibrado termosensible, que grafica la deflexión de la pluma en las ordenadas y el tiempo en las abscisas (Fig. 3)



Fig. 2a . - *Tivela stultorum*

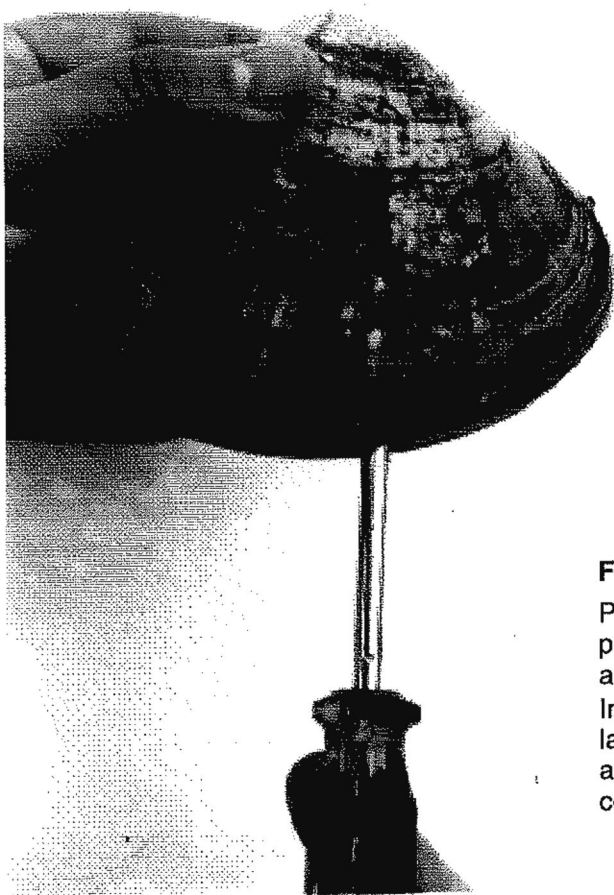


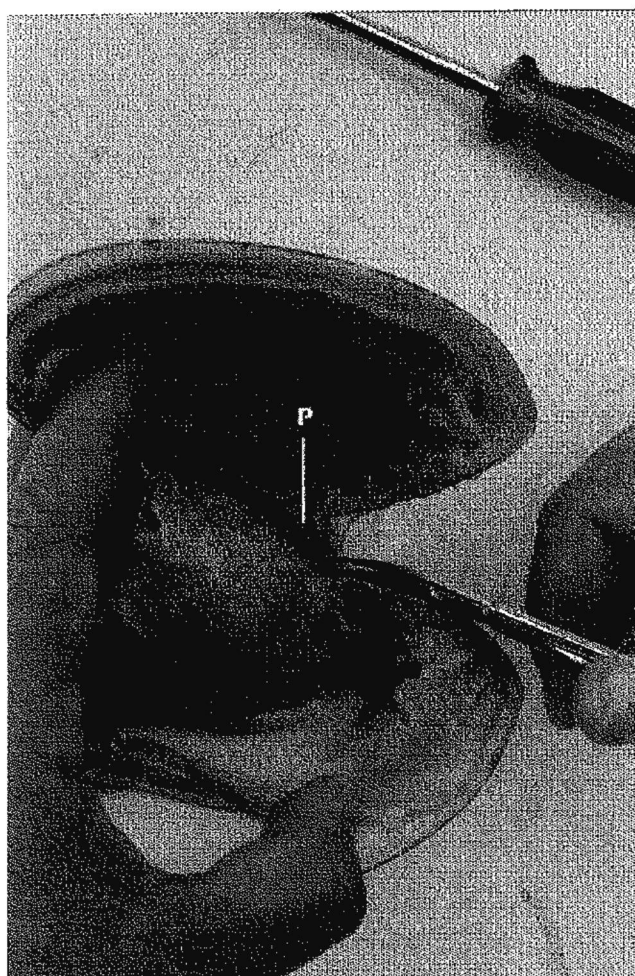
Fig. 2b . -

Primer momento en la preparación del ventrículo de la almeja para su uso en el bioensayo. Introducción de un desarmador entre las valvas al momento de extraer al animal del acuario para facilitar el corte del músculo aductor.



**Fig. 2c . -**

Corte del músculo aductor  
de la almeja pismo *T. stultorum*.

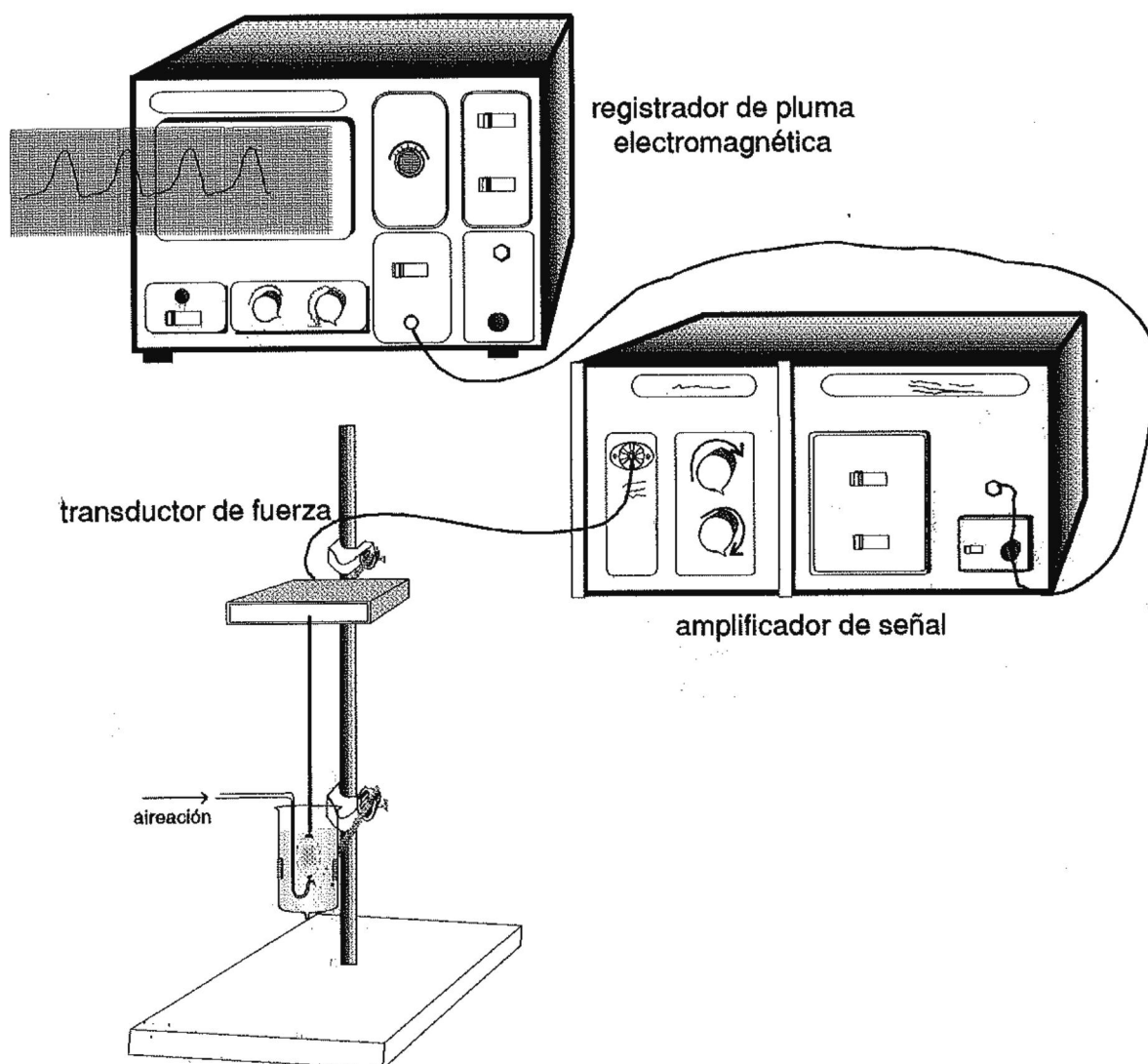


**Fig. 2d. -**

Corte sagital para exponer  
el pericardio, membrana que  
envuelve el corazón (marca-  
da como P).



Fig. 2e y 2f.- Localización del corazón en *Tricla stultorum*.  
A = Aurículas I = Intestino

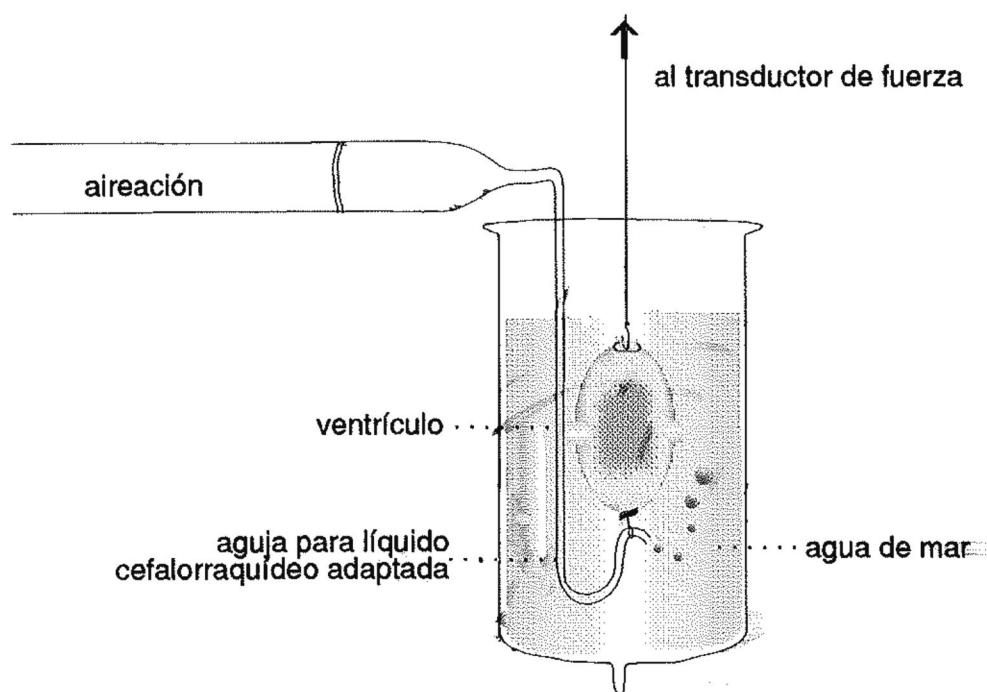


**Fig. 3.-** Disposición del Sistema Thornton para el registro de función cardíaca.  
(En base a Sandel, 1983)

#### 4.6 Montaje.

Se colocó el ventrículo en la cámara de prueba y se sujetó con un pequeño gancho a la aguja y con otro al transductor de fuerza (Fig. 4) ajustando la tensión hasta un registro inicial de aproximadamente 1.5 cm de altura con una sensibilidad vertical del amplificador de 10 a 50 mV/cm.





**FIG 4.-** Cámara de prueba preparada a partir de una jeringa de plástico cortada a 3 cm de altura. El volumen total de perfusión fue de 31 ml en todos los casos.

#### 4.7 Bioensayo.

Cada ventrículo extirpado fué utilizado para llevar a cabo un experimento. En cada experimento se permitió que el sistema se estabilizara después de introducido el ventrículo en la cámara de prueba, hasta dar una lectura constante en la fuerza de contracción. Después de alcanzar este equilibrio, se realizó la adición de la solución de prueba, preparada a partir de digoxina distribuida comercialmente como ampollitas inyectables de lanoxin.

En el bioensayo preliminar se añadieron los volúmenes necesarios de agua de mar y solución inyectable para tener concentraciones finales de digoxina de  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M y  $10^{-4}$  M en la cámara de prueba. Además, se observó el efecto de la aireación en la frecuencia cardíaca.

Una vez determinada la concentración más adecuada de lanoxin para la observación de efecto sobre los parámetros biofísicos, se realizaron 20 experimentos en bioensayos definitivos. En cada uno de estos experimentos se ajustó la concentración de digoxina a  $10^{-5}$  M en el medio. En cada caso se registró el efecto de la fuerza de contracción del ventrículo después de la adición, salvo en las preparaciones usadas como blanco. Después de cada experimento se pesó el ventrículo, previo secado con papel filtro y se midió la longitud tomando como extremos los puntos de la unión aurículo-ventricular. El volumen final del medio de perfusión en todos los casos fué de 31 ml.

Para determinar la posible acción del solvente (etanol) presente en el preparado comercial sobre el ventrículo de *T. stultorum* se realizaron 3 experimentos en los que se sometió éste a una solución preparada con etanol en agua de mar sintética. En cada bioensayo se reguló la cantidad de alcohol para tener en el medio de perfusión una concentración final de 0.05% con base en la cuantificación de etanol en el preparado comercial. El registro del comportamiento cardíaco se realizó durante 45 minutos

#### **4.8 Determinación de alcohol en el preparado comercial.**

Se utilizó el método de Johnson (Umbreit y col, 1972) que se basa en la decoloración que produce el alcohol de una muestra sobre una solución de dicromato de potasio. ( $K_2Cr_2O_7$ ) por transformación de Cr(VI) a Cr (III) en medio ácido. Se preparó una curva de calibración con estándares de dicromato de potasio abarcando un rango de concentraciones desde 1 hasta 10 mg % ajustados a pH 4 con ácido sulfúrico. Cada punto de la curva de calibración se obtuvo graficando la absorbancia a 660 nm de 5 ml

de solución de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg % en las ordenadas y la concentración correspondiente en las abscisas. Para conocer la cantidad de etanol en el preparado comercial, se diluyó 1 ml de éste con 3 ml de agua destilada. Se tomó 1 ml de esta solución y se mezcló con 4 ml de solución de dicromato de potasio al 12.5 mg % (pH 4), para tener una concentración final de 10mg % de dicromato de potasio. Se dejó reposar durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 660 nm. La diferencia entre la absorbancia del dicromato de potasio sin adición y con adición de etanol sirvió para calcular, con base en la curva de calibración, la cantidad de dicromato de potasio que se consumió por el alcohol. Como la cantidad de alcohol en la muestra es equivalente al dicromato de potasio consumido, se aplicaron las fórmulas siguientes para calcular la cantidad de etanol presente en los 5 ml de mezcla; es decir, en 1 ml de muestra de solución diluída del vehículo.

$$K_{\text{cons}} = K_{\text{inicial}} - K_{\text{final}}$$

**Donde:**

**K cons** = mg de  $K_2Cr_2O_7$  consumidos por reacción de óxido-reducción en 5 ml de mezcla solución etanólica: solución de  $K_2Cr_2O_7$  al 12.5 mg % (1:4).

**K inicial** = mg de  $K_2Cr_2O_7$  presentes en 5 ml de mezcla de solución de  $K_2Cr_2O_7$  al 10 mg %

**K final** = mg de  $K_2Cr_2O_7$  presentes en 5 ml de mezcla solución etanólica: solución de  $K_2Cr_2O_7$  al 12.5 mg % (1:4) después de ocurrida la reacción.

Además:

$$K_{\text{final}} = C_1 A_x V/A_1 \times 100$$

Donde:

$C_1$  = Concentración de  $K_2CrO_7$  en la mezcla de reacción (10 mg %)

$A_x$  = Absorbancia de la mezcla de reacción etanol:  $K_2CrO_7$

$V$  = Volumen de la mezcla de reacción

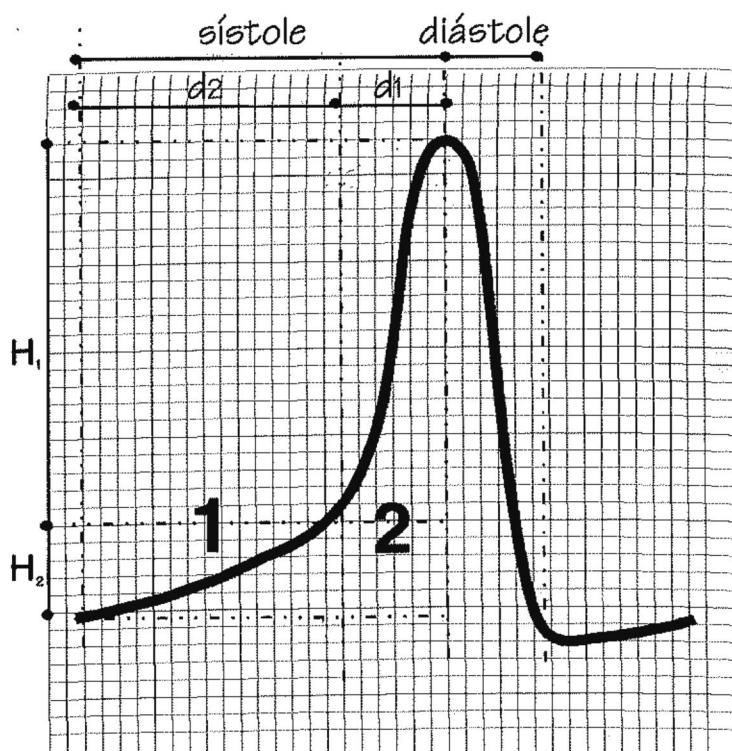
$A_1$  = Absorbancia del estándar de  $K_2CrO_7$  al 10 mg %

Para transformar  $K_{\text{cons}}$  a etanol se tomó en cuenta que 2.130 mg de  $K_2CrO_7$  son equivalentes a 1 mg de etanol, por la reacción de óxido-reducción que ocurre.

#### 4.9 Tratamiento de datos.

La figura 5 muestra el diagrama esquemático de un registro típico del ventrículo de *T. stultorum* biológicamente funcional en medio de agua de mar. En dicho esquema se señalan los diferentes parámetros que se analizaron en este estudio.





La línea azul gruesa representa el trazo que realiza la pluma del registrador. La señal mecánica (fuerza) del corazón es transformada por el transductor en señales eléctricas que causan movimientos verticales en la pluma. El movimiento del papel ocasiona la forma típica que se observa. Las alturas  $H_1$  y  $H_2$  se utilizan para calcular la fuerza ejercida por el corazón; a mayor fuerza ejercida por el corazón en el transductor, mayor altura del trazo. Las distancias  $d_1$  y  $d_2$  sirven de base para evaluar el tiempo que tarda en ocurrir el fenómeno.

**1 Momento de llenado del ventrículo.** Ocurre en un tiempo  $t_2$  a una velocidad  $V_2$  y desarrolla una fuerza  $f_2$  para resistir la presión que el líquido entrante ejerce contra la pared ventricular.

**2 Momento de la contracción.** El ventrículo, una vez que se ha llenado de fluido, se contrae para ejercer su función de bombeo y expulsarlo. Se desarrolla una fuerza  $F_1$  a una velocidad  $v_1$  y un tiempo  $t_1$ .

**Fig. 5.-** Esquema del registro de la actividad mecánica del corazón de *T. stultorum*, obtenido en condiciones isométricas por medio de un fisiógrafo Thornton.

La evaluación del efecto del digitálico se basó en los cambios que éste

ocasionó sobre dos momentos de la sístole. Uno de ellos fue el llenado del ventrículo que ocurre en un tiempo  $t_2$  y durante el cual las paredes del ventrículo ejercen una fuerza  $F_2$  para resistir la presión que se genera por el fluido que ingresa al ventrículo (Fig. 5). El otro momento analizado fué la segunda parte de la sístole, que consiste en el vaciado del ventrículo por contracción (acortamiento) de las fibras cardíacas, por lo que este proceso es propiamente denominado contracción cardíaca. La contracción ocurre en un tiempo  $t_1$  y se desarrolla una fuerza  $F_1$ , la que generalmente es mayor que  $F_2$ . A continuación se describe la forma en que se obtuvieron los valores de los parámetros mencionados y el método por el cual a partir de ellos se obtuvieron las velocidades de desarrollo de fuerza durante las dos etapas de la sístole. Todos los valores de fuerza que se reportan como efecto representan la máxima fuerza que un ventrículo en estudio desarrolló durante su exposición al digitálico.

#### a) Cálculo de la fuerza de contracción.

Sobre el trazo obtenido por el fisiógrafo se midió la altura máxima alcanzada por la pluma electromagnética en cada momento de la sístole (Fig. 5). Posteriormente se aplicó el factor de escala del sistema de registro para convertir la amplitud del trazo a fuerza de contracción según la expresión:

$$F_c = S \times H$$

Donde:

**F<sub>c</sub>**= Fuerza de contracción en gramos.

**H**= Altura del trazo en centímetros

El cálculo del factor de escala del sistema se realizó de acuerdo a su manual de uso por medio de la expresión:

$$S = 50 \times V_a$$

**Donde:**

$S$  = Factor de escala para el registro en gramos de tensión del transductor de fuerza por centímetro de deflexión vertical de la pluma del registrador.

$50$  = Factor de calibración para el transductor de fuerza Thornton tipo 420 en gramos/volt.

$V_a$  = Sensibilidad vertical del registrador en volts/centímetro

De esta forma se obtuvieron: la fuerza de contracción ventricular ( $F_1$ ) y la fuerza inicial de llenado del ventrículo ( $F_2$ ). La fuerza total de contracción ( $F_t$ ) se obtuvo por la suma de las anteriores.

#### **b) Tiempos de duración de cada momento de la sístole.**

El tiempo de la duración de la contracción ventricular ( $t_1$ ) y el tiempo de duración del llenado ( $t_2$ ) se calcularon con base en la velocidad del tambor de registro del modulo Thornton tipo 462. En todos los experimentos la velocidad se ajustó a 5mm/seg, por lo que para calcular el tiempo transcurrido se midió la distancia ( $d$ ) entre los puntos de inflexión de la curva (Fig. 5) y se transformó a segundos o minutos según la ecuación:

$$t = d/5$$

**Donde:**

**d** = Distancia en mm.

**t** = Tiempo en segundos

El tiempo total de duración de la sístole ( $t_1$ ), que abarca la contracción y el llenado ventricular se obtuvo sumando  $t_1$  y  $t_2$ .

### **c) Cálculo de la velocidad.**

La velocidad del desarrollo de la fuerza del ventrículo se obtuvo con base en el índice de contracción del miocardio usado por Siegel y Sonnenblick (1963) que divide el incremento de la fuerza ( $\Delta F_1$ ) entre el tiempo que tarda este fenómeno ( $\Delta t_1$ ) (Fig.5). De la misma manera se calculó la velocidad de llenado del ventrículo usando los valores correspondientes de  $\Delta F_2$  y  $\Delta t_2$ .

### **d) Cálculo de la frecuencia cardiaca.**

A partir del trazo (Fig. 5), se obtuvo el tiempo transcurrido entre dos ciclos sístole-diástole y se aplicó la fórmula del manual de uso del sistema Thornton:

$$f = 2/t \times 60 \text{ seg}$$

**Donde:**

**f**= Frecuencia cardíaca en latidos por minuto

**t**= Tiempo en segundos, calculado como se describe en b)



#### **4.10 Análisis estadístico.**

Para este análisis se utilizaron 20 valores; cada uno de ellos obtenido del ventrículo de un organismo.

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad en la distribución de los valores de cada parámetro biofísico fuerza de contracción sin tratamiento.

Para evaluar el efecto del lanoxin sobre cada parámetro biofísico se probó la hipótesis nula de que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos antes y después del tratamiento aplicando una prueba t para la diferencia entre dos medias, con base en observaciones apareadas. Se utilizó un nivel de significancia del 5% (Marquez-De Cantú, 1991). En todos los casos se comparó el valor del parámetro en el momento inmediatamente anterior a la adición de la digoxina con el máximo efecto observado.

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa CSS.Statistica Versión 3.0.

## 5.-Resultados

### 5.1.Observaciones preliminares

Se observó que las aurículas aumentan considerablemente de volumen y frecuencia de latidos por minuto al ser expuestas al aire por corte del pericardio, para volver a su tamaño y ritmo normal en 30-60 seg. Por lo general, la aurícula sufre rompimiento durante la disección.

El ventrículo de *T. stultorum* presenta una considerable resistencia a la hipoxia, pudiendo sobrevivir por lo menos 4 hrs. en un medio sin aireación, aunque se observa en él ligera bradicardia. En condiciones de aireación constante, esta resistencia es mucho mayor y algunos ventrículos mantienen su latido al menos durante 24 hrs. si se les coloca en suficiente volumen de agua de mar.

De las tres concentraciones de digoxina probadas, sólo la de  $1 \times 10^{-5}$  M ocasionó cambios cuya lectura pudiera realizarse adecuadamente en el trazo del registrador. La concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M causó arresto cardíaco y la de  $1 \times 10^{-6}$  M ejerció un efecto tan leve, que no se obtuvieron registros consistentes. Por esta razón, la concentración usada para los bioensayos definitivos fue de  $1 \times 10^{-5}$  M de digitálico.

## 5.2. Parámetros biofísicos del ventrículo sin tratamiento

En la tabla 1 se muestran los valores de la fuerza de contracción ( $F_1$ ), fuerza de llenado ( $F_2$ ), tiempo de contracción ( $t_1$ ), tiempo de llenado ( $t_2$ ) y las correspondientes velocidades ( $V_1$  y  $V_2$ ), así como la fuerza total durante la sístole ( $F_t$ ) y la frecuencia cardíaca. Asimismo, se incluyen los valores promedio de peso y longitud. El número de mediciones se refiere a la cantidad de ventrículos que fueron utilizados. Por lo tanto, cada medición representa un organismo.

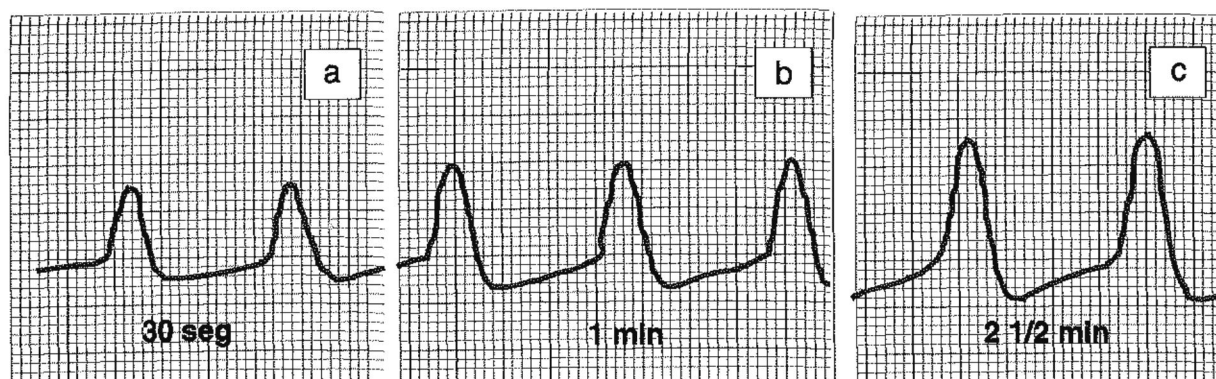
**Tabla 1**

Parámetros biofísicos del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*. Cada medición representa un ventrículo suspendido en agua de mar sintética.

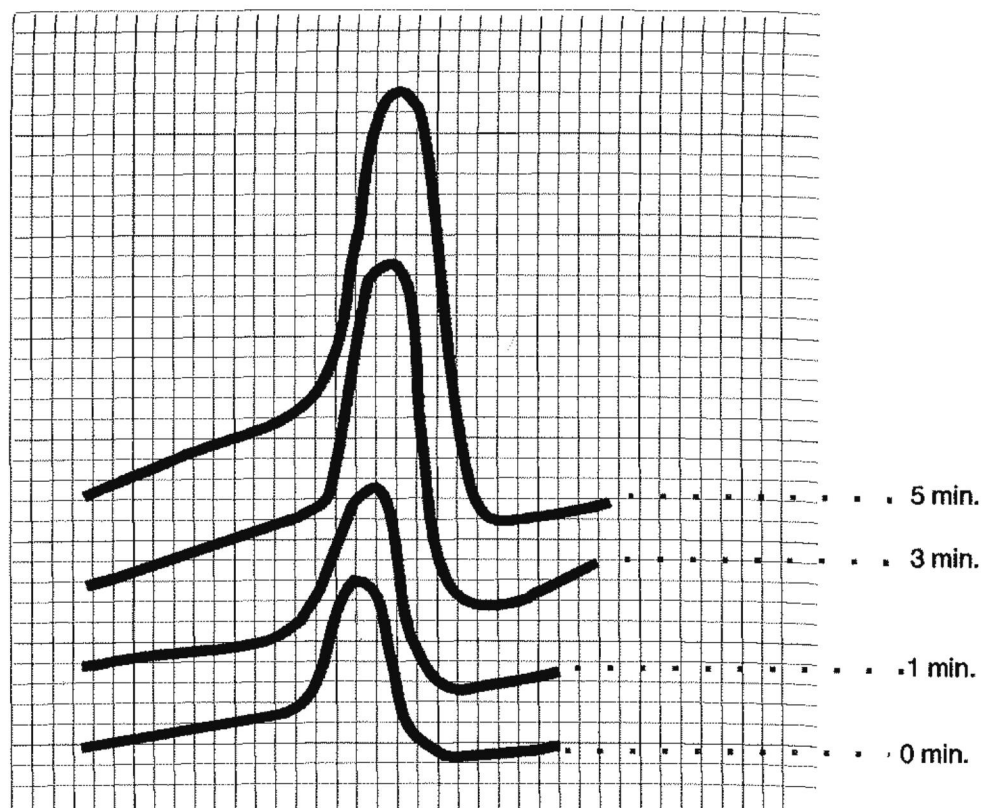
| PARAMETRO                                                              | PROMEDIO | DESVIACION<br>ESTANDAR | NUMERO<br>DE<br>MEDICIONES |
|------------------------------------------------------------------------|----------|------------------------|----------------------------|
| Peso (g)                                                               | 0.24     | 0.05                   | 25                         |
| Longitud (cm)                                                          | 1.40     | 0.17                   | 25                         |
| Fuerza de contracción $F_1$ (g)                                        | 2.67     | 1.03                   | 20                         |
| Fuerza de llenado $F_2$ (g)                                            | 1.40     | 0.75                   | 20                         |
| Fuerza total, $F_t$ (g)                                                | 4.00     | 1.50                   | 20                         |
| Tiempo de contracción, $t_1$ (seg)                                     | 0.79     | 0.29                   | 20                         |
| Tiempo de llenado, $t_2$ (seg)                                         | 2.66     | 0.97                   | 20                         |
| Velocidad de desarrollo de fuerza<br>durante el llenado, $V_1$ (g/seg) | 3.375    | 1.70                   | 20                         |
| Velocidad de desarrollo de fuerza<br>durante el llenado, $V_2$ (g/seg) | 0.538    | 0.30                   | 20                         |
| Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)                                   | 11.0     | 2.00                   | 20                         |

### 5.3. Efecto de la digoxina sobre la actividad mecánica del ventrículo

La fig. 6 muestra un registro obtenido directamente del registrador. En él se observa la evolución de los parámetros de fuerza, tiempo y velocidad bajo el efecto del digitálico. La respuesta más notoria fue la de incremento en la altura máxima del pico que representa la fuerza de contracción. Sin embargo, también a simple vista se observó aumento en la fuerza de llenado. Ambas respuestas son fácilmente observables en la figura 7, que representa esquemáticamente una serie de ciclos sístole-diástole sobrepuestos, obtenidos del registro en diferentes momentos después de añadir lanoxin a la cámara de prueba.



**Fig. 6.-** Diagrama de la evolución del trazo generado por el transductor de fuerza durante la exposición del ventrículo de *T. stultorum* a digoxina  $10^{-5}$  M en un medio de agua de mar sintética. Cada sección (a, b y c) contiene el trazo obtenido después de diferentes tiempos de exposición.



Cada registro fue obtenido del mismo ventrículo bajo experimentación, pero después de haber agregado digoxina al medio de perfusión. El tiempo después de la adición se señala sobre la figura.

**Fig.7.-**Esquema de varios trazos de la actividad mecánica superpuestos.

La tabla 2 muestra los valores de fuerza de contracción y frecuencia cardíaca obtenidos antes y después del tratamiento con solvente. Dada la escasa interacción entre éste y el ventrículo, los registros obtenidos en los ensayos definitivos se evaluaron sin ajustes.

**Tabla 2**

Valores de fuerza de contracción total ( $F_t$ ) y frecuencia cardíaca del ventrículo de *T. stultorum* suspendido en agua de mar sintética (columna A) y en agua de mar al que se le añadió etanol al 0.05% (columna B); cada experimento representa el ventrículo de un organismo. Los valores de la columna B se registraron después de 45 minutos de exposición al medio alcohólico.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | Fuerza de contracción total<br>(gramos)               |       | Frecuencia cardíaca<br>(latidos/min) |      |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|------|
|                       | A                                                     | B     | A                                    | B    |
| 1                     | 2.75                                                  | 2.375 | 10.3                                 | 10.1 |
| 2                     | 3.25                                                  | 3.125 | 10.5                                 | 10.4 |
| 3                     | 3.875                                                 | 3.125 | 11                                   | 10.9 |
|                       | t calc = 2.29                                         |       | t calc = 3.91                        |      |
|                       | t teórica = 4.303<br>para g.l. = 2<br>$\alpha = 0.05$ |       |                                      |      |

A= Valores en agua de mar sintética

B= Valores tomados 45 minutos después de la adición de etanol al 0.05 g %.

En las Tablas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 y 11 se registran los valores individuales de los parámetros de fuerza, velocidad, tiempo y frecuencia cardíaca para cada ventrículo antes y después del tratamiento con digoxina. Nótese que en cada tabla se registran tres columnas de valores. La columna A es el valor del parámetro

registrado cuando el ventrículo se encontraba suspendido en agua de mar sintética, sin tratamiento alguno, cada valor que aparece en esta columna fué utilizado como control para sí mismo. La columna B contiene el valor registrado cuando se alcanzó el máximo efecto del digitálico sobre el parámetro en cuestión. La última columna, titulada "porcentaje de cambio" se refiere a la diferencia entre el valor B y el valor A, expresado en términos de porcentaje tomando el valor A como 100%. En todas las tablas en las que se realizó comparación por análisis estadístico, se incluyen los valores calculados para la prueba utilizada y el correspondiente valor de tablas del mismo.

Como se observa en la tabla 3, todos los ventrículos de *T. stultorum* aumentaron su capacidad de contracción ( $F_1$ ) por efecto de la digoxina. Según se aprecia, el ventrículo de menor respuesta incrementó su fuerza en un 28% con respecto a su fuerza sin tratamiento, mientras que aquel que fué más sensible aumentó en un 320%.

Para la fuerza de llenado ventricular ( $F_2$ , Tabla 4) no se obtuvo respuesta en todos los casos. Dos ventrículos permanecieron inalterados durante toda la exposición al digitálico, pero en la mayoría de los casos se observaron aumentos, hasta del 200%.

La fuerza total de la sístole ( $F_t$ , Tabla 5), al igual que la  $F_1$ , aumentó en todos los casos, pero a diferencia de ésta los incrementos fueron menores. El mínimo aumento observado fué del 16% y el máximo fué del 266%.

Las velocidades de desarrollo de fuerza,  $V_1$  y  $V_2$  que se observan en la columna B de las tablas 6 y 7, respectivamente, representan el máximo valor de velocidad alcanzado por cada ventrículo en tratamiento.

Cabe hacer notar que, por lo general, desde el momento en que se agregó el digitálico hasta que se llegó al máximo valor de fuerza, la mayoría de los ventrículos sufrió una serie de incrementos y decrementos de  $V_1$  y  $V_2$ . Este comportamiento difiere del observado en las fuerzas correspondientes, las que evolucionaron con un aumento continuo desde la adición del digitálico hasta que el ventrículo llegó al máximo de contracción. Los valores de efecto máximo para  $V_1$  variaron desde 14 hasta 226% entre experimentos. Para  $V_2$ , el ventrículo con menor porcentaje de cambio mostró un 7% y el mayor fué de 210%.

En lo que respecta a los tiempos  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ , no sólo se observó una serie de incrementos y decrementos durante el desarrollo de la fuerza máxima de contracción en cada experimento, sino que algunos ventrículos llegaron al efecto máximo con tiempos más cortos que el valor control. Como se observa en las tablas 8, 9 y 10, se encontró esta respuesta en tres, cinco y tres casos para  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$  respectivamente.

La tabla 11 consigna la frecuencia cardiaca medida en el momento de aparición del máximo efecto en la contracción del miocardio con excepción de uno, se observó disminución del número de latidos por minuto en los ventrículos, por lo que se reportan cambios con valores negativos. Dentro del grupo que mostró respuesta, se encontraron decrementos tan pequeños como 4.3% y el mayor efecto ocasionado por el digitálico fué una disminución de 48%.



### Tabla 3

Efecto de la digoxina sobre la fuerza de contracción ( $F_1$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendido en agua de mar sintética, los valores se dan en gramos. Cada experimento representa el ventrículo de un organismo.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 2.75  | 4.25  | 54             |
| 2                     | 2.00  | 4.00  | 100            |
| 3                     | 0.25  | 1.05  | 320            |
| 4                     | 5.00  | 7.50  | 50             |
| 5                     | 4.25  | 5.75  | 35             |
| 6                     | 2.75  | 3.75  | 36             |
| 7                     | 1.00  | 1.55  | 55             |
| 8                     | 2.00  | 4.00  | 100            |
| 9                     | 2.50  | 4.25  | 70             |
| 10                    | 2.125 | 3.45  | 38             |
| 11                    | 3.125 | 4.625 | 48             |
| 12                    | 2.10  | 3.225 | 53             |
| 13                    | 3.25  | 4.625 | 42             |
| 14                    | 3.75  | 6.50  | 73             |
| 15                    | 2.875 | 4.37  | 52             |
| 16                    | 2.25  | 3.75  | 66             |
| 17                    | 3.0   | 4.125 | 37             |
| 18                    | 2.0   | 3.375 | 68             |
| 19                    | 3.0   | 4.00  | 33             |
| 20                    | 3.5   | 4.50  | 28             |

A= Valores de fuerza de contracción sin tratamiento.

B= Valores de fuerza de contracción máxima que puede desarrollar en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina.

t calculada = 12.04

t teórica = 2.09  
para g.l. = 19

$\alpha$  = 0.05

**Tabla 4**

Efecto de la digoxina sobre la fuerza de llenado ( $F_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendido en agua de mar sintética, los valores se dan en gramos. Cada experimento representa el ventrículo de un organismo.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 0.50  | 0.75  | 50             |
| 2                     | 0.50  | 1.50  | 200            |
| 3                     | 0.20  | 0.60  | 200            |
| 4                     | 1.50  | 2.75  | 83             |
| 5                     | 1.25  | 1.87  | 49             |
| 6                     | 0.875 | 1.50  | 71             |
| 7                     | 0.40  | 0.75  | 87             |
| 8                     | 1.00  | 1.62  | 62             |
| 9                     | 2.25  | 3.25  | 44             |
| 10                    | 1.375 | 1.75  | 27             |
| 11                    | 1.75  | 2.625 | 50             |
| 12                    | 0.90  | 1.625 | 80             |
| 13                    | 2.25  | 3.50  | 55             |
| 14                    | 2.875 | 2.875 | 0              |
| 15                    | 1.125 | 1.75  | 55             |
| 16                    | 2.25  | 3.75  | 66             |
| 17                    | 1.75  | 2.75  | 57             |
| 18                    | 1.125 | 2.50  | 122            |
| 19                    | 1.50  | 2.375 | 58             |
| 20                    | 2.75  | 2.75  | 0              |

A= Valores de fuerza de llenado sin tratamiento

B= Valores de fuerza de llenado máxima que puede desarrollar en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-6} M$  de digoxina.

t calculada = 7.6319

t teórica = 2.09  
para g.l. = 19

$\alpha = 0.05$

## Tabla 5

Efecto de la digoxina sobre la fuerza de contracción total ( $F_t$ ) durante la sístole del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendido en agua de mar sintética, los valores de dan en gramos. Cada experimento representa el ventrículo de un organismo. La fuerza de contracción total abarca la fuerza ejercida por el ventrículo durante el llenado<sup>1</sup> y la fuerza desarrollada durante la contracción.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 3.25  | 5.00  | 53             |
| 2                     | 2.50  | 5.50  | 120            |
| 3                     | 0.45  | 1.65  | 266            |
| 4                     | 6.25  | 10.25 | 64             |
| 5                     | 5.50  | 7.62  | 38             |
| 6                     | 3.625 | 5.25  | 44             |
| 7                     | 1.40  | 2.30  | 64             |
| 8                     | 3.00  | 5.62  | 87             |
| 9                     | 4.75  | 7.50  | 57             |
| 10                    | 3.50  | 5.20  | 48             |
| 11                    | 4.875 | 7.25  | 48             |
| 12                    | 3.00  | 4.85  | 61             |
| 13                    | 5.50  | 8.125 | 47             |
| 14                    | 6.625 | 9.375 | 41             |
| 15                    | 4.00  | 6.12  | 53             |
| 16                    | 4.50  | 7.50  | 37             |
| 17                    | 4.75  | 6.875 | 44             |
| 18                    | 3.125 | 5.875 | 88             |
| 19                    | 4.50  | 6.375 | 41             |
| 20                    | 6.25  | 7.25  | 16             |

A= Valores de fuerza de contracción total sin tratamiento

B= Valores de fuerza de contracción total máxima que puede desarrollar  
en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina

t calculada = 12.985

t teórica = 2.09  
para g.l. = 19

$\alpha = 0.05$

**Tabla 6**

Efecto de la digoxina sobre la velocidad de desarrollo de fuerza de contracción ( $V_f$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum* suspendido en agua de mar sintética, los valores se dan en gramos/seg. En cada experimento se utilizó el ventrículo de un organismo. El valor de velocidad representa la rapidez con que el ventrículo aumenta su capacidad de carga.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 5.50  | 8.75  | 59             |
| 2                     | 3.33  | 5.96  | 78             |
| 3                     | 0.20  | 0.81  | 305            |
| 4                     | 5.55  | 10.71 | 92             |
| 5                     | 7.00  | 10.50 | 50             |
| 6                     | 5.50  | 7.50  | 36             |
| 7                     | 0.60  | 2.25  | 275            |
| 8                     | 2.22  | 4.68  | 110            |
| 9                     | 2.08  | 2.75  | 32             |
| 10                    | 2.50  | 2.875 | 15             |
| 11                    | 4.46  | 6.875 | 54             |
| 12                    | 3.50  | 4.28  | 22             |
| 13                    | 2.03  | 6.62  | 226            |
| 14                    | 4.68  | 6.00  | 28             |
| 15                    | 4.79  | 6.07  | 26             |
| 16                    | 1.875 | 3.25  | 73             |
| 17                    | 2.50  | 4.00  | 60             |
| 18                    | 2.00  | 3.375 | 68             |
| 19                    | 3.75  | 4.30  | 14             |
| 20                    | 3.50  | 4.50  | 28             |

A= Valores de velocidad de contracción sin tratamiento

B= Valores de velocidad de contracción máxima que puede desarrollar en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina

t calculada = 6.435

t teórica = 2.09

para g.l. = 19

$\alpha = 0.05$



## Tabla 7

Efecto de la digoxina sobre la velocidad de desarrollo de fuerza de llenado ( $V_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendido en agua de mar sintética, los valores se dan en gramos/seg. En cada experimento se utilizó el ventrículo de un organismo. El valor de velocidad representa la rapidez con que el ventrículo aumenta su capacidad de carga.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 0.25  | 0.416 | 66             |
| 2                     | 0.20  | 0.62  | 210            |
| 3                     | 0.035 | 0.045 | 28             |
| 4                     | 0.357 | 0.78  | 118            |
| 5                     | 0.568 | 0.77  | 35             |
| 6                     | 0.437 | 1.25  | 186            |
| 7                     | 0.16  | 0.26  | 62             |
| 8                     | 0.416 | 0.81  | 94             |
| 9                     | 0.56  | 1.20  | 114            |
| 10                    | 0.59  | 0.73  | 23             |
| 11                    | 1.52  | 1.52  | 0              |
| 12                    | 0.50  | 0.855 | 33             |
| 13                    | 0.625 | 0.91  | 45             |
| 14                    | 1.10  | 1.10  | 0              |
| 15                    | 0.375 | 0.62  | 28             |
| 16                    | 0.58  | 0.687 | 18             |
| 17                    | 0.625 | 0.68  | 8              |
| 18                    | 0.401 | 0.48  | 19             |
| 19                    | 0.71  | 0.76  | 7              |
| 20                    | 0.76  | 0.88  | 15             |

A= Valores de velocidad de llenado sin tratamiento

B= Valores de velocidad de llenado máxima que puede desarrollar en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina

t calculada = 4.66

t teórica = 2.09  
para g.l. = 19

$\alpha = 0.05$

## Tabla 8

Efecto de la digoxina sobre la duración de la contracción ( $t_1$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendida en agua de mar sintética, los valores se dan en seg. Se utilizó un ventrículo por experimento. Cada valor es el tiempo que duró el fenómeno de la contracción.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A    | B    | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|------|------|----------------|
| 1                     | 0.50 | 0.60 | 10             |
| 2                     | 0.60 | 0.90 | 50             |
| 3                     | 1.20 | 1.60 | 33             |
| 4                     | 0.90 | 0.60 | -33            |
| 5                     | 0.60 | 0.65 | 8              |
| 6                     | 0.50 | 1.00 | 100            |
| 7                     | 0.60 | 0.90 | 50             |
| 8                     | 0.90 | 1.10 | 22             |
| 9                     | 1.20 | 2.00 | 66             |
| 10                    | 0.90 | 1.20 | 33             |
| 11                    | 0.70 | 1.00 | 42             |
| 12                    | 0.60 | 1.00 | 66             |
| 13                    | 1.60 | 0.70 | -56            |
| 14                    | 0.80 | 1.20 | 50             |
| 15                    | 0.60 | 1.20 | 50             |
| 16                    | 1.20 | 1.40 | 16             |
| 17                    | 1.20 | 0.90 | -25            |
| 18                    | 1.00 | 1.20 | 20             |
| 19                    | 0.80 | 1.30 | 62             |
| 20                    | 1.00 | 1.20 | 20             |

A= Valores de tiempo de contracción sin tratamiento

B= Valores de tiempo de duración de la contracción de máxima  
fuerza desarrollada por el ventrículo en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M  
de digoxina.

$t_{calculada} = 2.56$   
 $t_{teórica} = 2.09$   
 para g.l. = 19  
 $\alpha = 0.05$

**Tabla 9**

Efecto de la digoxina sobre la duración de llenado ( $t_2$ ) del ventrículo de la almeja pismo *Tridacna stultorum*, suspendida en agua de mar sintética, los valores se dan en seg. Se utilizó un ventrículo por experimento. Cada valor es el tiempo que tardó el ventrículo en llenarse de fluido.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A    | B    | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|------|------|----------------|
| 1                     | 2.00 | 1.80 | -10            |
| 2                     | 2.40 | 2.80 | 16             |
| 3                     | 5.60 | 9.60 | 71             |
| 4                     | 4.20 | 3.20 | -23            |
| 5                     | 2.20 | 2.60 | 18             |
| 6                     | 2.00 | 1.30 | -35            |
| 7                     | 2.40 | 3.20 | 33             |
| 8                     | 2.40 | 2.00 | -16            |
| 9                     | 4.00 | 5.00 | 25             |
| 10                    | 2.30 | 2.80 | 21             |
| 11                    | 0.90 | 3.40 | 277            |
| 12                    | 1.80 | 2.00 | 11             |
| 13                    | 2.25 | 3.50 | 55             |
| 14                    | 2.60 | 3.00 | 15             |
| 15                    | 3.00 | 2.60 | -13            |
| 16                    | 3.00 | 4.40 | 46             |
| 17                    | 2.80 | 3.90 | 39             |
| 18                    | 2.80 | 5.20 | 85             |
| 19                    | 2.10 | 4.00 | 90             |
| 20                    | 2.60 | 3.80 | 46             |

A= Valores de tiempo de llenado sin tratamiento

B= Valores de tiempo de llenado en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina

$t$  calculada = 3.08

$t$  teórica = 2.09  
para g.l. = 19

$\alpha = 0.05$

**Tabla 10**

Efecto de la digoxina sobre la duración de la sístole (T) del ventrículo de la almeja pismo *Tridacna stultorum*, suspendida en agua de mar sintética, los valores se dan en segundos. Se utilizó un ventrículo por experimento. Cada valor abarca el tiempo que duró la sístole en sus dos etapas: el llenado ventricular y la contracción muscular.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A    | B    | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|------|------|----------------|
| 1                     | 2.5  | 2.40 | -4             |
| 2                     | 3.00 | 3.70 | 23             |
| 3                     | 6.80 | 11.2 | 64             |
| 4                     | 5.10 | 3.80 | -25            |
| 5                     | 2.80 | 3.25 | 16             |
| 6                     | 2.50 | 2.30 | -8             |
| 7                     | 3.00 | 4.10 | 36             |
| 8                     | 3.30 | 3.10 | -6             |
| 9                     | 5.20 | 7.00 | 34.6           |
| 10                    | 3.20 | 4.00 | 25             |
| 11                    | 1.60 | 4.40 | 175            |
| 12                    | 2.40 | 3.00 | 25             |
| 13                    | 3.85 | 4.20 | 9              |
| 14                    | 3.40 | 4.20 | 23             |
| 15                    | 3.60 | 3.80 | 5              |
| 16                    | 4.20 | 5.80 | 38             |
| 17                    | 4.00 | 4.80 | 20             |
| 18                    | 3.80 | 6.40 | 68             |
| 19                    | 2.90 | 5.30 | 82             |
| 20                    | 3.60 | 5.00 | 38             |

A= Valores de tiempo de sístole sin tratamiento

B= Valores de tiempo de sístole en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina

t calculada = 3.64  
para gl= 19  
 $\alpha = 0.05$



**Tabla 11**

Efecto de la digoxina sobre la frecuencia de latido del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum*, suspendida en agua de mar sintética, los valores se dan en latidos/minuto. En cada experimento se utilizó el ventrículo de un organismo.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | A     | B     | % DE<br>CAMBIO |
|-----------------------|-------|-------|----------------|
| 1                     | 16.6  | 11.30 | -32            |
| 2                     | 15.0  | 13.04 | -13            |
| 3                     | 5.66  | 2.91  | -48            |
| 4                     | 9.09  | 9.09  | 0              |
| 5                     | 13.95 | 12.00 | -13            |
| 6                     | 16.66 | 11.53 | -30            |
| 7                     | 12.50 | 9.67  | -22            |
| 8                     | 13.63 | 10.52 | -22            |
| 9                     | 7.40  | 5.17  | -30            |
| 10                    | 10.34 | 8.33  | -19            |
| 11                    | 13.04 | 7.14  | -45            |
| 12                    | 13.63 | 13.04 | -4.3           |
| 13                    | 8.82  | 5.35  | -39            |
| 14                    | 11.53 | 9.83  | -14            |
| 15                    | 10.71 | 9.52  | -11            |
| 16                    | 10.00 | 6.66  | -33            |
| 17                    | 10.00 | 7.22  | -27            |
| 18                    | 10.16 | 6.12  | -39            |
| 19                    | 9.09  | 5.08  | -44            |
| 20                    | 10.71 | 8.19  | -23            |

A= Valores de frecuencia cardíaca sin tratamiento

B= Valores de frecuencia cardíaca cuando el ventrículo desarrolla la máxima fuerza de contracción en un medio conteniendo  $1 \times 10^{-5}$  M de digoxina.

t calculada = 8.34

t teórica = 2.09

para g.l.= 19

$\alpha = 0.05$

En la tabla 12 se encuentran registrados los valores de tiempo de ocurrencia y duración del máximo efecto. El tiempo de ocurrencia se refiere al que transcurrió entre la adición de digitálico y el momento en que se manifestó el máximo efecto en la contracción muscular. La respuesta más rápida de efecto máximo tardó 2 minutos en presentarse (ventrículo No. 1) y en el caso más lento transcurrieron 15 minutos antes de que llegara al máximo de fuerza. La columna de tiempo de duración contiene los valores de tiempo durante el cual se mantuvo la máxima respuesta. En este caso el promedio de duración fué de 9.4 minutos. Se observó un valor mínimo de duración de 2 minutos y un máximo de 49 minutos.

**Tabla 12**

Tiempo de ocurrencia del máximo efecto de digoxina en la fuerza de contracción ventricular de *T. stultorum* y duración del efecto. En cada experimento se usó el ventrículo de un organismo.

| EXPERIMENTO<br>NUMERO | Tiempo de ocurrencia<br>(min) | Tiempo de duración<br>(min) |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1                     | 2                             | 6                           |
| 2                     | 2.5                           | 2                           |
| 3                     | 30                            | 12                          |
| 4                     | 8.5                           | 19.5                        |
| 5                     | 13                            | 7                           |
| 6                     | 9.5                           | 5                           |
| 7                     | 11                            | 6                           |
| 8                     | 10                            | 4                           |
| 9                     | 11                            | 4                           |
| 10                    | 9                             | 6                           |
| 11                    | 11                            | 14                          |
| 12                    | 7                             | 2                           |
| 13                    | 5                             | 3                           |
| 14                    | 9                             | 49                          |
| 15                    | 15                            | 2                           |
| 16                    | 11                            | 5                           |
| 17                    | 9                             | 11                          |
| 18                    | 9                             | 14                          |
| 19                    | 5                             | 8                           |
| 20                    | 9                             | 8                           |
| Promedio              | 9.8                           | 9.4                         |

Tiempo de Ocurrencia: Tiempo transcurrido entre la adición del digitálico y la aparición de la máxima respuesta en la contracción del miocardio.

Tiempo de duración: Tiempo durante el cual se mantuvo constante la máxima fuerza de contracción del miocardio.

## 6.- Discusión

La medición de la frecuencia cardíaca es la forma más sencilla de realizar comparaciones en fisiología, aunque es también la más variable de las características de un animal. Sin embargo, existen algunas generalizaciones que pueden utilizarse como punto de partida en el análisis de los resultados obtenidos respecto a la frecuencia del latido.

En general, la frecuencia cardíaca es más baja en animales con poca capacidad locomotora. Según Prosser (1973), para las almejas la frecuencia del latido va desde 0.2 hasta 22 por minuto.

La frecuencia cardíaca determinada para *T. stultorum* en el presente trabajo cae dentro del rango mencionado por Prosser, aunque difiere de los resultados de Baskin y Allen (1963), quienes reportan una frecuencia de 18 latidos/min, casi el doble del valor promedio determinado en este trabajo. Sin embargo, la temperatura del estudio de estos autores fue de 25° centígrados mientras que la de este trabajo fue de 18° C, Hill señala que para algunos moluscos la frecuencia cardíaca aumenta con la temperatura en el rango de 16° a 29° con un coeficiente de 2.52, es decir, afirma que "el corazón es afectado por la temperatura de una manera similar a la que se afectan las reacciones químicas" (Hill, 1966). Es una experiencia cotidiana el hecho que

las reacciones químicas se aceleran cuando la temperatura aumenta. Como se sabe, la variación de la mayoría de las reacciones se duplica aproximadamente por cada 10°C que aumente la temperatura; es decir, tienen un coeficiente de variación en función de la temperatura ( $Q_{10}$ ) alrededor de 2. Esta regla constituye la base del método señalado por Prosser (1973) para el cálculo de  $Q_{10}$  y válido en la predicción de velocidad en diferentes temperaturas.

Trueman y Lowe (1971) aplicaron el método de cálculo de  $Q_{10}$  sobre valores de frecuencia cardíaca en un estudio del bivalvo *Isognomum alatus*, para el cual obtuvieron un valor de 2 con mediciones de frecuencia cardíaca a temperaturas ambientales de 29° a 35°C. Si se toma como base el estudio sobre *T. stultorum* realizado por Baskin y Allens, y se aplica un coeficiente  $Q_{10}$  de 2 al utilizar la temperatura de 18° como la que se usó en el presente trabajo, la frecuencia cardíaca esperada es de 11 lat/min. Este resultado concuerda con el de la tabla 1, y ambos valores refutan la observación de Hill (1966) quien afirma que una frecuencia cardíaca de 18 lat/min es un valor demasiado bajo.

Por otro lado, Dickens y Mangum (1979) encontraron una frecuencia de 10 lat/min para la almeja *Mercenaria mercenaria* y afirman que en la mayoría de los lamelibranquios estudiados a 20°-25°, el corazón late 10 veces por minuto. Para la almeja *Noetia ponderosa*, Deaton y Mangum (1978) reportan una frecuencia cardíaca de 14 lat/min a 23° C y para la almeja *Polymesoda caroliniana*, Deaton (1991) determinó una frecuencia de 8.5-3.2 lat/min en el organismo intacto y las valvas cerradas; y un valor de 13.5-2.3 lat/min con las valvas abiertas.

Todos los valores reportados, incluido el de este trabajo, revelan consistencia en la frecuencia cardíaca de los lamelibranquios, y además coinciden en

la generalización de que los animales sedentarios tienen un ritmo cardíaco lento (Prosser, 1973). Esta característica conlleva rasgos prácticos dentro del contexto de este trabajo. Una frecuencia baja permite el conteo visual del número de latidos, sin necesidad de equipo para realizar registros rigurosos y con el único apoyo de un cronómetro o bien, un reloj de pulso con indicador de segundos. Si a esto se suma la facilidad de disección, el sistema resulta ser una herramienta fácilmente utilizable en el campo, con carácter exploratorio para la detección de actividad cardiotónica en extractos crudos de organismos marinos. Ante esta perspectiva de uso, surgen tres aspectos a discutir: el líquido de perfusión, la aireación y la duración del bioensayo, que implican composición química del medio, oxigenación y temperatura, factores que podrían afectar la frecuencia cardíaca y provocar falsos resultados en pruebas preliminares.

La importancia de los electrolitos en la contracción del miocardio se conoce desde el siglo pasado. La excitación de este músculo depende de una distribución adecuada de los iones de sodio y potasio entre la solución externa y el interior de la célula (Reiter, 1963). De aquí, que la composición de estos iones en el medio de incubación de una preparación de corazón aislado representa una posible fuente de alteración de la función cardíaca. Sin embargo, en la mayoría de los invertebrados marinos, la concentración osmótica de los fluidos corporales extracelulares e intracelulares está en equilibrio pasivo con el océano, aunque la osmoconcentración total de la sangre puede ser ligeramente mayor que la del medio (Prosser, 1973). En particular, los moluscos bivalvos son osmoconformadores; es decir, no están completamente a merced del ambiente, sino que sus respuestas a cambios osmóticos son homeocinéticas (Prosser, 1973) y por lo tanto, pueden continuar sus actividades biológicas dentro de un rango limitado de concentraciones osmóticas internas. De lo anterior se desprende que el agua de mar, es un buen medio para una

preparación de corazón aislado de *T. stultorum* que puede ser usada en el campo; mientras que en el laboratorio puede utilizarse agua de mar natural o sintética, según los recursos infraestructurales.

Un factor que limita el valor de la respuesta cardíaca en bioensayos en el campo, es la necesidad de aireación de las preparaciones de corazón aislado. Como se sabe, el miocardio de los animales aeróbicos consume gran cantidad de oxígeno para producir su energía química (ATP), misma que requiere para generar su energía mecánica como bomba y en grado menor para producir el fenómeno eléctrico y regenerar proteínas (Chávez-Rivera, 1989). Esto impone un requerimiento de aireación en el uso de corazones aislados de especies tradicionalmente utilizadas en Farmacología, organismos que son netamente aeróbicos y que por lo tanto, poseen miocardios ávidos de oxígeno. Además de la actividad, la temperatura, el tamaño corporal, la etapa en el ciclo de vida y el bagaje genético que influyen en el consumo de oxígeno de un organismo (Prosser, 1973), el esquema metabólico de la especie es determinante en estos requerimientos. Gracias a las particularidades bioquímicas de los bivalvos, estos organismos poseen una alta tolerancia a la anoxia (Hochachka, 1980). Baskin y Allen reportaron (1963) que la preparación de ventrículo de *T. stultorum* mantiene su frecuencia cardíaca bajo tensiones de oxígeno que van desde 3 mm Hg hasta 160 mm Hg de  $pO_2$ . Para *N. ponderosa*, Deaton y Mangum (1978) reportaron constancia en el latido cardíaco desde 90 mm Hg hasta 160 mm Hg de  $pO_2$ . Estos resultados refuerzan la observación cualitativa realizada en el presente trabajo y confirman la utilidad de *T. stultorum* en Farmacología Marina, ya que una preparación estable en la frecuencia cardíaca aún en condiciones de hipoxia en el medio, además de ser conveniente en el laboratorio, puede extender su uso al campo sin necesidad de sistemas de aireación.



En su aplicación en el campo, el bioensayo utilizado en este trabajo enfrenta la problemática impuesta por la temperatura del agua de mar de la región en que se trabaja, ya que ésta debe permitir la ocurrencia de cambios en el sistema biológico de prueba sin que se bloquee el desarrollo del experimento. Uno de los riesgos en el uso de corazones en perfusión es la disminución de la frecuencia de latido al grado de causar paro cardíaco, por lo que es necesario tomar en cuenta la temperatura más baja a la que el corazón de *T. stultorum* puede utilizarse.

Considerando el valor individual de frecuencia del latido ventricular más bajo obtenido sin tratamiento en este estudio (5.66 latidos/minuto; columna A, tabla 11) y aplicando un coeficiente de  $Q_{10} = 2$  en la ecuación, descrita por Prosser (1973), se obtiene la mínima temperatura aceptable para la extrapolación de este modelo al campo. El valor calculado de esta manera resulta ser 9°, que es una temperatura menor que la mínima temperatura anual reportada para la Bahía de Todos Santos. En general, la variación anual de la temperatura superficial en la Bahía es de 5.5° C, con un mínimo de 14° en marzo y un máximo de 20° en agosto (Secretaría de Marina, 1974). Esto permite afirmar que, al menos en nuestra región, se puede utilizar este modelo sin riesgo de arresto cardíaco al usar el agua de mar natural.

Los digitálicos ejercen múltiples efectos sobre un organismo desde el momento en que se enlazan con su receptor celular, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (Morán, 1967). Sin embargo, la principal propiedad farmacodinámica es su capacidad de aumentar la fuerza de contracción miocárdica (acción inotrópica positiva); la segunda es la disminución de la frecuencia cardíaca (Goodman y col, 1985). Los efectos benéficos de este tipo de drogas en los pacientes con insuficiencia cardíaca se explica por el aumento de la fuerza contráctil (Goodman y col, 1985).



La fuerza de contracción, a diferencia de la frecuencia cardíaca, no representa un verdadero parámetro biofísico en las condiciones utilizadas en este trabajo. Dado el carácter isométrico de la experimentación, era de esperarse la gran dispersión que se observa en los valores de cada fuerza que aparece en la Tabla 1. Esta variación, más que atribuirla a diferencias en respuesta biológica individual, puede explicarse en función del mecanismo de desplazamiento de filamentos de la contracción muscular (Guyton, 1987). Kelly y Hayes (1969) fueron los primeros en revelar que en el músculo ventricular de la almeja *Venus mercenaria* se encuentra la actina, una de las proteínas que constituyen la troponina de las unidades contráctiles de los vertebrados. *V. mercenaria* no posee miosina, el otro componente proteico en la troponina de vertebrados, sino paramiosina. La paramiosina es una proteína más pequeña y menos compleja que la miosina, pero al igual que ésta puede satisfacer el modelo de deslizamiento de filamentos propuesto por Kelly y Hayes para *V. mercenaria*.

Si este modelo se aplica a *T. stultorum*, se explica la variación de los valores de fuerza de contracción que se observó de un ventrículo a otro. En una preparación aislada de músculo cardíaco que se estudia en condiciones isométricas, la longitud de la fibra debe permanecer fija una vez que se inicia el experimento y mantenerse constante durante el desarrollo del mismo, sin embargo, el arreglo de los filamentos en el músculo se ve afectado por el grado de tensión que se ejerce al montarlo dentro de la cámara de prueba, ya que un músculo demasiado estirado elimina el traslape de los filamentos y no desarrolla tensión; y un músculo demasiado relajado presenta mucho traslape e interfiere en el deslizamiento de un filamento sobre otro (Vander y col, 1978). La poca variación en la longitud del ventrículo (tabla 1) permitió mantener cierta constancia en la tensión inicial del transductor; pero dos corazones de longitud ligeramente diferente, al ser colocados dentro de la cámara de prueba, sufren diferentes grados de estiramiento. Estas pequeñas diferencias de

longitud entre ventrículos pudieron haber ocasionado variaciones en la fuerza inicial de contracción entre un corazón y otro por los distintos estiramientos que causaran grados diferentes de traslape. Un estiramiento de 0.1 mm de longitud en un músculo puede traducirse en una diferencia que va desde 0.1g hasta 3.5 g de fuerza, dependiendo de la longitud inicial (Sonnenblick, 1962). Por lo tanto, estas variaciones impiden afirmar que los datos de fuerza inicial representan la capacidad isométrica real del músculo cardíaco de *T. stultorum*, ya que este tipo de contracción puede ocurrir en un amplio rango de longitudes y no es una verdadera respuesta del elemento contráctil. Sin embargo, esto no plantea ninguna problemática en la interpretación de la respuesta mecánica cardíaca a los agentes inotrópicos positivos si se toman en cuenta las precauciones necesarias para que haya oportunidad de desarrollo de tensión. En el caso de *T. stultorum* se observó preliminarmente que puede desarrollar tensiones hasta de 15 gramos, por lo que se aseguraron tensiones iniciales no mayores de 7 gramos para permitir hasta un desarrollo de por lo menos 7 gramos adicionales.

El análisis de los efectos inotrópicos se basa en las propiedades mecánicas del músculo utilizado en el bioensayo. Las características del músculo cardíaco se pueden resumir en dos generalizaciones útiles para evaluar la respuesta mecánica obtenida en este trabajo, ambas basadas en los estudios de Kelly y Hayes (1969) y Rueg (1986) sobre la estructura bioquímica y anatómica del músculo cardíaco y músculo aductor de lamelibranquios. La primera generalización es que un aumento en la longitud muscular induce un incremento en la fuerza de contracción. La segunda es que cuando se mantiene constante la longitud del músculo, un cambio inotrópico del miocardio puede ser ocasionado por una alteración en la duración de la contracción o bien, por una variación en la intensidad del estado activo del músculo. La primera generalización adquiere validez para *T. stultorum* por las observaciones mencionadas previamente. La segunda constituye la condición fundamental buscada en este estudio.

Como se observa en las tablas 3, 4 y 5, la digoxina ocasionó un incremento significativo en la fuerza de contracción del músculo ventricular de *T. stultorum* en los dos momentos de la sístole ( $F_1$  y  $F_2$ ), con el consiguiente aumento de la intensidad del estado activo ( $F_i$ ). La variación del tiempo (tablas 8 y 9) de cada etapa de la sístole ( $t_1$  y  $t_2$ ), trajo como consecuencia un aumento significativo en la velocidad del desarrollo de la fuerza en ambos momentos, dada la relación que existe en este índice de contracción ( $\Delta F/\Delta T = \Delta V$ ). De aquí se desprende que la respuesta mecánica de *T. stultorum* al glucósido cardíaco en cada fase de la diástole es fundamentalmente un cambio de velocidad en la contracción, con lo que logra alcanzar mayores tensiones o fuerzas de contracción. Estos resultados concuerdan con el análisis de efectos inotrópicos de Edman y Nilsson (citado por Fisch, 1969). Dichos investigadores encontraron un marcado incremento en la intensidad del estado activo del músculo papilar de gato o de conejo en condiciones isométricas, al ser sometidos a la acción de glucósidos cardíacos. Sumando sus observaciones a otras similares que habían sido realizadas previamente para corazón aislado de rana (Hajdu y Szent-Gyorgy, 1952), fibras ventriculares de perro (Vasalle y col, 1962) y aurícula de conejo (Holland, 1966) podemos concluir que el mecanismo primario por el cual los glucósidos digitálicos producen este efecto inotrópico positivo en el músculo cardíaco de *T. stultorum* está representado por un incremento en la máxima intensidad del estado activo del músculo.

Un músculo activo puede ser descrito en términos de un modelo mecánico con tres componentes funcionales: A) un elemento contráctil con libertad de estiramiento cuando se encuentra en reposo; pero que puede activarse y desarrollar tensión por acortamiento; B) un elemento elástico pasivo arreglado en serie con el anterior; y C) un componente elástico adicional arreglado en paralelo con el elemento contráctil para sostener la tensión en reposo (Parmley y col, 1967). De aquí emerge la

imagen de un componente contráctil que se acorta y estira al elemento elástico, desarrollándose en el sistema una fuerza durante la contracción. Si se impide el estiramiento del músculo (condición isométrica), la fuerza que se está midiendo es exclusivamente la que desarrolla el componente contráctil (Vander y col, 1978).

A partir de la imagen anterior, puede explicarse la acción de la digoxina sobre el corazón de *T. stultorum*. Por las condiciones isométricas de este estudio no es posible reconocer el efecto sobre la elasticidad, que si bien es un fenómeno consecuente, no es el factor principal para calificar un efecto como "inotropía". Siegel y Sonneblich (1963, citado por Throp y Cobbin, 1969). enfatizaron que la alteración en la velocidad de acortamiento del elemento contráctil es un factor obligatorio para un efecto inotrópico; y que un aumento en la fuerza de contracción confirma el carácter inotrópico positivo. La respuesta de *T. stultorum* a la digoxina contiene ambos efectos, por lo que puede concluirse que reúne las condiciones necesarias para el estudio de agentes cardiotónicos de tipo digitálico.

Además del aumento en la velocidad y fuerza de contracción, el ventrículo de *T. stultorum* presentó bradicardia, es decir, disminución en la frecuencia de latido ventricular (tabla 11). Este efecto cronotrópico negativo también ha sido observado en ranas, gatos, perros y conejos (Hajdu y Szent-Gyorgy, 1952; Vasalle y col, 1962; Ten y Hoffman, 1969) y se reconoce como una segunda acción importante de los digitálicos, en la que se basa también su uso farmacológico actual (Goodman y col, 1988). Aquí es conveniente enfatizar que una cronotropía negativa implica un cambio en el tiempo de duración del estado activo del elemento contráctil; y que el efecto inotrópico positivo puede ser provocado de dos formas: o se aumenta la velocidad de contracción o se reduce el tiempo para alcanzar la tensión máxima. Es hallazgo común que los digitálicos ocasionan aumento de velocidad y además

disminuyen el tiempo de tensión máxima en las preparaciones de músculo cardíaco (Goodman y col., 1988). Según Goodman, en todas las especies estudiadas el aumento de velocidad es el efecto predominante y por lo tanto la resultante es una potenciación de la amplitud de la contracción en paralelo con una reducción del tiempo de máxima fuerza de contracción. En el ventrículo de *T. stultorum* este tiempo ( $t_1$ ) se vio afectado por el digitálico de manera significativa (Tabla 8); pero en la mayoría de los casos la alteración consistió en aumentos y no reducciones. El mismo tipo de efecto se observó en el tiempo de llenado ventricular ( $t_2$ ) y tiempo total de sístole ( $t_3$ ) (tablas 9 y 10 respectivamente). A pesar de este hecho, ocurrió cronotropía negativa, como en todas las especies anteriormente estudiadas. No es recomendable tratar de extraer inferencias respecto a la razón de esta diferencia de *T. stultorum* con respecto a otras especies a partir del análisis de los efectos provocados por una sola concentración de digitálico. Sin embargo, es conveniente hacer notar que independientemente de la razón por la que en *T. stultorum* no se ocasiona reducción del tiempo de contracción ( $t_1$ ), el resultado final de cronotropía negativa es el mismo que ocurre en las especies modelo y que por lo tanto este invertebrado marino puede revelar el mismo tipo de actividad farmacológica.

A partir de la discusión anterior podemos concluir sobre la aplicabilidad de *T. stultorum* como modelo experimental en Farmacología Marina. En todos los casos, es necesario enfatizar que su utilidad radica en su uso en la selección farmacognóstica de agentes cardioactivos de tipo digitálico; es decir, todos aquellos materiales sospechosos de ejercer inotropía o cronotropía sobre músculo cardíaco.

Como herramienta de cribado farmacológico en el campo, el uso de *T. stultorum* es altamente recomendable si se basa en cambios cronotrópicos ya que, como se mencionó anteriormente la frecuencia del latido es fácilmente cuantificable.

Por otra parte, si se toma en cuenta el tiempo necesario para que el ventrículo desarrolle la respuesta de fuerza máxima de contracción ( $F$ ), es conveniente considerar que, aunque el tiempo promedio para que éste se manifieste es corto (tabla 12), algunos especímenes pueden responder lentamente.

En su aplicación en el campo, también es conveniente tomar en cuenta que es poco práctico intentar establecer condiciones isométricas en el mismo, y más aún, realizar un análisis cuantitativo de efectos inotrópicos.

Considerando los efectos de la digoxina sobre el funcionamiento mecánico de *T. stultorum* analizados en el presente estudio, se puede afirmar que este compuesto ocasiona inotropía positiva y cronotropía negativa. Estos resultados, demuestran de manera concluyente que el corazón de la almeja pismo es sensible a los digitálicos, por lo que avalan su utilidad como animal de experimentación en Farmacología Marina, lo que, dadas las necesidades de esta disciplina, representa una base para su desarrollo.

## 7.- Conclusiones

- 1.- La frecuencia cardíaca del ventrículo de *T. stultorum* aislado y perfundido en agua de mar sintética a 18° es de 11 latidos por minuto.
- 2.- La fuerza de contracción ventricular de *T. stultorum* en condiciones constantes de composición química del medio de perfusión depende del estiramiento de la fibra muscular.
- 3.- La respuesta mecánica del ventrículo de *T. stultorum* a una concentración de  $10^{-6}$  M de digoxina en agua de mar sintética se caracteriza por:
  - a.) aumento en la fuerza de contracción ventricular,
  - b.) aumento en la fuerza de llenado ventricular,
  - c.) aumento en la fuerza total durante la sístole,
  - d.) aumento en la duración de la sístole,
  - e.) aumento en la velocidad de desarrollo de la fuerza de contracción ventricular,
  - f.) aumento en la velocidad de desarrollo de la fuerza de llenado ventricular,
  - g.) disminución de la frecuencia cardíaca,

- 4.- La digoxina en concentración de  $10^{-5}$  M en agua de mar sintética causa incrementos del tiempo de llenado ventricular y el tiempo de la contracción ventricular; aunque ocasionalmente causa decremento.
- 5.- El ventrículo de *T. stultorum* muestra efecto inotrópico positivo y cronotropía negativa en un medio de agua de mar sintética con digoxina en concentración de  $10^{-5}$  M.
- 6.- La almeja pismo es un buen modelo animal para la selección farmacognóstica de actividad cardiotónica en Farmacología Marina.
- 7.- El bioensayo con preparaciones aisladas de ventrículo de *T. stultorum* satisface los requerimientos necesarios para su aplicación en Farmacología Marina como herramienta de cribado farmacológico *in situ*.



## 8 - Bibliografía

- Anzures y Bolaños, M del C. 1989. La medicina tradicional en México. México, UNAM.
- Akera, T. 1981. Effects of cardiac glycosides on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. En: Cardiac glycosides. Part I: Experimental Pharmacology. K. Greef (Ed.) Springer-Verlag. Berlin.
- Akera, T. and Y.C. Ng. 1991. Digitalis sensitivity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Myocytes and the heart. Minireview. Life Sciences, 48: 97-106.
- Baslow, M.H. 1977. Marine Pharmacology. Robert E. Krieger Publishing Company. Huntington, N.Y.
- Baskin, R.J. and K. Allen. 1963. Regulation of Respiration in the molluscan heart. Nature, 198: 448-450
- Bonting, S.L., K.A. Simon and N.M. Hawkins. 1961. Studies on sodium potassium adenosinetriphosphatase. 1.- Quantitative distribution in several tissues of the cat. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95: 416-423.
- Booth, C.E. and C.P. Mangum. 1978. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus demissus*. Physiol. Zool, 51: 17-32.
- Coe, W.R. 1947. Nutrition, growth and sexuality of the pismo clam (*Tivela stultorum*). J. Exp. Zool, 104(1): 1-24.
- Cohn, J.P. 1988. The Beginnings: Laboratory and animal studies. En: New drug development in the United States (from test tube to patient). FDA Special Report.
- Cuéllar-Roheri, M. 1991. Utilización de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe 1823) como un organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C.
- Chávez-Rivera, I. 1989. Cardiopatía coronaria e isquemia cardíaca. Editorial Interamericana. Mc Graw-Hill. México
- Davis, J.O., R.E. Hatt and D.S. Howell. 1955. Circulation Research, 3: 252-259.
- Davis, T.D., R.L. Vanderveen and M. Nienhis. 1983. En: Digoxin. in Appl. Clin. Pharmacokinetics. Dennis Mungall (Ed.) Raven Press, N.Y.

- De Feo, J.J. 1968. Problems in pharmacological evaluation of marine organisms.. En: Drugs from the Sea. Transactions of the Drugs from the Sea Symposium. Hugo D. Freudenthal (Ed.). Journal of Ocean Technology Society. pp.15-17.
- Deaton, L.E. 1991. Oxygen uptake and heart rate of the clam *Polymesoda caroliniana* bosc in air and seawater. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 147, 1-7.
- Deaton, L.E. and C.P. Mangum. 1978. The cardiac response of the Ponderous ark clam, *Noetia ponderosa* to reduce oxygen levels. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 59A, 229-230.
- Der Marderosian A. 1968. Current status of drug compounds from marine sources. En: Drugs from the Sea. Transactions of the Drugs from the Sea Symposium. Hugo D. Freudenthal (Ed.). Journal of Ocean Technology Society. pp. 19-33.
- Dikens, J.A. and C.P. Mangum. 1979. The design of cardiac muscle and mode of metabolism in molluscs. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 62A, 549-554
- Dixon, I.M., T. Hata and N.S. Dhalla. 1992. Sarcolemmal  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$ -ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. Am. J. of Physiol. 262, c664-71.
- Erhardt, P.W. 1987. In search of the digitalis replacement. J. of Medicinal Chemistry. 30(2): 231-237.
- Evans, W.C. 1991. Trease y Evans Farmacognosia. 13a. Edición. Editorial Interamericana. Mc Graw Hill. Madrid.
- Ferrari, R. and L. H. Opie. 1992. Atlas of the myocardium. Raven Press, N.Y.
- Fisch, Ch. 1969. Digitalis. Grune Stratton Publishers,. N.Y.
- Florey, E. 1968. The clam-heart technique of bioassay for acetylcholine. En: Experiments in Physiology and Biochemistry. G. A. Kerkut (Ed.). Academic Press. London.
- From, A.H.L., D.S. Fullerton and K. Ahmed. 1990. Digitalis receptor sugar binding site characteristics: A model based upon studies of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase preparations with differing digitalis sensitivities. Molecular and Cellular Biochemistry. 94: 157-165.
- Fullerton, D.S. 1982. Steroids and therapeutically related compounds. En: Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 8th. edition. R.F. Doerge (Ed.). J.B. Lippincot Company. Philadelphia.

- Gibbs, R., P.M. Roddy and E. Titus. 1965. Preparation assay and properties of an  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  - requiring adenosin triphosphatase from beef brain. J. of Biol. Chem. 240: 2181-2187.
- Goodman, A., L. Goodman, T.W. Rall y F. Murad. 1988. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7a. Edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires.
- Guyton, A. 1987. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 4th. edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Haustein, K.O., C. Henstschel and H. Hentschel. 1987. The relation of membrane-ATPase activity with congestive heart failure. J. of Clin. Pharm., Ther. and Toxicol. Vol. 25 12, 651-655.
- Hajdu, S. and A. Szent-Gyorgyi. 1952. Action of digitalis glycosides on isolated frog heart. American Journal of Physiology. 168. 171-175.
- Holland, W. 1966. Effect of heart rate and ouabain on action of calcium atrial contractions. American Journal of Physiology. 211, 1214-1218.
- Hill, R.B. and J.H. Welsh. 1966. Heart, Circulation and Blood Cells . En: Physiology of Mollusca. Vol. II. Karl M. Wilbur and C.M. Young (Eds.) Academic Press.
- ILAR.Comittee on Marine Invertebrates. 1981. Laboratory Animal Management. Marine Invertebrates. Institute of Laboratory Animal Resources. Assembly of Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C.
- Hochachka, P.W.. 1980. Living without oxygen. Harvard University Press. Cambridge.
- Iñiguez-Martínez, A.M. 1990. Aislamiento del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B.C.
- Jones, H.D.1983. The circulatory systems of gastropods and bivalves. En: The Mollusca. Karl M. Wilbur (Ed.), Vol. 5, Academic Presss, pp 189-238.
- Kaiser, H.E. 1980. Species-specific potential of invertebrates for toxicological research. University Park Press. Baltimore, Maryland.
- Kelly, R. E. y R. L. Hayes. 1969. The Ultrastructure of Smooth Cardiac Muscle in the Clam, *Venus mercenaria*. J. Morph., 127: 163-176.
- Klir, O. and M. Pravence. 1989. Model in experimental medicine. En: Methos in animal

- physiology. Zdenek Deyl and Josef Zicha (Eds.) CRC Press Inc. Boca Ratón, Fla.
- Lehninger, A, D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. Principles of biochemistry 2nd. ED. Worth Publishers, N.Y.
- Lewis, R.P. 1990. Digitalis: A drug that refuses to die. Critical care medicine. 18(1) S5-S13.
- Marquez-De Cantú, M.J. 1991. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Mc Graw-Hill. México.
- Martin, A.W. 1980. Some invertebrate myogenic heart: The hearts of worms and molluscs. En: Hearts and heart-like organs. Vol.1, Academic Press.
- Martin, D.F. and G.M. Padilla (Eds.) 1973. Marine Pharmacognosy. Academic Press. N.Y.
- Menzer, R.E. 1987. Selection of animal models for data interpretation. En: Toxic substances and human risk. Ch. 8. R.G. Tardiff and J.V. Rodricks (Eds.). Plenum Press Inc, N.Y.
- Meyers, F.H. 1954. Production of acute and chronic myocardial insufficiency in the intact dog. Circulation research. 7, 114.117.
- Morán, N.C. 1967. Contraction dependency of the positive inotropic action of cardiac glycosides, en: Myocardial Contractility. Ralph D. Tanz and Frederic Kavalier (Eds). A. P. N. Y
- National Research Council. 1988. Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research. Washington, D.C.
- Nogady, T. 1988. Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach, 2nd. Ed. Oxford University Press, N.Y.
- Parmley, W.W. y E. H. Sonneblick. 1967. Series elasticity in the heart muscle. It's relation to contractile element velocity and proposed muscle models.
- Opie, L.H. 1991. The Heart. Physiology and Metabolism. 2nd. Ed. Raven Press, N.Y.
- Pérez-Plascencia, G. 1991. Efectos hematológicos del principio activo del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, U.A.B.C., Ensenada, B.C.
- Planas-Domingo, M.E. y L. Rodríguez Alvarez. 1988. Importancia de los estudios preclínicos en farmacología. En: Tratado de medicina práctica, Medicine,

2a. edición. Programa Internacional para la Actualización Médica.  
México.

Prosser, C.L. 1973. Comparative animal physiology 3ed. Ed. W.B. Saunder Company.  
Philadelphia

Reiter, M. 1963. Electrolytes and myocardia contractility en: Proceedings of the 2nd  
International Pharmacology meeting. Otto Krager and Alenz Kovarikouz  
(Eds.). Pergamon Press. N.Y.

Reiter, M. 1964. Electrolytes and Myocardial Contractility. En: Proceedings of the 2nd.  
International Pharmacological Meeting. Otto Krager and Alenz  
Kovarikovz (Eds.). The McMillan, Co. N.Y.

Repke, K.R.H. and W. Schonfeld. 1984.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase as the digitalis receptor.  
Trends in Pharmacological Sciences. 5, 393-397.

Repke, K.R.H. and J. Weiland. 1988.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - Transporting ATPase as a tool in the  
synthetic further development of cardioactive steroids. Pharm. Res.  
Comm. 20(6) 425-450.

Rossum, J.M. and J. T. A. Hurkmans. 1986. Bioassay: A pharmacological endeavour.  
En: Discoveries in Pharmacology, Volume 3: Pharmacological methods,  
receptors and chemotherapy. M.J. Parnham and J. Bruinvels (Eds.).  
Elsevier Science Publishers (Biomedical Division).

Ruíz-Durá, M.F. 1992. Recursos Pesqueros de las Costas de México. 2a. Edición.  
Editorial Limusa. México.

Rueg, J.C. 1986. Calcium in muscle activation a cvomparative aproach. Springer-  
Verlang. Berlin

Saintsing, D.G. and D.W. Towle. 1978.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase in the osmorregulating clam  
*Rangia cuneata*. Journal of Experimental Zoology. 206, 435-442.

Sandel, W.R. 1983. The Thornton Physiology Laboratory Manual for the Life Sciences.  
Burguess Publishing Company. Minneapolis.

Secretaría de Marina. 1974. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento  
Marítimo. Estudios Geográficos de la Región de Ensenada, B.C.

Shattock, M.J. and H. Matsuoka. 1993. Measurement of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase pump current  
in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp  
technique. Inhibition of thye pump by oxidant stress. Circulation  
Research. 72(1), 91-101.

- Shaw, W.N. and T.J. Hassler. 1989. Species Profiles: Life history and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest). Pismo clam. Biological Report of the National Wetlands Research Center. Los Angeles.
- Siegel, J.H. and E.H. Sonnenblick. 1963. Isometric time-tension relationships as an index of myocardial contractility. *Circulation Research*, Vol. XII. 6: 597-610.
- Skou, J.C. 1957. The influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 23. 394-401.
- Sonnenblick, E.H. 1962. Force velocity relations in mammalian heart muscle. *American Journal of Physiology*. 202, 931.-939
- Ten, R.E. and F. Hoffman. 1969. Chronotropic effect of cardiac glycosides in cats, dogs and rabbits. *Circulation Research* Vol XXVI.4, 365-378
- Thorp, R.H. and L.B. Cobbin. 1967. Assay of cardiotonic activity in new compounds. En: *Cardiac stimulant substances*. R.H. Thorp and L.B. Cobbin (Eds.). Academic Press. New York and London.
- Towle, D.W. 1981. The role of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase in ionic regulation by marine and estuarine animals. *Marine Biology Letters*. 2: 107-122.
- Trueman, E.R. and G.A. Lowe. 1971. The effect of temperature and litoral exposure on the heart rate of a vibalve molluscs, *Isognomum altus*, in tropical conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 38 A. 555-564
- Umbreit, W.W., R.H. Burris and J.F. Stauffer. 1972. *Manometric and biochemical techniques*. 5th. Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis.
- Usabiaga-Del Moral, A. 1990. Efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPasa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B. C.
- Vander, A.J., J. H. Sherman y D. S. Luciano. 1978. *Fisiología Humana*. Mc Graw-Hill Latinoamericana, S.A. Bogotá, Colombia
- Vasalle, M., J. Karis and B.F. Hoffman. 1962. Toxic effects of ouabain on purkinje fibers and ventricular muscle fibers. *American Journal of Physiology*. 203., 433.439.
- Walker, J.M., E.M. Lourie and J.H. Burn. 1950. *Brit. J. Pharmacol.* 5: 306-309.
- Weingart, R. 1981. Influence of cardiac glycosides on electrophysiologic processes. En:

---

Cardiac Glycosides. Part I: Experimental Pharmacology. K. Greeff (Ed.).  
Springer Verlag. Berlin.

Wright, S.E. 1960. The Metabolism of Cardiac Glycosides. Thomas. Illinois.

## 9.- Apéndices



## Apéndice 1

Composición del agua de mar sintética  
utilizada como líquido de perfusión en  
el bioensayo para la medición del efecto  
de digoxina sobre el corazón de la almeja  
pismo *Tivela stultorum*.

| Componente                           | g/L  |
|--------------------------------------|------|
| NaCl                                 | 24.7 |
| KCl                                  | 0.7  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 6.3  |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 4.6  |
| Ca Cl <sub>2</sub>                   | 1.0  |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 0.2  |

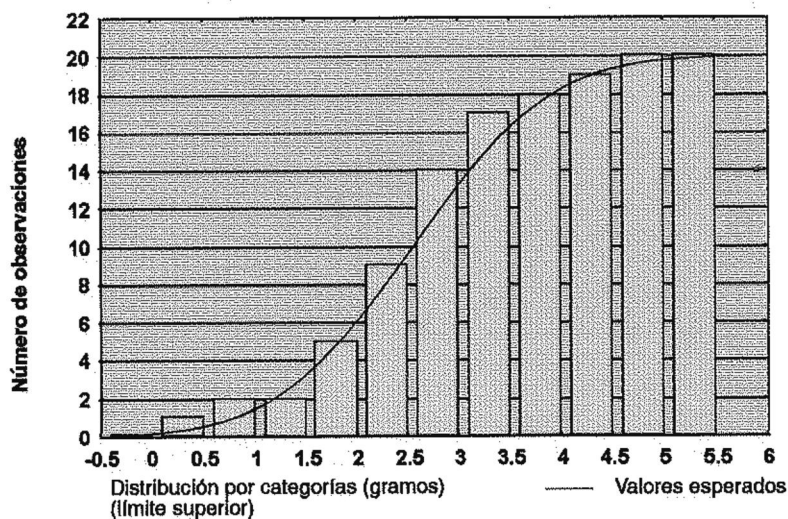
## Apéndice 2

---

Resultados de la prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov-Smirnov) aplicada a los diferentes parámetros biofísicos del ventrículo de *Trocheta stultorum*. Todos los resultados que se observan en la gráficas 1-9 de las páginas siguientes fueron obtenidos por medio del programa CSS Statistica (versión 3.0) con los datos de los parámetros biofísicos del ventrículo suspendido en agua de mar sintética.

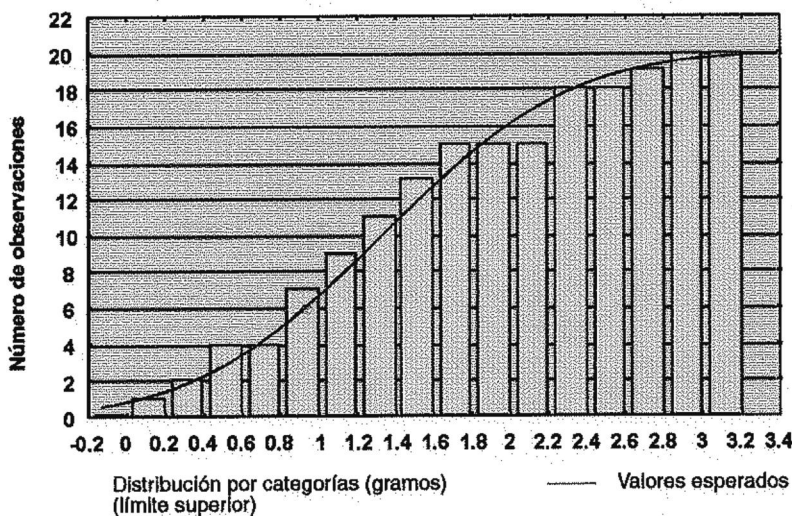
---

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .0793076$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



**GRAFICA 1.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE FUERZA DE CONTRACCION DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tridacna stultorum*.

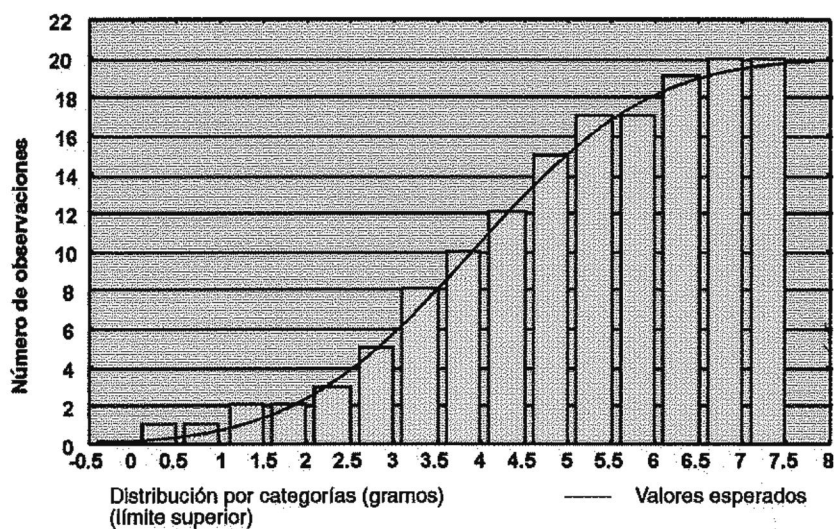
**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .0977872$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



**GRAFICA 2.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE FUERZA DE LLENADO VENTRICULAR DE LA ALMEJA PISMO *Tridacna stultorum*.

### ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE

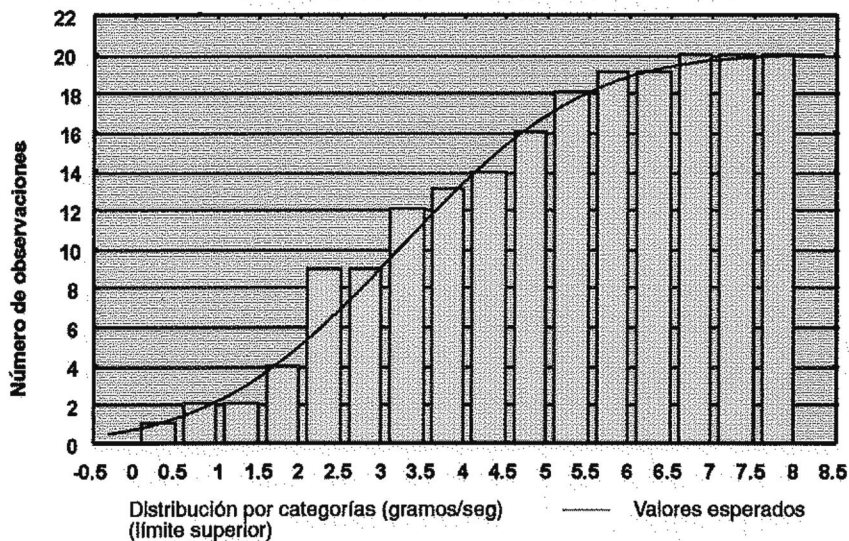
Kolmogorov-Smirnov  $d = .0448001$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



**GRAFICA 3.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE FUERZA TOTAL DE CONTRACCION DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum*.

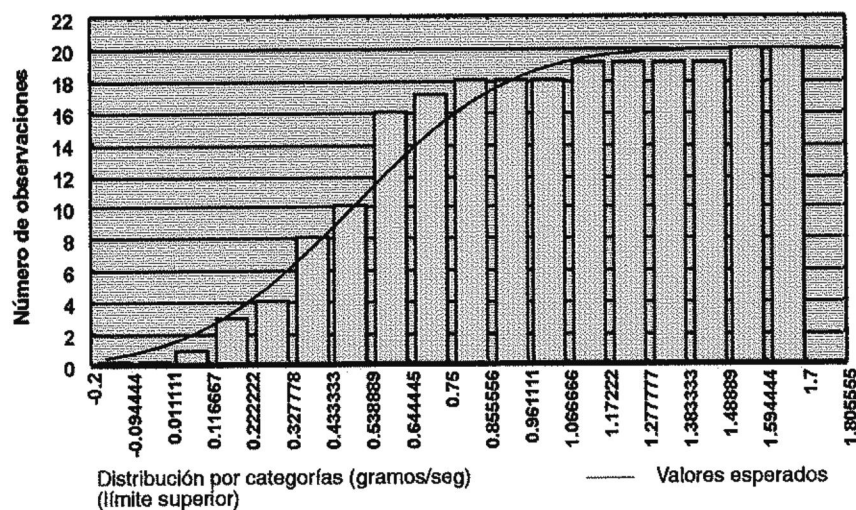
### ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE

Kolmogorov-Smirnov  $d = .1390879$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



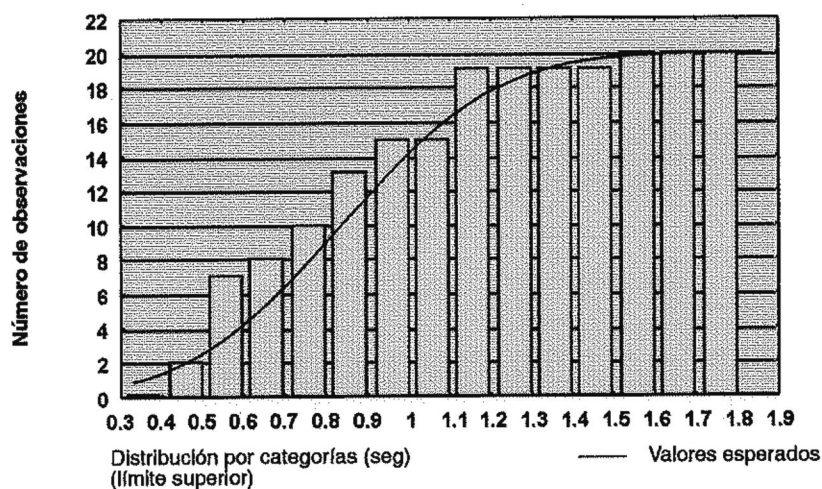
**GRAFICA 4.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE VELOCIDAD DE DESARROLLO DE FUERZA DE CONTRACCION DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum*.

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .1742841$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



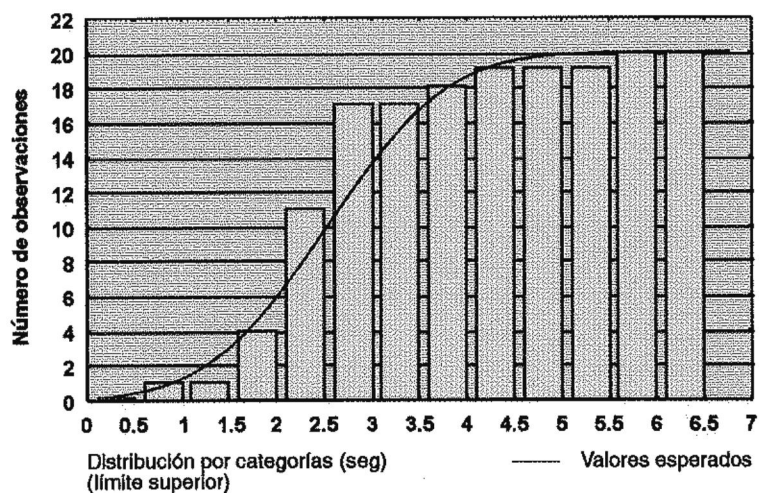
**GRAFICA 5.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE DESARROLLO DE FUERZA DE LLENADO DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tridacina stultorum*

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .1679182$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



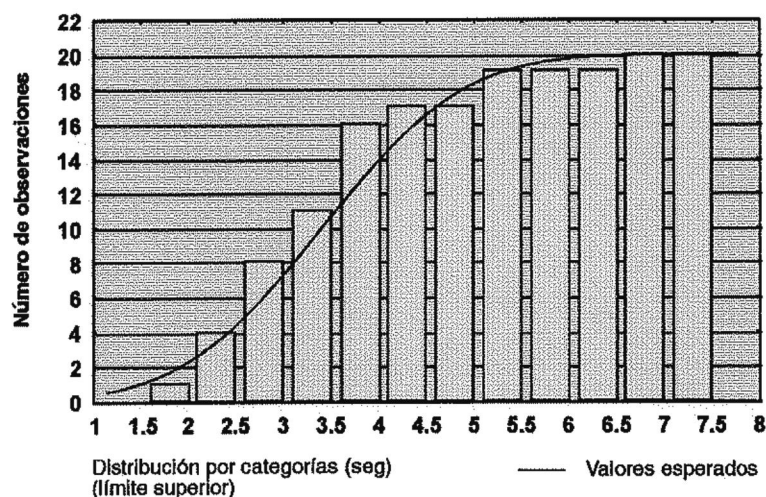
**GRAFICA 6.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE DURACION DEL LLENADO VENTRICULAR DE LA ALMEJA PISMO *Tridacina stultorum*.

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .2191618$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



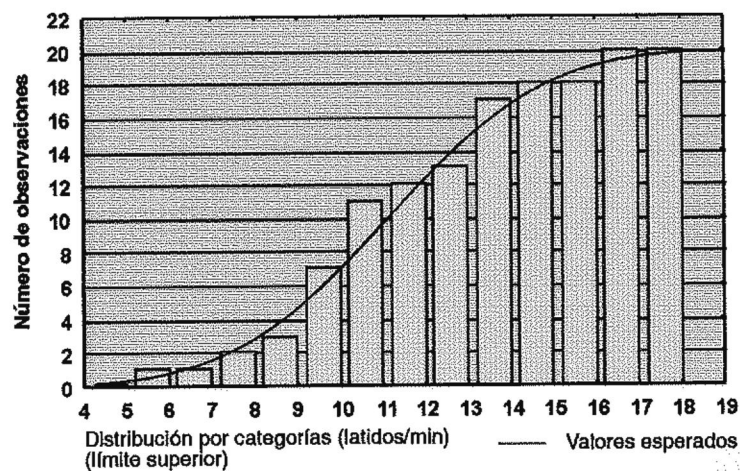
**GRAFICA 7.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE TIEMPO DEL LLENADO DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tridacna stultorum*.

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
Kolmogorov-Smirnov  $d = .1451349$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$



**GRAFICA 8.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE DURACION DE LA SISTOLE DE LA ALMEJA PISMO *Tridacna stultorum*.

**ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE**  
 Kolmogorov-Smirnov  $d = .1080269$ ,  $p = \text{n.s.}$   $\alpha = 0.05$

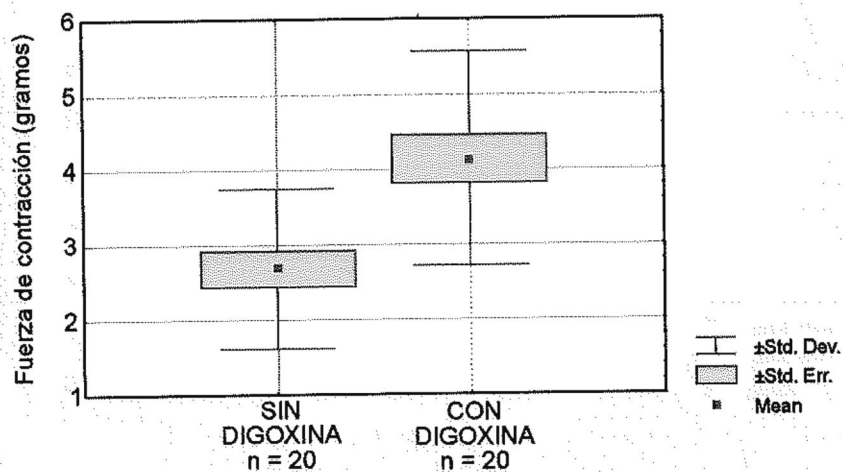


**GRAFICA 9.** DISTRIBUCION DE DATOS PARA EL ANALISIS DE BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES DE FRECUENCIA CARDIACA DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum*.

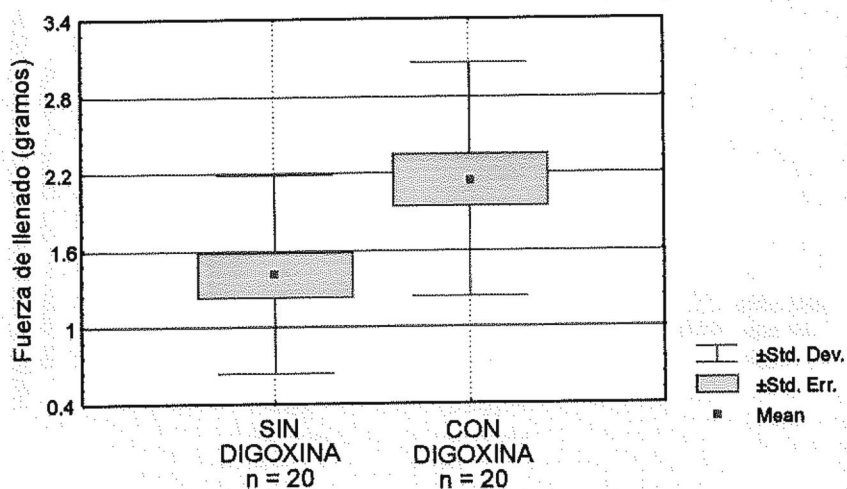
## Apéndice 3

Comparación gráfica de promedios de los parámetros biofísicos del ventrículo de la almeja pismo *Tivela stultorum* antes y después del tratamiento con digoxina. En todas las gráficas (10-18) de las páginas siguientes se muestran los resultados del tratamiento de 20 pares de datos con el programa CSS Statística (versión 3.0).

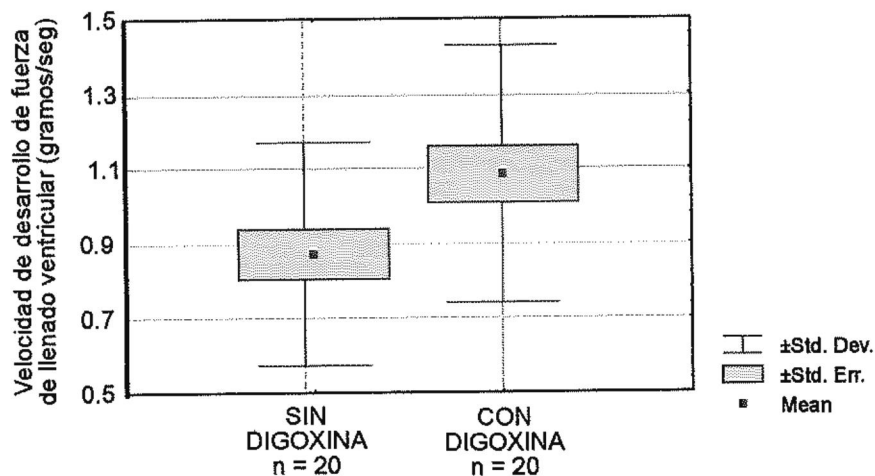




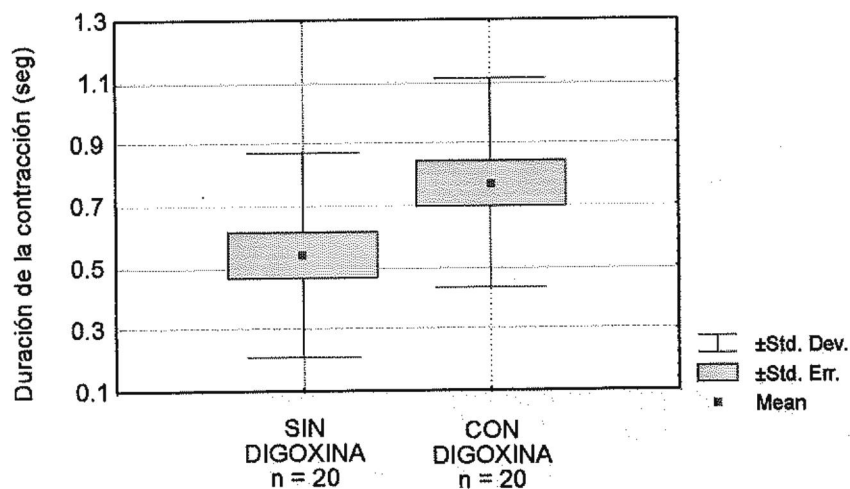
**GRAFICA 10.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE FUERZA DE CONTRACCION DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



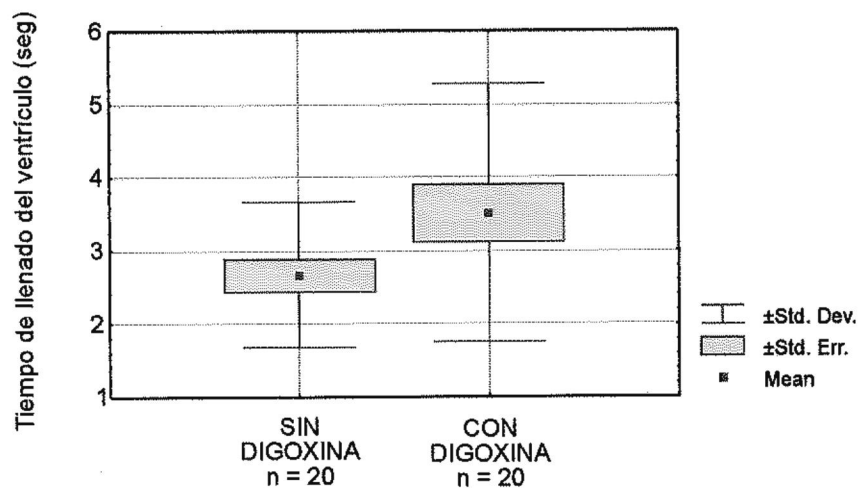
**GRAFICA 11.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE FUERZA DE LLENADO DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



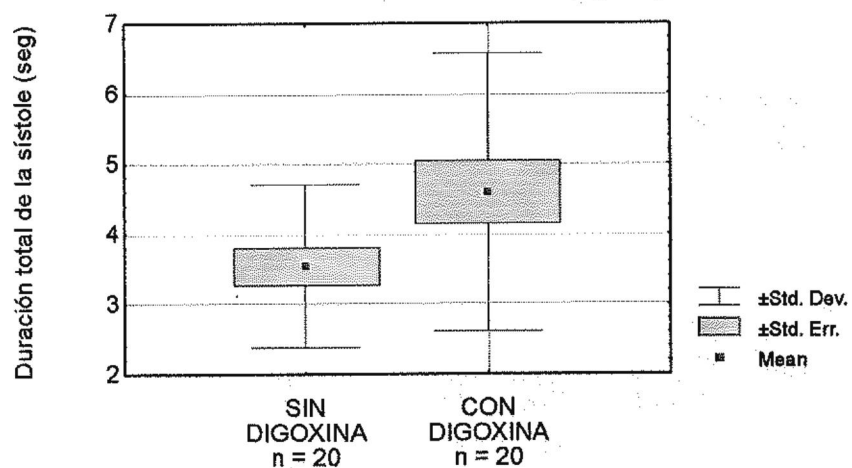
**GRAFICA 14.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE VELOCIDAD DE DESARROLLO DE FUERZA DE LLENADO VENTRICULAR DE LA ALMEJA PISMO *T.stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



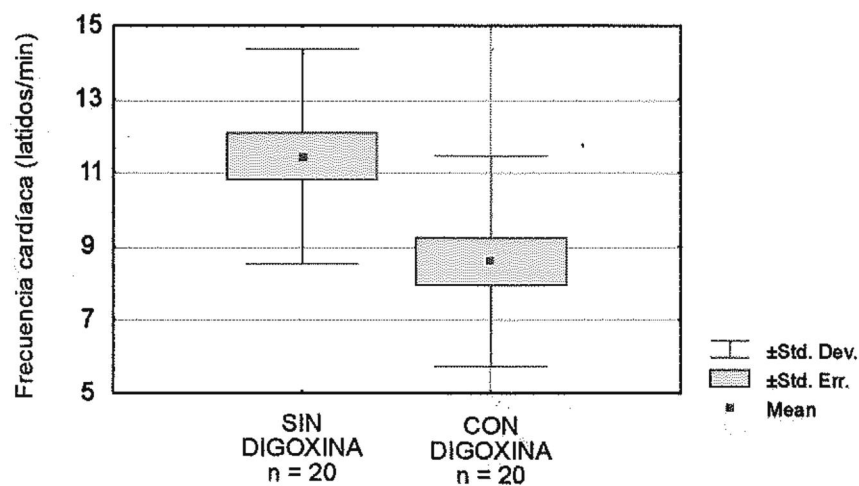
**GRAFICA 15.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE LA DURACION DE LA CONTRACCION DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *T.stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



**GRAFICA 16.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE TIEMPO DE LLENADO VENTRICULAR DE LA ALMEJA PISMO *T. stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



**GRAFICA 17.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE LA DURACION TOTAL DE LA SISTOLE DEL VENTRICULO DE LA ALMEJA PISMO *Tivela stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.



**GRAFICA 18.** COMPARACION DE LOS VALORES PROMEDIO DE FRECUENCIA CARDIACA DE LA ALMEJA PISMO *T. stultorum* ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DIGOXINA.