

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**EFFECTO DE EXTRACTOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL
SISTEMA DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE**

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRFÍA COSTERA

PRESENTA

GABRIELA ALARCÓN ARTEAGA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. JULIO 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

EFFECTO DE EXTRACTOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL
SISTEMA DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE

TESIS


QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

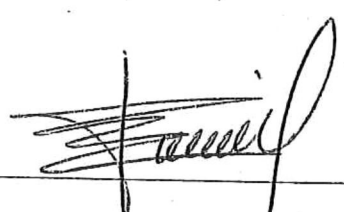
PRESENTA:

GABRIELA ALARCÓN ARTEAGA

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Directora de tesis



Dra. Irma E. Soria Mercado
Sinodal



Dr. José A. Zertuche González
Sinodal

A Chelo

Aún ahora sigo aprendiendo de tu forma de enfrentar la vida. Me enseñaste con ejemplo sobre la fe, esperanza y sobre todo paciencia. Espero algún día aprender esas lecciones. Por lo pronto, aquí está algo que te prometí, porque tu recuerdo era lo que me alentaba a seguir adelante.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dr. Graciela Guerra, gracias por su orientación, tiempo y paciencia tanto para hacer esta tesis como en el lado personal.

A mis sinodales Dra. Irma E. Soria Mercado y Dr. José A. Zertuche González, gracias por las observaciones hechas para este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Farmacología Marina, gracias por permitirme compartir con ustedes el tiempo y espacio.

A Mily, Manuel, Epi y Arturo del Almacén de la FCM, gracias por su apoyo con el material y el hielo.

A CONACYT, por su apoyo con la beca de maestría con registro 198907.

Al Oc. Raúl Aguilar Rosas, por su ayuda en la identificación de las especies de algas.

Al Dr. Luis Walter Daessle Heuser y a la M.C. Karina Lugo Ibarra por su apoyo para liofilizar las muestras.

Al M.V.Z. Luís Aldaco, por su apoyo desinteresado en el cuidado de los conejos.

A mi mamá, gracias por todo tu apoyo y amor a lo durante toda mi vida. Gracias compartir mis preocupaciones, triunfos y sueños

A la familia Rojo Barrera, por cuidar de la Zumi y de mí durante todos estos años y por su ayuda para hacer los secadores.

A mi familia por mantenerme en sus corazones aun en la distancia. Gracias por su apoyo y cariño.

A mis amigos y compañeros de la maestría y cubos Constanza, Ada, Monse, Leslie y Astrid. Gracias por enseñarme tantas cosas sobre como enfrentar la vida. Gracias por su amistad, cariño y por escucharme en mis malos momentos.

A la Zumi, por ser una excelente compañera y la mejor aspirina.

RESUMEN

Con el fin de buscar nuevos compuestos con potencial farmacológico, se evaluó la actividad anticoagulante de cinco macroalgas marinas. Se colectaron *Egregia menziessi*, *Ulva nematoidea*, *Porphyra perforata*, *Silvetia compressa* y *Codium fragile* y se transportaron al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la UABC. Después de eliminar epífitas, se secaron, molieron y se realizó un análisis proximal. A partir de las muestras algales molidas se obtuvieron extractos metanólicos mediante un sistema de extracción Soxhlet y etanólicos usando un sistema de reflujo. Adicionalmente se obtuvieron extractos acuosos en frío y caliente para obtener polisacáridos sulfatados. Con el fin de establecer la relación entre el contenido de sulfatos y la actividad anticoagulante se determinó el contenido de este grupo en los extractos acuosos. Se midió el tiempo de coagulación con las pruebas de tiempo parcial de tromboplastina activada y tiempo de protrombina (aPTT y PT respectivamente, por sus siglas en inglés). Se encontró actividad anticoagulante tanto en los extractos orgánicos como en los acuosos. Además, varios extractos presentaron actividad anticoagulante por la vía intrínseca, mientras que por la vía extrínseca tuvieron actividad coagulante. La mayor actividad anticoagulante se obtuvo con el extracto caliente de *Ulva nematoidea* con un índice de aPTT de 1.8 a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, el extracto caliente de *Egregia menziessi* presentó la mayor potencia como anticoagulante, con un índice de aPTT de 1.4, a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. No se encontró una relación entre el contenido de sulfatos y la actividad anticoagulante de los extractos acuosos. Se sugiere la purificación de los extractos que presentaron actividad anticoagulante.

ÍNDICE

	Página
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Anticoagulantes.....	5
2.0 ANTECEDENTES.....	9
3.0 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	16
4.0 OBJETIVO.....	16
5.0 METODOLOGÍA.....	17
5.1 Estrategia General.....	17
5.2 Material Biológico.....	17
5.2.1 Colecta.....	17
5.2.2 Identificación de las especies utilizadas.....	18
5.3 Análisis Proximal.....	19
5.4 Obtención de Extractos.....	23
5.4.1 Extractos etanólicos.....	23
5.4.2 Extractos acuosos.....	23
5.4.3 Extractos metanólicos.....	24
5.4.4 Asignación de códigos.....	24
5.5 Evaluación de la actividad anticoagulante.....	25
5.5.1 Obtención de plasma.....	25
5.5.2 Tiempo de trombina parcial activada.....	26
5.5.3 Tiempo de protrombina.....	26
5.5.4 Control positivo.....	27
5.5 Análisis estadístico.....	27
5.6 Índices de aPTT y PT.....	28
6.0 RESULTADOS.....	30
6.1 Análisis proximal.....	30
6.2 Extractos metanólicos y etanólicos.....	30
6.3 Extractos acuosos.....	30
6.4 Control positivo.....	31
6.5 Pruebas anticoagulantes.....	33
7.0 DISCUSIÓN.....	45
8.0 CONCLUSIONES.....	60

9.0 ANEXO 1.....	61
10.0 REFERENCIAS.....	64

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Claves de identificación de extractos preparados a partir de las especies algales colectadas.....	25
Tabla II. Análisis proximal en porcentaje (%) de las muestras de alga seca.....	30
Tabla III. Peso de muestra despigmentada y liofilizada y porcentaje de rendimiento de los extractos acuosos obtenidos a partir de 80 g de cinco especies de algas secas y molidas.....	31
Tabla IV. Índice de aPTT (n=8) e índice de PT (n=4) para un intervalo de heparina comercial para PPP de conejo.....	32
Tabla V. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos metanólicos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4).....	34
Tabla VI. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos etanólicos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4).....	37
Tabla VII. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos acuosos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4).....	41
Tabla VIII. Contenido de sulfatos por mg de muestra presente en los extractos acuosos obtenidos (n=2).....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso de coagulación de la sangre. (Modificado de Fedan, 1984 y Alban y Franz, 2001).....	3
Figura 2. Mapa de Baja California, con las áreas de colecta marcadas...	18
Figura 3. Diagrama de bloques que representa el análisis estadístico aplicado a los resultados de aPTT y PT.....	28
Figura 4. Índice de aPTT (n=8) e índice de PT (n=4) para un intervalo de heparina comercial para PPP de conejo.....	32
Figura 5. Índice de aPTT para los extractos metanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente al control.....	35
Figura 6. Índice de PT para los extractos metanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control.....	36
Figura 7. Índice de aPTT para los extractos etanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control.....	38
Figura 8. Índice de PT para los extractos etanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control.....	39
Figura 9. Índice de aPTT para los extractos acuosos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control.....	42
Figura 10. Índice de PT para los extractos acuosos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control.....	43

1. Introducción.

Los anticoagulantes que se encuentran actualmente en el mercado tienen un gran número de reacciones secundarias, la más importante y grave es el riesgo de hemorragia. Existen diversos estudios de sustancias con potencial anticoagulante provenientes de macroalgas; sin embargo, no hay estudios sobre este tema para macroalgas presentes en las costas de Baja California. Con esto en mente, se estudió el efecto que tienen diversos extractos algales sobre el sistema de coagulación de la sangre.

La sangre es un tejido líquido compuesto de elementos suspendidos en el plasma. Los eritrocitos, conocidos como glóbulos rojos, transportan oxígeno y dióxido de carbono; los leucocitos, llamados también glóbulos blancos, protegen al cuerpo de infecciones; las plaquetas o trombocitos, los elementos más pequeños, desempeñan un papel importante en la coagulación sanguínea. La hemostasia es el proceso mediante el cual la sangre contenida dentro del sistema circulatorio se mantiene en estado líquido, previene la pérdida de sangre en caso de una lesión y restablece el flujo sanguíneo durante el proceso de curación. De forma general, el proceso de hemostasia consiste de cuatro fases principales: vascular, plaquetaria, de coagulación y fibrinolítica. Las primeras tres fases tienen como resultado la formación de un coágulo o trombo, para evitar una hemorragia; mientras que la última fase impide la formación de coágulos más allá del lugar afectado y una vez que el tejido ha sanado, disuelve

el coágulo formado (Purves et al., 1998, Fedan, 1984, Fritsma, 2002a y Fritsma, 2002b).

El daño a los vasos sanguíneos desencadena un estímulo que induce la vasoconstricción y provoca una disminución del flujo sanguíneo en la zona dañada. Posteriormente, las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno que se encuentran en las arterias y venas, iniciando la coagulación de la sangre en su fase plaquetaria. En la tercera etapa, o fase de coagulación intervienen al menos 16 glucoproteínas, llamadas factores de coagulación, que se encuentran en la sangre y que se han agrupado en dos sistemas, extrínseco e intrínseco (Fritsma, 2002a). El primer sistema consiste en una serie de reacciones acopladas que convierten los factores inactivos presentes en la sangre en factores activos. Por otra parte, el sistema extrínseco inicia cuando se produce una lesión en el endotelio que activa el factor tisular, o tromboplastina. A diferencia de los factores de coagulación, la tromboplastina no se encuentra en la sangre sino en el tejido muscular y en arterias y venas. Los dos sistemas o vías se unen al transformarse a la enzima protrombina en trombina; que a su vez, transforma al fibrinógeno, una proteína soluble, en fibrina. La agrupación de la fibrina con glóbulos rojos y plaquetas produce el coágulo que detiene la hemorragia (Fedan, 1984, Majerus y Tollefsen, 2003) (figura 1). En la figura 1, los factores de coagulación se presentan con números romanos, que son nombrados de esta forma a nivel internacional.

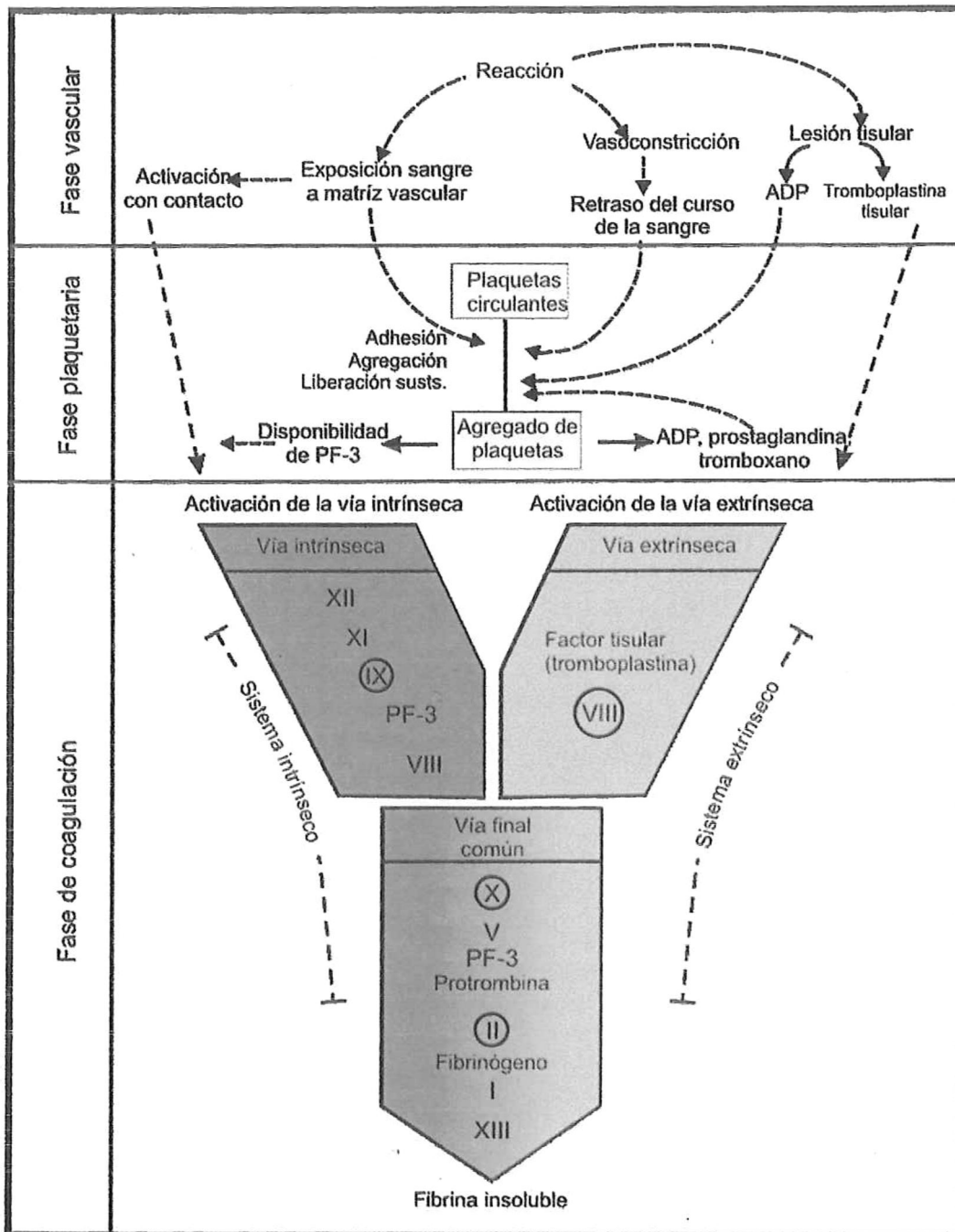


Figura 1. Proceso de coagulación de la sangre. Se muestran las tres primeras etapas de la hemostasia. Los números romanos denotan los factores de coagulación, que son nombrados internacionalmente de esta manera (Modificado de Fedan, 1984 y Alban y Franz, 2001)

En un organismo sano, únicamente se producen coágulos en zonas bien definidas del sistema vascular que han sufrido algún daño. Sin embargo, cuando hay un desbalance en el sistema de hemostasia se produce una trombosis, es decir, una formación inapropiada de coágulos de fibrina o plaquetas que obstruyen las paredes de las venas o arterias. La trombosis puede ser causada por desórdenes congénitos o condiciones adquiridas. Entre los factores de riesgo que contribuyen a la trombosis están la edad, inmovilización, malos hábitos alimenticios, niveles altos de colesterol, niveles de estrógenos elevados debido al embarazo o al uso de anticonceptivos, fracturas, reemplazo de rodilla o cadera, cirugía ginecológica, de próstata o neurocirugía, consumo de tabaco e inflamación crónica o aguda (Fritsma, 2002b).

Para tratar la trombosis se utilizan fármacos cuya función es equilibrar el sistema de hemostasia. Los principales son los anticoagulantes y los trombolíticos; la función de los primeros es la de impedir la formación de coágulos, mientras que los segundos deshacen los trombos ya existentes. Ambos grupos son ampliamente usados debido a que la incidencia de trombosis a nivel mundial es del 30%; y en cinco de cada seis casos el trombo es fatal desde su primera ocurrencia (Fritsma, 2002b).

Las enfermedades cardiovasculares son la causa número uno de muertes a nivel global; simplemente, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005, el 30% de las muertes reportadas en el mundo

fueron debidas a estas enfermedades (Basson, 2008). De forma particular, la trombosis aguda arterial es la principal causa de la mayoría de los casos de ataques cardíacos y del 80% de las embolias, que son la principal causa de muerte en los países del primer mundo (Mackman, 2008). Esta tendencia a nivel mundial, es la misma observada para México; de acuerdo a la OMS, el 21.5% de las muertes reportadas en este país en el 2002, fueron debidas a enfermedades cardiovasculares. La segunda causa de mortalidad fue el cáncer, 12.66%, y la tercera la diabetes con un 12.63% (WHO, 2004). Finalmente, en Estados Unidos, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los latinos e hispanos, y se calcula que un tercio de la población de adultos mexicoamericanos tienen enfermedades cardiovasculares (American Heart Association, 2007).

1.1 Anticoagulantes

Los anticoagulantes son fármacos que actúan sobre alguna fase del sistema de coagulación impidiendo la formación de nuevos coágulos pero no deshacen los trombos ya formados (Fedan, 1984). Entre estos medicamentos se destaca la heparina, un glucosaminoglucano, que se encuentra en altas concentraciones en el hígado, y que por más de medio siglo ha sido considerada el anticoagulante por excelencia (Fareed et al., 2000). Esta sustancia acelera unas 1000 veces la acción de la antitrombina, un inhibidor de la trombina y los factores de coagulación Xa y XIa (Esmon, 2005). La heparina,

que inhibe la formación de coágulos *in vivo* e *in vitro*; logra un efecto anticoagulante casi inmediato en una sólo dosis cuando se administra por vía intravenosa. A diferencia de otros anticoagulantes, esta sustancia no se une a las proteínas de la leche materna ni tiene la capacidad de cruzar la placenta, por lo que puede ser utilizada durante el embarazo y lactancia (Fedan, 1984).

Entre las reacciones secundarias que se presentan al administrar heparina se encuentran las hemorragias, necrosis de la piel asociada al uso endovenoso, osteoporosis en casos de uso prolongado y en altas dosis, alopecia transitoria, hiperlipidemia al suspender la terapia, elevación de los niveles de transaminasas, hipoaldosteronismo y reacciones de hipersensibilidad (Contreras-Carreto y Robles-Landa, 2004). Otra de las complicaciones asociada al uso de la heparina es la trombocitopenia y trombosis inducidas por heparina (TTIH), caracterizada por la formación de un trombo plaquetario que causa oclusión vascular y que puede llegar a la gangrena. Esta condición eleva la mortalidad a 30% y la morbilidad permanente entre 20 y 30 %. El tratamiento más común para la trombocitopenia es la suspensión de la administración de heparina, y el uso de otro anticoagulante (Núñez-Quintana et al., 2001). Por otra parte, la heparina tiene varias contraindicaciones ya que no debe ser administrada a personas con lesiones gastrointestinales, hipertensión o mujeres de edad avanzada; además, las drogas como aspirina, antihistamínicos, quinina, tetraciclinas y neomicina afectan la acción de la heparina (Fedan,

1984). Para evitar complicaciones, es necesario que el paciente sea monitoreado constantemente mediante pruebas de laboratorio.

Además de las reacciones secundarias asociadas al uso de la heparina, existen otras desventajas, como las variaciones en sus parámetros estructurales y en consecuencia en su actividad biológica (Alban y Franz, 2001). Debido a dichas variaciones, menos de un tercio de la heparina en las preparaciones comerciales es capaz de inhibir la trombina, mientras que menos del 10% de los proteoglucanos similares a la heparina tienen actividad anticoagulante (Esmon, 2005).

La heparina se obtiene principalmente a partir del pulmón del ganado bovino; existe la preocupación de que se transmita a través del fármaco, el mal de Creutzfeldt-Jakob, una enfermedad degenerativa del cerebro que causa demencia asociada al mal de las vacas locas (Trento et al., 2001). Alban (2005), afirma que no se ha reportado ningún caso de mal de Creutzfeldt-Jakob asociado al uso de heparina. Sin embargo, todas las heparinas comercializadas en Europa y Norte América se obtienen a partir de la mucosa intestinal de porcino, por lo que anualmente son necesarios más de 200 millones de cerdos para la obtención de heparina para tratar a más de 20 millones de personas alrededor del mundo (Alban, 2005). Además, el uso de heparina a partir de ganado porcino tiene problemas de uso asociados a restricciones religiosas (Luppi et al. 2005). Otra de las desventajas para ambas fuentes de obtención,

tanto ganado bovino como porcino, es que la heparina se encuentra en concentraciones muy bajas, por lo que el rendimiento a nivel comercial es muy bajo (Athukorala et al., 2006). Estos hechos, aunados a los efectos secundarios del uso de la heparina, hacen necesaria la búsqueda de nuevas sustancias anticoagulantes que suplan a la heparina en su uso. Los nuevos fármacos deberán tener pocas reacciones secundarias, con los cuales el paciente no requiera de un monitoreo continuo durante el tratamiento. Esta sustancia debe ser más homogénea, mejor caracterizada que la heparina y que tenga un menor costo de producción (Weitz y Bates, 2005).

2. Antecedentes

Las pruebas utilizadas para el cribado de sustancias anticoagulantes son las mismas pruebas clínicas que se usan para observar las deficiencias en los diferentes factores de coagulación de la sangre en pacientes. Existen dos pruebas principales que no sólo evalúan el potencial anticoagulante, sino también los factores de coagulación a los que está inhibiendo: el tiempo de protrombina (PT, por sus siglas en inglés), que determina la interferencia con el sistema extrínseco y el tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT por sus siglas en inglés) que actúa sobre el sistema intrínseco de coagulación. En general, estas pruebas miden el tiempo que se tarda la sangre en coagular bajo el efecto de algunos factores de coagulación (Alban y Franz, 2001).

La búsqueda de nuevos anticoagulantes ha incluido organismos marinos, particularmente algas debido a su alto contenido de polisacáridos sulfatados, (constituyentes de la pared celular de las algas) y a su relativo bajo costo de extracción. Los polisacáridos sulfatados se encuentran en las algas rojas, pardas y verdes. En las rodofitas son conocidos comercialmente como carragenano y agar. Los polisacáridos sulfatados de las algas pardas se conocen como fucanos; mientras que en las algas verdes estos compuestos se conocen como heteropolisacáridos (Shanmugam y Mody, 2000).

Se ha reportado el estudio de la actividad anticoagulante de los carragenanos de más de 40 especies de algas rojas, entre ellas destacan *Chondrus crispus*, *Eucheuma cottoni*, *E. spinosum*, *Gigartina acicularis*, *G. pistillate* y *G. radula*. Se ha reportado que en general, el λ -carragenano tiene aproximadamente el doble de actividad que el carragenano sin fraccionar y cuatro veces más actividad que el κ -carragenano. Sin embargo, el carragenano más activo tiene un quinceavo de la actividad de la heparina (Shanmugam y Mody, 2000). Se han realizado modificaciones a los carragenanos con el fin de aumentar su actividad anticoagulante, y que consisten en variar el contenido de sulfatos y se encontró que los λ -, κ -, y τ -carragenanos con alto contenido de azufre (5.1, 4.3 y 4.3 moles por mol de disacárido, respectivamente) y con mayor peso molecular ($105-189 \times 10^4$) muestran una mayor actividad que aquellos con un bajo contenido de azufre (1.2-1.9 moles por mol de disacárido) y con bajo peso molecular (1.0×10^4). Entre los tres tipos de carragenano, el λ -carragenano tiene la mayor actividad anticoagulante (Yamada et al., 1997).

Desde 1941, se ha estudiado la actividad anticoagulante de cerca de 60 algas pardas; siendo *Fucus vesiculosus* una de las más estudiadas (Shanmugam y Mody, 2000). Un fucoidano proveniente de *F. vesiculosus* presenta una inhibición de la tromboplastina y la trombina. Los autores encontraron que dicho extracto tiene un 6- 8% de azufre, 31-36% de fucosa,

23-27% de ácido urónico, peso molecular de 450,000-800,000 Da, y un aPTT de 40-60 IUmg⁻¹ (Trento et al., 2001, Cedro et al., 1999).

Nishino y colaboradores (1992) estudiaron diferentes polisacáridos del alga parda *Ecklonia kurome* con actividad anticoagulante. Uno de estos polisacáridos, C-II, compuesto principalmente de fucosa, presentó aproximadamente 85% de actividad de la heparina. Los autores encontraron dos posibles mecanismos de acción; por una parte aceleró la inhibición del cofactor II de heparina por parte de la trombina y por otra, bloqueó el sitio activo de la trombina en el fibrinógeno. Estudios posteriores, sugirieron una relación entre el contenido de sulfatos, peso molecular y actividad anticoagulante. Los autores encontraron que cuando la proporción de sulfatos con respecto a los residuos totales de azúcares era menor a 0.3, el compuesto no presentaba actividad anticoagulante. Por otra parte, la sulfatación de C-II produjo un aumento de la actividad anticoagulante entre un 110-140% de actividad con respecto a C-II sin sulfatar; sin embargo, a altas concentraciones de sulfato, la actividad anticoagulante llegó a una fase estacionaria (Nishino et al., 1989, 1991a, 1991b, 1991c, 1992, Nishino y Naguno, 1991, Nishino y Naguno 1992).

También se ha estudiado el potencial anticoagulante de *Pelvetia canaliculata*, de la cual se extrajo un fucoidano heterogéneo de alto peso molecular que fue fraccionado. La fracción F2, fue estudiada más

ampliamente. Para esta fracción se realizaron las pruebas PT, aPTT y TT, y se encontró que puede tener el mismo tiempo de coagulación que la heparina con una concentración 50 veces mayor que esta. Además los estudios sugieren que la capacidad anticoagulante de F2 se da al aumentar la inhibición del factor II en presencia del AT III o HC II (Colliec et al., 1991).

Mori et al. (1995) en Amano et al. (2005), reportaron que una fracción de polisacáridos sulfatados de la esporofila de *Undaria pinnatifida* mostró una actividad antitrombótica *in vitro*, del doble de la actividad de la heparina. Por otra parte, Shanmugam y Mody (2000), reportaron que los fucoidanos de *Eisenia bicyclis*, *Laminaria angustata*, *L. religiosa*, *L. digitata*, *L. hyperborea*, *L. saccharina*, *Pelvetia canaliculata*, *P. wrightii* y *Fucus spiralis* tienen una alta actividad anticoagulante.

En general, los compuestos con alto contenido de ácido urónico tienen una baja actividad anticoagulante. Sin embargo, a pesar de que el fucano sargasano tiene un alto contenido de ácido urónico, esta sustancia tiene una actividad anticoagulante mayor que la heparina. Una actividad anticoagulante similar se ha encontrado en *Padina pavonia*, *P. tetrastronica* y *Dictyota dichotoma* (Shanmugam y Mody, 2000).

La actividad anticoagulante de las algas verdes empezó a ser estudiada a finales del siglo XX y hasta la fecha se ha reportado la propiedad

anticoagulante de 45 algas verdes. Entre las algas verdes que han sido exploradas se encuentran *Monostroma nitidum*, *Codium tomentosum*, *C. fragile* spp. *tomentosoides*, *C. fragile* spp. *atlanticum*. Se ha observado que en general, la actividad es directamente proporcional al contenido de carbohidratos y azufre e inversamente proporcional al contenido de proteínas en el proteoglucano (Shanmugam y Mody, 2000).

A partir de *Codium dwarkense*, Siddhanta (1999) obtuvo polisacáridos sulfatados usando agua fría y caliente. La actividad anticoagulante se determinó con aPTT, PT y TT, y encontraron que el extracto de agua fría, llamado CWE, presentó una mayor actividad anticoagulante que el extracto con agua caliente, HWE. La muestra CWE fue fraccionada y caracterizada, los resultados indicaron que la actividad anticoagulante es proporcional al contenido de carbohidratos y sulfato e inversamente proporcional al contenido de proteína y ácido urónico. También encontraron una relación entre el contenido de arabinosa y la actividad anticoagulante, ya que la fracción más activa, A2, estaba compuesta por un 100% de arabinosa.

Shanmugam et al. (2001) obtuvieron extractos acuosos a partir de *C. dwarkense* agrupadas de acuerdo a la longitud de las plantas, de los utrículos y el porcentaje y tamaño de gametangios, con el fin de establecer una relación entre la actividad anticoagulante y su ciclo de vida. Los autores encontraron que los polisacáridos sulfatados aislados de las algas en estado

reproductivo con el 100% de los gametangios, presentaron la mayor actividad anticoagulante. Además, encontraron que dichos extractos contenían el mayor porcentaje de azúcar (39.2%) y de sulfato (26%) y bajos niveles de proteína (6.48%) y de ácido urónico, (2.34%).

De Lara-Isassi et al. (2004) probaron la capacidad anticoagulante de 49 algas de diferentes clases provenientes de Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Estos autores encontraron que *Anadyomene stellata*, *Caulerpa cupressoides* (Chlorophyta), *Lobophora variegata* (Phaeophyta) y *Liagora farinosa* (Rodophyta) retrasan tanto el PT como el TT en la misma medida que $6.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de heparina. Mientras que *Caulerpa paspaloides* afecta únicamente el TT. Al igual que otros autores (Shanmugam et al., 2001 y Mao et al., 2006), De Lara-Isassi et al (2004) encontraron diferencias en la actividad anticoagulante para una misma especie en función de la localidad y época de colecta.

Entre las recomendaciones emitidas por el Committee on Marine Biotechnology del National Research Council (NRC) de Estados Unidos, para incrementar el descubrimiento de fármacos a partir organismos marinos, se encuentran la exploración de nuevos hábitats y tener un suministro suficiente de materia prima (NRC, 2002). Las costas de Baja California en México, contienen especies de macroalgas que las hacen un lugar ideal para realizar estudios de cribado de algas con actividad anticoagulante. Pedroche y

Sentíes (2003) reportan para la parte occidental de Baja California 612 especies diferentes de macroalgas y 245 para el Golfo de California; mientras que la parte occidental del Baja California Sur tiene 444 especies de macroalgas registradas. Un estudio realizado por Aguilar-Rosas (2000) en las costas de Baja California reporta a *U. nematoidea*, *E. menziessi* y *P. perforata*, entre otras, como algas representativas de las costas de Baja California debido a su amplia distribución y ocurrencia. La gran diversidad de algas y su abundancia en Baja California nos da una idea del gran potencial farmacológico, que tiene esta región.

3. Hipótesis de trabajo

- ❖ En las costas de Baja California se encuentran macroalgas que tienen diferente potencial farmacológico. Los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos obtenidos a partir de macroalgas de esta región pueden tener actividad anticoagulante comparable con la heparina.

4. Objetivo

- ❖ Evaluar el efecto de extractos de origen marino sobre el sistema de coagulación en plasma pobre de plaquetas de conejo New Zealand.

5. Metodología

5.1 Estrategia general

Se colectaron cinco especies de algas en Eréndira y Ensenada B.C.. Una vez secas y molidas se utilizaron para obtener su análisis proximal, y extractos etanólicos, metanólicos y acuosos fríos y calientes. Se prepararon diferentes concentraciones de los extractos libres de solventes y sales para evaluar su potencial anticoagulante mediante las pruebas aPTT y PT. A continuación se detalla la metodología.

5.2 Material biológico

5.2.1 Colecta

Se realizaron tres colectas de algas en las costas de la región: el 30 de Junio de 2006 se colectó *Silvetia compressa* subs. *Compressa*, en las costas de Eréndira, Baja California (31° 16' 41" N, 116° 22' 16" W), el 9 de octubre de 2006 se colectó *Codium fragile* en la costa de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC (31° 51' 44" N, 116° 40' 64" W), finalmente el 4 de noviembre del mismo año se colectó *Egregia menziessi*, *Porphyra perforata*, y *Ulva nematoidea* en la localidad de Eréndira, (figura 2). Las algas se transportaron al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Facultad de

Ciencias Marinas, donde fueron enjuagadas con agua de mar para eliminar organismos epífitos y arena. Posteriormente, el material se secó al aire libre y en estufa a 60° C, y se molió hasta tener un tamaño de partícula de 2 mm. Todas las muestras fueron almacenadas en recipientes de plástico herméticos y opacos para su uso posterior. Se guardó un ejemplar de cada alga para su identificación.

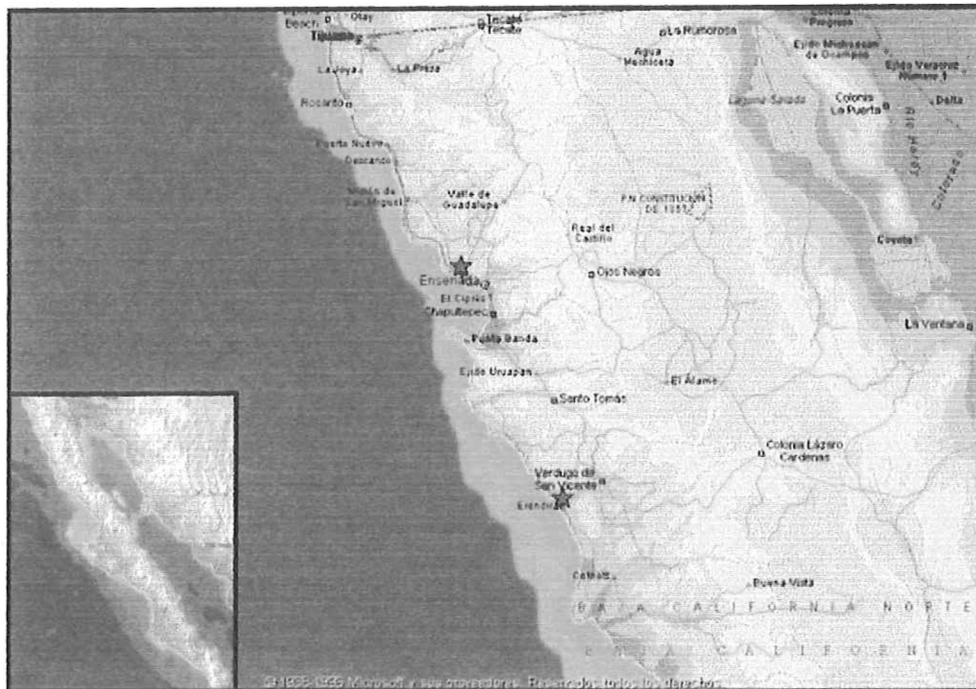


Figura 2. Mapa de Baja California, con las áreas de colecta marcadas.

5.2.2 Identificación de las especies utilizadas

La identificación de las algas colectadas fue realizada por el Oc. Raúl Aguilar Rosas de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC. En el anexo 1 se presenta la descripción y distribución de las algas colectadas.

5.3 Análisis proximal

Cada especie de alga colectada fue considerada un lote diferente y se realizó un análisis proximal. A continuación se describen las metodologías usadas para conocer el porcentaje de humedad, sólidos totales, cenizas, lípidos, proteínas y sulfatos.

Humedad y sólidos totales (Cunniff, 1995)

Se pesaron por quintuplicado de 2-3 g de alga molida en una cápsula de porcelana llevada a peso constante y se secó a 100 °C durante 4 horas, las cápsulas fueron enfriadas en un desecador y posteriormente se pesó la muestra seca. El porcentaje de humedad y de sólidos totales se determinaron mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - (MS/M) * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ Humedad} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

MS= peso de la muestra seca

M= peso de la muestra

Cenizas (Cunniff, 1995)

Se pesaron, por quintuplicado, de 3-5 g de muestra molida en una cápsula de porcelana a peso constante. La muestra se llevó a ignición en una

muffla a 525°C durante 8 horas. Las cápsulas se enfriaron en un desecador y se pesaron. El porcentaje de cenizas fue determinado mediante:

$$\% \text{ Cenizas} = (R / M) * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

R= peso del residuo

M= peso de la muestra

Lípidos (Cunniff, 1995)

Se pesó, por quintuplicado, 1g de muestra molida en un tubo de ensayo con tapón al que se le adicionaron 6 mL de HCl concentrado, posteriormente se calentó a baño maría a 100° C durante 90 minutos. Una vez enfriado el tubo, se le adicionaron 10 mL de éter de petróleo y se agitó. La fase orgánica se colocó en un vaso de precipitados a peso constante, y se evaporó el éter en baño de agua. Finalmente se secó el vaso en la estufa a 50°C a peso constante y se pesó. El porcentaje de lípidos se determinó mediante:

$$\% \text{ Lípidos} = (E/M) * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

E= peso del extracto etéreo

M= peso de la muestra

Nitrógeno y proteínas (Método MicroKjeldhal, Cuhhiff, 1995)

Se pesaron, por quintuplicado, entre 50 y 100 mg de alga seca y molida, y se colocaron en un matraz microKjeldhal al cual se le añadieron 2 g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 50 mg de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4 . La muestra se calentó en un digestor de proteínas durante 1.5 horas hasta la oxidación completa de la materia orgánica, señalada por un cambio en el color de la muestra. El residuo se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua destilada. Se tomaron 5 mL de la muestra aforada y se le agregaron 10 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 40%, y se colocaron en un aparato de destilación hasta tener 40-50 mL de destilado. El destilado se colectó en un matraz Erlenmeyer con 15 mL de H_3BO_3 al 3% y 3 gotas de indicador Tashiro. La muestra destilada se tituló con HCl 0.01 N hasta la aparición permanente de color azul-violeta. Paralelamente se trató un blanco de procedimientos utilizando el mismo procedimiento descrito sin adicionar muestra. El porcentaje de proteínas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% N = [(P - B) \cdot N \cdot 0.014 \cdot 100] / M \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\% \text{ proteínas} = \% N \cdot 6.25 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

% N = % nitrógeno

P = mL problema

B = mL blanco

M= peso de la muestra

Sulfatos (Spencer, 1960)

Esta determinación se realizó por duplicado para los extractos acuosos. En un tubo hecho de varilla de vidrio de 0.5 mm de diámetro interno se colocaron 0.5-1 mg de muestra y 5 mL de HCl. El tubo se selló con calor y se sometió a hidrólisis en una estufa a 105 °C durante 5 horas (Dodgson y Price, 1962). Una vez hidrolizada, se agitó la muestra y se diluyó con agua destilada para tener una concentración de SO_4^- entre 0.5 y 2 mgmL^{-1} . Para lograr esta concentración se hicieron varias mediciones preliminares y se ajustaron los factores de dilución de manera pertinente. Se tomaron 0.3 mL de hidrolizado y se le agregó 1.2 mL de etanol al 50% y 0.3 mL de cloranilato de bario (10 mgmL^{-1}) disuelto en buffer de acetatos 0.5M, pH 4, se agitó durante 10 minutos y se centrifugó a 3000 gravedades por 5 minutos. Se leyó la transmitancia a 530 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 de Milton Roy Company. Paralelamente, se realizó una curva de calibración de sulfatos de 0 a 2.5 mgmL^{-1} de SO_4^- usando un estándar de K_2SO_4 (Spencer, 1960).

5.4 Obtención de Extractos

5.4.1 Extractos etanólicos

Para la obtención de los extractos etanólicos de las cinco especies de algas se utilizó un sistema de reflujo utilizando 10 g de la muestra de alga seca y etanol por 12 horas. El extracto fue filtrado y concentrado a sequedad en un rotaevaporador. Finalmente el extracto se disolvió con agua destilada para dializarlo y eliminar sales se utilizó una membrana de diálisis (Spectrapor m. w. Cutoff 12,000 – 14,000)

5.4.2 Extractos acuosos

Se colocaron 80 g de alga seca en un sistema de extracción Soxhlet con metanol para despigmentar y desengrasar la muestra. La muestra despigmentada se secó a temperatura ambiente y se le agregaron 20 volúmenes de agua destilada. La mezcla se mantuvo durante 12 horas a 5 °C. Posteriormente, el extracto fue filtrado, concentrado en un rotaevaporador y precipitado con cuatro volúmenes de acetona. El precipitado se disolvió en la mínima cantidad de agua y se dializó en una membrana de diálisis (Spectrapor m. w. Cutoff 12,000 – 14,000) y se sometió a liofilización por 5 días. El residuo algal se colocó en 20 volúmenes de agua entre 70-80°C durante 3 horas. Para el extracto caliente se siguieron los mismos pasos que

para el extracto frío desde la filtración hasta su liofilización (Siddhanta et al. 1999).

5.4.3 Extractos metanólicos

Los extractos metanólicos se obtuvieron mediante un sistema de extracción Soxhlet, utilizando 80 g de alga seca y metanol. Al igual que para los etanólicos, los extractos metanólicos fueron filtrados, concentrados en un rotaevaporador y dializados.

5.4.4 Asignación de códigos

Todos los extractos obtenidos recibieron un código para identificarlos. La primera letra indica al género al que pertenece la especie: *C. fragile* (C), *U. nematoidea* (U), *E. menziessi* (E), *S. compressa* (S) y *P. perforata* (P); la segunda corresponde al solvente utilizado: metanol (M), etanol (E), acuoso frío (F) o acuoso caliente (C). Algunos extractos metanólicos se separaron en diferentes fases, que se diferenciaban visualmente por la intensidad del color, densidad o aspecto general. Cada una de estas fase se tomó como un nuevo extracto y el número indica la fase a la que corresponde. En el caso de los extractos que no se separaron en diferentes fases, se omitió el número. En la tabla I se muestra una relación de los extractos obtenidos y su código.

Tabla I. Claves de identificación de extractos preparados a partir de las especies algales colectadas.

Especie	Solvente	Extracto
<i>Codium fragile</i>	Metanol	CM
	Etanol	CE
	Ac. frío	CF
	Ac. caliente	CC
<i>Ulva nematoidea</i>	Metanol	UM1
		UM2
		UM3
	Etanol	UE
	Ac. caliente	UC
<i>Egregia menziessi</i>	Metanol	EM
	Etanol	EE
	Ac. frío	PF
	Ac. caliente	PC
<i>Silvetia compressa</i>	Metanol	SM1
		SM2
	Etanol	SE
	Ac. frío	SF
	Ac. caliente	SC
<i>Porphyra perforata</i>	Metanol	PM1
		PM2
		PM3
	Etanol	PE
	Ac. frío	PF
	Ac. caliente	PC

5.5 Evaluación de la actividad anticoagulante

5.5.1 Obtención de plasma

Se utilizó sangre de conejo New Zealand obtenida mediante punción en la oreja previa limpieza con tolueno para provocar la expansión venosa. En un tubo de ensayo con 0.3 mL de citrato de sodio al 3.8% se colectó 2.7 mL de sangre y se agitó suavemente. La sangre fue centrifugada por 20 min. a 2400 xg para remover plaquetas y eritrocitos. El plasma pobre de plaquetas

(PPP) fue colocado en un baño de hielo para su uso posterior (Ho y Wu, 1991). Las pruebas de coagulación fueron realizadas por cuadruplicado (Ravel, 1995).

5.5.2 Tiempo de trombina parcial activada (aPTT)

A 90 μL de PPP se le agregaron 10 μL del extracto a probar y la mezcla se incubó por 1 minuto a 37° C, posteriormente se adicionaron 100 μL del reactivo de Actin Cefaloplastina (Dade Behring) y se incubó por 3 min. a 37° C. Finalmente se agregaron 100 μL de cloruro de calcio (CaCl_2) 0.025 M y se midió el tiempo que tardó en coagular la mezcla (Athukorala et al., 2006). Cada extracto probado se manejó con el mismo lote de PPP y se trató un control negativo utilizando 10 μL de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85% en lugar del extracto. Todas las diluciones se realizaron con solución salina, cloruro de sodio (NaCl) al 0.85%

5.5.3 Tiempo de protrombina (PT)

Una mezcla de 90 μL de PPP con 10 μL del extracto a probar se incubó por 1 minuto a 37° C. Se agregaron 200 μL del reactivo de PT preincubado por 10 min. a 37° C y se midió el tiempo de coagulación en segundos (Athukorala et al., 2006). Al igual que en las pruebas de aPTT, cada extracto se probó con el mismo lote de PPP y se corrió un control positivo.

5.5.4. Control positivo

Para las pruebas de aPTT y PT se corrió un control positivo con cinco concentraciones de heparina, a partir de una ampolleta de Inhepar® (100 IU de heparina sódica por mL de Laboratorios Pisa® Farmacéutica Mexicana). Las diluciones se realizaron con solución salina al 0.85 %.

5.6 Análisis estadístico

A cada grupo de datos, control y diferentes concentraciones de un mismo extracto, se le aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, para probar normalidad y homocedasticidad respectivamente (Zar, 1999). En el caso de datos paramétricos, se realizó un análisis de varianza ANOVA Modelo I y en el caso de encontrar diferencias, estas se analizaron con la prueba paramétrica de Dunnett para detectar los extractos con diferencias significativas con respecto al control. Por otra parte, en el caso de datos no paramétricos, se trabajó con Kruskal-Wallis por rangos y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó Dunnett por rangos (Zar, 1999). En la figura 3 se muestra el esquema del análisis estadístico realizado.

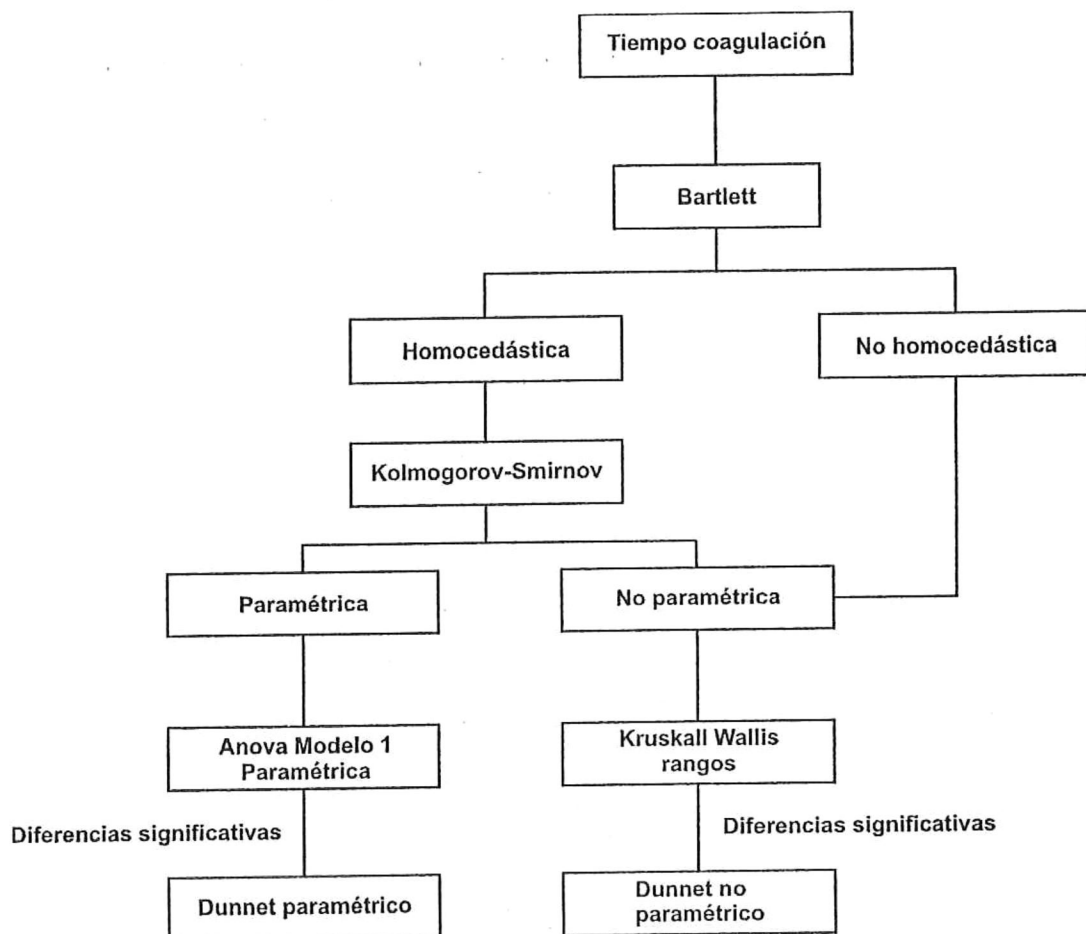


Figura 3. Diagrama de bloques que representa el análisis estadístico aplicado a los resultados de aPTT y PT.

Índices de aPTT y PT

Con el fin de comparar con mayor claridad el efecto producido por los extractos sobre el tiempo de coagulación, se calcularon los índices de aPTT y PT para cada concentración de cada extracto. De acuerdo a lo reportado por

Ronghua et al., 2003, el índice de aPTT se definió como la proporción del aPTT para una concentración dada con respecto al control:

$$\text{Índice aPTT} = \text{aPTT}_c / \text{aPTT}_0 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

c = concentración del extracto.

aPTT_c = tiempo de coagulación para c .

aPTT_0 = tiempo de coagulación al control negativo.

El índice de PT se definió como la proporción del PT para una concentración en particular con respecto al PT al control:

$$\text{Índice PT} = \text{PT}_c / \text{PT}_0 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

c = concentración del extracto.

PT_c = tiempo de coagulación para c .

PT_0 = tiempo de coagulación al control negativo.

Un índice, ya sea de aPTT o PT, con un valor mayor a la unidad, indica un aumento en el tiempo de coagulación y por lo tanto una actividad anticoagulante. Por otra parte, un índice menor a la unidad indica una actividad coagulante, ya que el tiempo de coagulación es acortado.

6. Resultados

6.1 Análisis proximal

La tabla II muestra el análisis proximal que se practicó sobre muestras de alga seca para todas las especies que se usaron en este estudio. Se determinó el porcentaje de humedad, cenizas, proteínas y lípidos para las cinco especies diferentes de algas secas.

Tabla II. Análisis proximal en porcentaje (%) de las muestras de alga seca.

Especie	% Humedad	% Sólidos	% Cenizas	% Proteínas	% Lípidos
<i>C. fragile</i>	7.27 ± 0.36	92.73 ± 0.36	39.42 ± 0.68	8.25 ± 0.60	0.56 ± 0.11
<i>U. nematoidea</i>	13.38 ± 0.61	86.62 ± 0.61	33.54 ± 0.91	12.34 ± 2.04	0.53 ± 0.13
<i>E. menziessi</i>	14.70 ± 0.13	85.30 ± 0.13	28.94 ± 1.13	8.14 ± 0.86	0.14 ± 0.02
<i>S. compressa</i>	17.60 ± 0.23	82.40 ± 0.23	15.92 ± 0.28	7.94 ± 1.57	1.46 ± 0.22
<i>P. perforata</i>	16.97 ± 0.14	83.03 ± 0.14	18.40 ± 0.70	13.92 ± 0.34	0.37 ± 0.42

6.2 Extractos metanólicos y etanólicos

Se obtuvieron en total nueve extractos metanólicos y cinco etanólicos provenientes de las cinco especies de algas colectadas.

6.3 Extractos acuosos

Se obtuvieron un total de cuatro extractos acuosos fríos y cinco calientes de las especies de algas colectadas. En la tabla III se muestra el

peso de la muestra despigmentada y desengrasada a partir de la cual se obtuvieron los extractos acuosos, además se muestra en porcentaje, el rendimiento obtenido a partir 80 g de la muestra sin tratar.

Tabla III. Peso de muestra despigmentada y liofilizada y porcentaje de rendimiento de los extractos acuosos obtenidos a partir de 80 g de cinco especies de algas secas y molidas.

Extracto	Peso muestra despigmentada	Peso muestra liofilizada	% Rendimiento
CF	43.03	1.16	1.45
CC	43.03	2.32	2.90
UC	59.00	4.64	5.81
EF	57.03	1.77	2.21
EC	57.03	1.82	2.27
SF	59.12	2.61	3.27
SC	59.12	3.24	4.05
PF	56.60	1.12	1.40
PC	56.60	6.70	8.37

6.4 Control positivo

Se evaluó el efecto que tiene la heparina sobre el tiempo de coagulación del PPP de conejo. En la tabla IV y figura 4 se muestran los índices de aPTT y PT obtenidos para la heparina comercial Inhepar®. Se encontró un aumento significativo en el tiempo de coagulación en la prueba de aPTT en función de la concentración de heparina, el índice de aPTT varió de 1.12 ± 0.03 a 2.51 ± 0.34 para diferentes concentraciones de heparina comprendidas entre 0.005 y 0.025 IU mL^{-1} de este fármaco. Por otra parte, se

observó una aparente disminución en el índice de PT; sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes con respecto al control .

Tabla IV. Índice de aPTT (n=8) e índice de PT (n=4) para un intervalo de heparina comercial para PPP de conejo. (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina. PPP es plasma pobre de plaquetas.)

Heparina IU mL ⁻¹	Índice aPTT ± Desv. Std	Índice PT ± Desv. Std
0.005	1.12 ± 0.03	1.03 ± 0.05
0.010	1.35 ± 0.04	1.02 ± 0.07
0.015	1.67 ± 0.17	0.91 ± 0.10
0.020	1.95 ± 0.04	0.94 ± 0.05
0.025	2.51 ± 0.34	0.90 ± 0.04

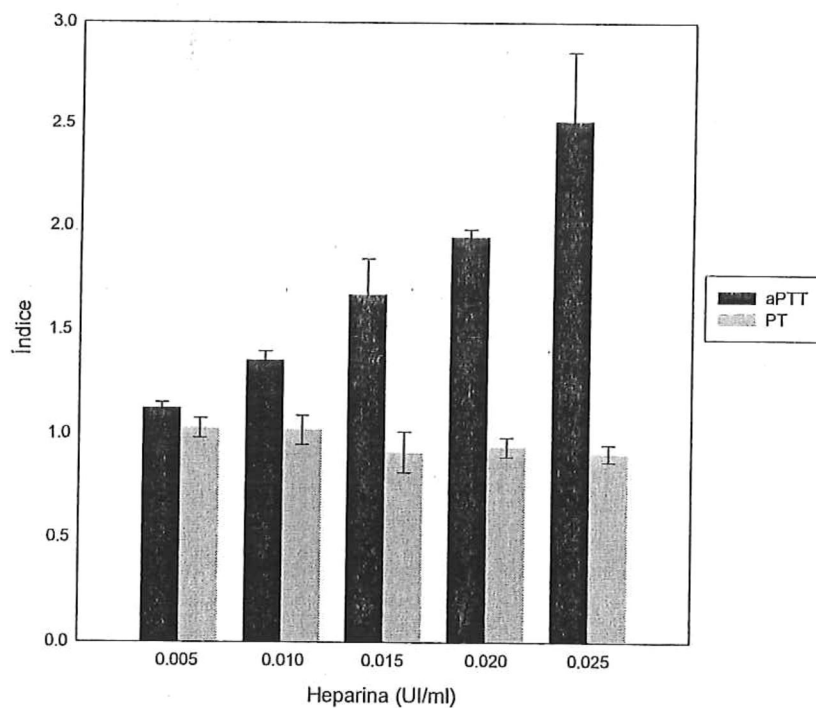


Figura 4. Índice de aPTT (n=8) e índice de PT (n=4) para un intervalo de heparina comercial para PPP de conejo. (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina. PPP es plasma pobre de plaquetas.)

6.5 Pruebas anticoagulantes

Para cada uno de los 23 extractos obtenidos se realizaron las pruebas de aPTT y PT. En la tabla V se muestra el tiempo e índice de aPTT y PT de aquellos extractos metanólicos en los cuales hubo al menos una concentración que resultó ser significativamente diferente con respecto al control de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha = 0.05$). En la figura 5 se muestra el índice de aPTT de los extractos metanólicos para los cuales al menos una concentración resultó ser significativamente diferente. En general, se encontró un incremento significativo en el aPTT con los extractos CM, UM1 y PM2. De estos tres extractos, CM logró el mayor índice de aPTT (1.31 ± 0.03) a una concentración de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PM2 produjeron un índice de aPTT de 1.05 ± 0.03 . Por otra parte, en el extracto SM2 se encontró una disminución significativa en el mismo índice, $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ de SM2 produjeron una disminución en el aPTT en un 10%.

Tabla V. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos metanólicos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4). Los valores marcados con * son significativamente diferentes con respecto al control. NS = no significativo. (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina.)

Extracto	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	aPTT (seg.)	Índice aPTT	PT (seg.)	Índice PT
CM	0	18.98 \pm 0.34	1.00	NS	NS
	50	19.55 \pm 0.44	1.03 \pm 0.02	NS	NS
	100	21.35 \pm 0.10	1.13 \pm 0.02	NS	NS
	150	22.40 \pm 0.79*	1.18 \pm 0.03	NS	NS
	200	22.95 \pm 0.13*	1.21 \pm 0.02	NS	NS
	250	24.90 \pm 0.80*	1.31 \pm 0.03	NS	NS
UM1	0	18.63 \pm 0.49	1.00	9.28 \pm 0.39	1.00
	30	19.10 \pm 0.55	1.03 \pm 0.01	10.95 \pm 0.13*	1.18 \pm 0.06
	60	19.98 \pm 0.78	1.07 \pm 0.04	10.60 \pm 0.71	1.15 \pm 0.12
	90	20.63 \pm 0.71*	1.11 \pm 0.07	10.00 \pm 0.41	1.08 \pm 0.06
	3000	21.08 \pm 1.02*	1.13 \pm 0.07	8.90 \pm 0.14	0.96 \pm 0.05
SM2	0	23.70 \pm 1.27	1.00	13.18 \pm 0.73	1.00
	30	21.47 \pm 0.10*	0.91 \pm 0.05	12.55 \pm 0.65	0.95 \pm 0.05
	60	21.45 \pm 0.72*	0.91 \pm 0.08	11.40 \pm 0.37*	0.87 \pm 0.05
	90	21.30 \pm 0.75*	0.90 \pm 0.07	11.50 \pm 0.33*	0.88 \pm 0.06
PM2	0	18.80 \pm 0.36	1.00	NS	NS
	30	19.58 \pm 0.59	1.04 \pm 0.03	NS	NS
	60	19.68 \pm 0.34*	1.05 \pm 0.02	NS	NS
	90	19.63 \pm 0.55	1.04 \pm 0.01	NS	NS
	180	19.73 \pm 0.25*	1.05 \pm 0.03	NS	NS
PM3	0	NS	NS	11.35 \pm 0.21	1.00
	30	NS	NS	10.33 \pm 0.22	0.91 \pm 0.02
	60	NS	NS	9.68 \pm 0.19*	0.85 \pm 0.02
	90	NS	NS	9.08 \pm 0.10*	0.80 \pm 0.01

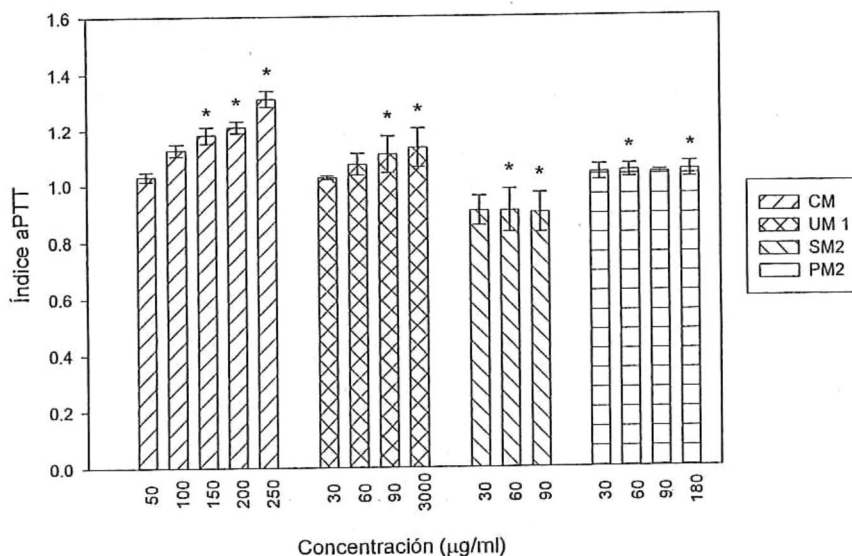


Figura 5. Índice de aPTT para los extractos metanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente al control. Los números en el eje de las x es la concentración a la cual se manejó cada extracto ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son significativamente diferentes al control ($\alpha=0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina.)

En la figura 6 se muestra el índice de PT para los extractos metanólicos UM1, SM2 y PM3, con al menos una concentración significativamente diferente con respecto al control. El extracto UM1 fue el único extracto metanólico en producir un incremento significativo en el PT, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de este extracto produjeron un índice de PT de 1.18 ± 0.06 . Los extractos SM2 y PM3 disminuyeron el PT; 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de SM2 produjeron un índice de PT de 0.87 ± 0.03 , mientras que 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PM3 produjeron uno de 0.80 ± 0.01 .

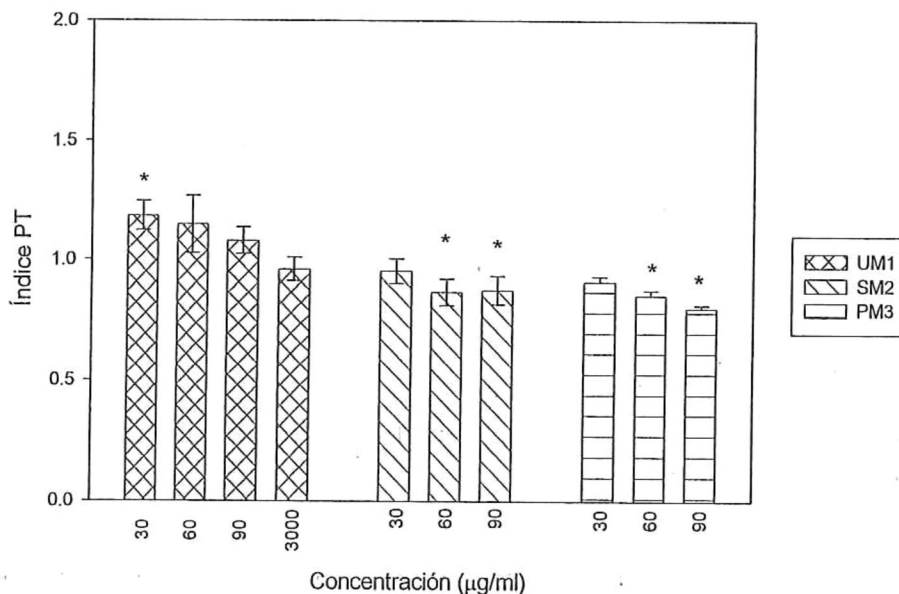


Figura 6. Índice de PT para los extractos metanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control. Los números en el eje horizontal corresponden a la concentración utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son las que resultaron ser significativamente diferentes con respecto al control ($\alpha = 0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina.)

En la tabla VI se muestran los valores de aPTT e índice de aPTT y PT de los extractos etanólicos para los cuales al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control ($\alpha = 0.05$). En la figura 7 se muestra el índice de aPTT de dichos extractos. Los extractos UE, EE y SE provocó un aumento en el índice de aPTT de un 9, 13 y 14 % respectivamente. Por otra parte, $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ el extracto PE produjo un índice de aPTT de 0.89 ± 0.01 , es decir, una disminución en el tiempo de coagulación.

Tabla VI. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos etanólicos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4). Los valores marcados con * son significativamente diferentes con respecto al control. NS = no significativo. (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

Extracto	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	aPTT (seg.)	Índice aPTT	PT (seg.)	Índice PT
UE	0	17.95 ± 0.24	1.00	10.75 ± 0.33	1.00
	30	17.50 ± 0.67	0.97 ± 0.03	8.78 ± 0.68*	0.82 ± 0.09
	60	19.55 ± 0.39*	1.09 ± 0.01	9.03 ± 0.43	0.84 ± 0.06
	90	19.50 ± 0.81*	1.09 ± 0.05	9.28 ± 0.46	0.86 ± 0.07
	906	19.13 ± 0.34	1.07 ± 0.03	8.30 ± 0.22*	0.77 ± 0.04
EE	0	17.48 ± 0.33	1.00	10.18 ± 0.17	1.00
	30	17.30 ± 0.22	0.99 ± 0.03	9.75 ± 0.33	0.96 ± 0.04
	60	17.38 ± 0.78	0.99 ± 0.05	9.13 ± 0.43*	0.90 ± 0.04
	90	19.75 ± 0.34*	1.13 ± 0.02	10.75 ± 0.31	1.06 ± 0.03
	300	17.63 ± 0.19	1.01 ± 0.03	-	-
SE	0	18.05 ± 0.48	1.00	NS	NS
	30	19.45 ± 0.26	1.08 ± 0.03	NS	NS
	60	19.95 ± 0.53	1.11 ± 0.04	NS	NS
	90	20.55 ± 0.44*	1.14 ± 0.03	NS	NS
	600	21.65 ± 0.19*	1.20 ± 0.03	NS	NS
PE	0	18.73 ± 0.21	1.00	10.75 ± 0.33	1.00
	30	17.98 ± 0.30	0.96 ± 0.03	8.60 ± 0.65*	0.80 ± 0.06
	60	18.08 ± 0.10	0.97 ± 0.01	9.70 ± 0.29*	0.90 ± 0.04
	90	16.70 ± 0.14*	0.89 ± 0.01	9.20 ± 0.16*	0.86 ± 0.02
	300	18.08 ± 0.15	0.97 ± 0.01	8.95 ± 0.26	0.83 ± 0.03

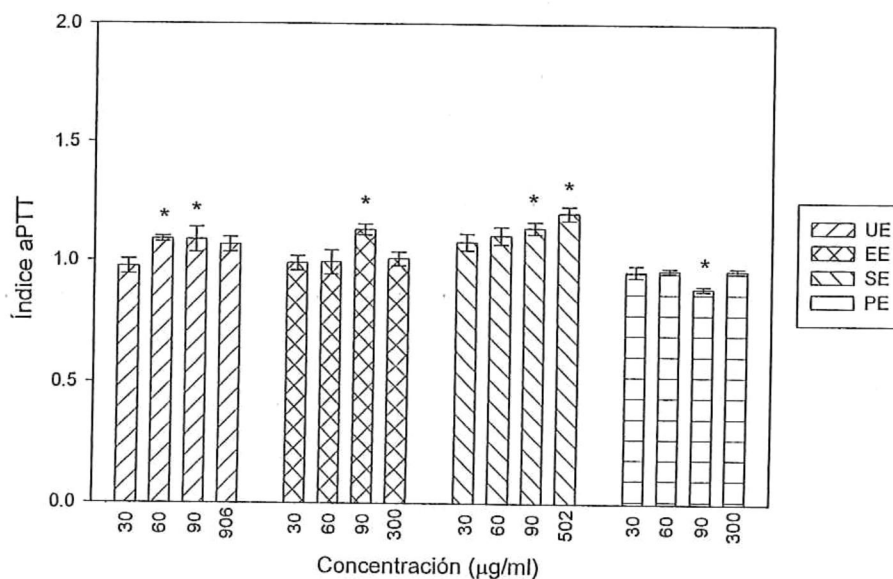


Figura 7. Índice de aPTT para los extractos etanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control. Los números en el eje horizontal corresponden a la concentración utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son las que resultaron ser significativamente diferentes con respecto al control ($\alpha = 0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

En la figura 8 se muestra el índice de PT de los extractos UE, EE y PE. Estos extractos provocaron una disminución significativa con respecto del control del índice de PT. Para los extractos etanólicos, el índice de PT más bajo (0.77 ± 0.04) se observó con $906 \mu\text{g mL}^{-1}$ de UE. El índice de PT más alto (0.90 ± 0.04) se obtuvo tanto EE y PE, ambos a una concentración de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$.

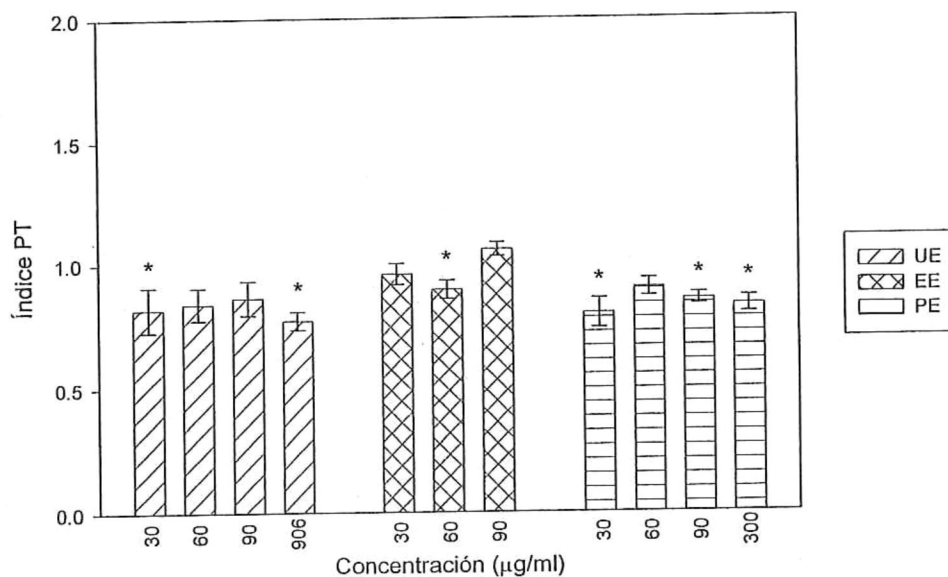


Figura 8. Índice de PT para los extractos etanólicos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control. Los números en el eje horizontal corresponden a la concentración utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son las que resultaron ser significativamente diferentes con respecto al control ($\alpha = 0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

En la tabla VII se muestran los valores de aPTT e índice de aPTT obtenidos para los extractos acuosos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control ($\alpha = 0.05$). Todos los extractos acuosos tuvieron un cambio significativo en el índice de aPTT. En la figura 9 se muestra el índice de aPTT de los extractos acuosos descritos en la tabla VII. Los extractos CF, UC, EF, EC, SC, PF y PC, produjeron un aumento significativo en el índice de aPTT. De estos extractos, PC tuvo el índice de aPTT más bajo (1.07 ± 0.03) con una concentración de $750 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de PF (1.08 ± 0.08) con una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. El extracto con el cual se observó el mayor índice de aPTT fue UC

(1.80 ± 0.04) a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. El extracto CF fue el extracto, con mayor índice de aPTT, 1.40 ± 0.03 , a una menor concentración, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por último, el extracto CC fue el único extracto acuoso que provocó una disminución en el índice de aPTT, 0.95 ± 0.02 con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En la tabla VII se observa también el PT e índice de PT de los extractos acuosos para los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente al control. En la figura 10 se observa el índice de PT estos extractos descritos en la tabla VII. Los extractos CC, EC fueron los únicos extractos acuosos que produjeron un aumento en el índice de PT. CC produjo índice de PT 1.06 ± 0.02 con una concentración de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. El extracto EC produjo un índice de PT de 1.11 ± 0.09 , a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otra parte, los extractos CF, EF, SC, PF y PC produjeron una disminución significativa en el índice de PT. El índice de PT más bajo (0.60 ± 0.05) se obtuvo con $7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CF, este valor de PT, fue el más bajo para todos los extractos, tanto acuosos, etanólicos o metanólicos.

Tabla VII. Valores e índice de aPTT y valores e índice de PT para los extractos acuosos que resultaron significativamente diferentes con respecto al control (n = 4). Los valores marcados con * son significativamente diferentes con respecto al control. NS = no significativo. (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

Extracto	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	aPTT (seg.)	Índice aPTT	PT (seg.)	Índice PT
CF	0	20.65 \pm 0.39	1.00	10.48 \pm 0.21	1.00
	2.5	23.18 \pm 0.64	1.12 \pm 0.05	9.50 \pm 1.07	0.91 \pm 0.10
	5	23.85 \pm 0.93	1.16 \pm 0.05	7.23 \pm 0.32	0.69 \pm 0.03
	7.5	28.13 \pm 0.25*	1.36 \pm 0.11	6.33 \pm 0.40*	0.60 \pm 0.05
	10	28.85 \pm 0.42*	1.40 \pm 0.03	7.15 \pm 0.24*	0.68 \pm 0.03
CC	0	15.50 \pm 0.38	1.00	8.15 \pm 0.06	1.00
	5	14.38 \pm 0.22	0.93 \pm 0.03	8.28 \pm 0.37	1.02 \pm 0.04
	10	14.78 \pm 0.26*	0.95 \pm 0.02	8.63 \pm 0.25	1.06 \pm 0.04
	15	13.90 \pm 0.18	0.90 \pm 0.02	7.73 \pm 0.39	0.95 \pm 0.05
	20	14.43 \pm 0.26	0.93 \pm 0.04	8.68 \pm 0.17*	1.06 \pm 0.02
UC	0	14.75 \pm 0.26	1.00	NS	NS
	250	22.10 \pm 1.51	1.50 \pm 0.09	NS	NS
	500	25.63 \pm 2.74*	1.74 \pm 0.17	NS	NS
	750	25.45 \pm 0.95*	1.73 \pm 0.07	NS	NS
	1000	26.63 \pm 0.96*	1.80 \pm 0.04	NS	NS
EF	0	17.10 \pm 0.43	1.00	10.48 \pm 0.21	1.00
	25	16.75 \pm 0.24	0.98 \pm 0.03	7.50 \pm 0.42*	0.72 \pm 0.05
	50	16.35 \pm 0.33	0.96 \pm 0.02	7.73 \pm 0.29	0.74 \pm 0.02
	75	18.88 \pm 0.39	1.10 \pm 0.04	7.35 \pm 0.24*	0.70 \pm 0.04
	100	20.25 \pm 0.69*	1.18 \pm 0.03	7.35 \pm 0.13*	0.70 \pm 0.02
EC	0	16.63 \pm 0.78	1.00	8.03 \pm 0.17	1.00
	250	18.83 \pm 0.25	1.13 \pm 0.04	8.25 \pm 0.52	1.03 \pm 0.08
	500	19.60 \pm 0.90	1.18 \pm 0.06	8.90 \pm 0.61*	1.11 \pm 0.09
	750	20.60 \pm 0.35*	1.24 \pm 0.08	8.83 \pm 0.10*	1.10 \pm 0.03
	1000	22.83 \pm 0.54*	1.38 \pm 0.07	8.50 \pm 0.24	1.06 \pm 0.03
SC	0	16.08 \pm 1.23	1.00	9.95 \pm 0.24	1.00
	25	15.13 \pm 0.46	0.94 \pm 0.06	10.15 \pm 0.13	1.02 \pm 0.03
	50	15.68 \pm 0.26	0.98 \pm 0.08	8.88 \pm 0.17	0.89 \pm 0.02
	75	17.63 \pm 0.30	1.10 \pm 0.09	8.58 \pm 0.54*	0.86 \pm 0.05
	100	20.70 \pm 0.39*	1.29 \pm 0.09	8.98 \pm 0.30	0.90 \pm 0.03
PF	0	15.95 \pm 0.99	1.00	9.95 \pm 0.24	1.00
	250	16.13 \pm 0.34	1.01 \pm 0.05	9.30 \pm 0.22	0.94 \pm 0.04
	500	16.45 \pm 0.33	1.03 \pm 0.06	9.23 \pm 0.25	0.93 \pm 0.04
	750	16.93 \pm 0.30	1.06 \pm 0.06	9.13 \pm 0.22*	0.92 \pm 0.03

	1000	$17.25 \pm 0.17^*$	1.08 ± 0.07	$9.00 \pm 0.14^*$	0.90 ± 0.02
PC	0	15.35 ± 0.13	1.00	9.95 ± 0.24	1.00
	250	$16.48 \pm 0.26^*$	1.07 ± 0.02	10.15 ± 0.13	1.02 ± 0.03
	500	15.98 ± 0.48	1.04 ± 0.04	8.88 ± 0.17	0.89 ± 0.02
	750	$16.43 \pm 0.33^*$	1.07 ± 0.03	$8.58 \pm 0.54^*$	0.86 ± 0.05
	1000	15.68 ± 0.24	1.02 ± 0.02	8.98 ± 0.30	0.90 ± 0.03

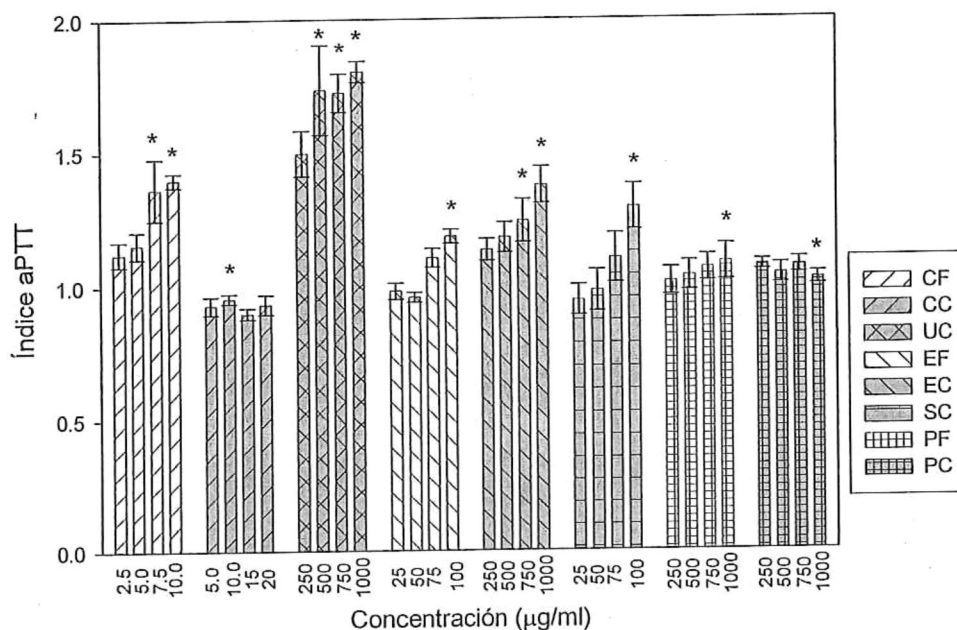


Figura 9. Índice de aPTT para los extractos acuosos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control. Los números en el eje horizontal corresponden a la concentración utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son las que resultaron ser significativamente diferentes con respecto al control ($\alpha = 0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

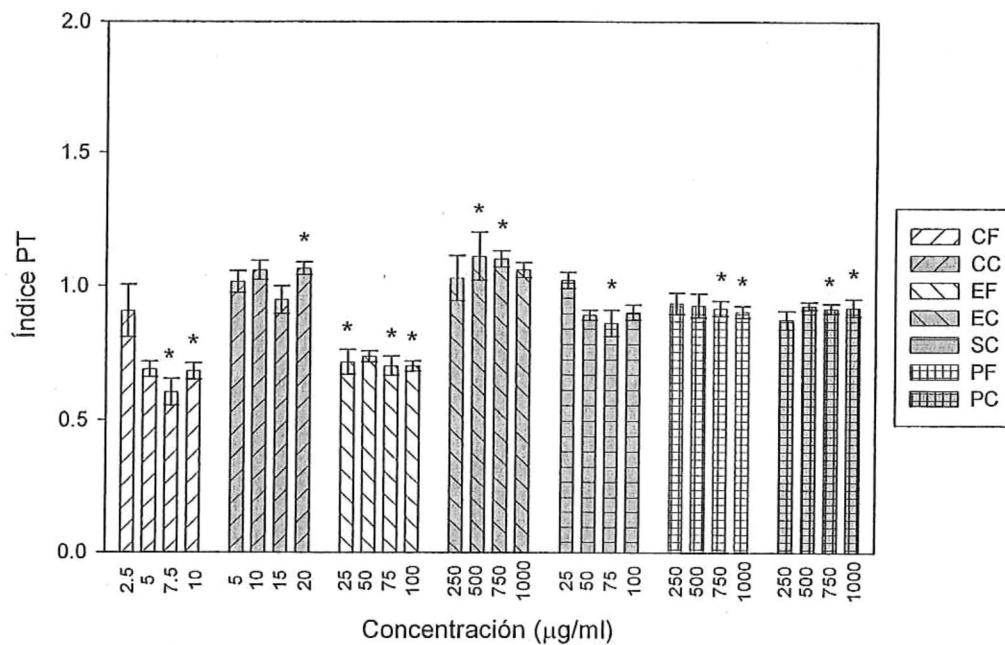


Figura 10. Índice de PT para los extractos acuosos en los que al menos una concentración resultó ser significativamente diferente con respecto al control. Los números en el eje horizontal corresponden a la concentración utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Las concentraciones marcadas con (*) son las que resultaron ser significativamente diferentes con respecto al control ($\alpha = 0.05$). (aPTT es el tiempo parcial de tromboplastina activada. PT es el tiempo de protrombina)

Finalmente, se determinó el contenido de sulfatos presente en los extractos acuosos. En la tabla VIII se muestran dichos resultados para todos los extractos acuosos, independientemente de su actividad anticoagulante. El extracto con menor contenido de sulfatos fue CF ($0.498 \pm 0.36 \text{ mg SO}_4^- \text{ mg muestra}^{-1}$) mientras que extracto con mayor contenido de este ion fue EF ($0.780 \pm 0.27 \text{ mg SO}_4^- \text{ mg muestra}^{-1}$). No se observó una relación entre el contenido de sulfatos y la temperatura de extracción.

Tabla VIII. Contenido de sulfatos por mg de muestra presente en los extractos acuosos obtenidos (n=2). Los extractos marcados con * provocaron un cambio en el índice de aPTT mientras que los marcados con ° causaron un cambio en el PT.

Extracto	mg SO_4^{2-} mg muestra ⁻¹	Desv. Std.
*° CF	0.498	0.036
*° CC	0.617	0.158
*UC	0.717	0.010
*° EF	0.780	0.270
*° EC	0.419	0.001
SF	0.630	0.066
*° SC	0.592	0.120
*° PF	0.608	0.117
*° PC	0.729	0.115

7. Discusión

Los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos mostraron actividad anticoagulante tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. Varios de los extractos obtenidos en este trabajo presentaron actividad anticoagulante y coagulante por diferentes vías. No se encontró ninguna relación entre el contenido de sulfatos y la actividad anticoagulante de los extractos acuosos.

En este estudio se analizó el comportamiento de la coagulación de la sangre de conejo al ser sometida a diferentes concentraciones de heparina, mediante la medición del aPTT y PT. Como se observa en la figura 4, a medida que la concentración de heparina aumentó, el aPTT incrementó de forma significativa, mientras que el PT disminuyó, aunque no significativamente. Estos resultados fueron similares a los reportados por Pancras et al. (2000) quienes encontraron que al administrar por vía intravenosa 100 UI kg^{-1} de heparina a conejos New Zealand, el índice de aPTT fue de aproximadamente 6.5, mientras que el de PT no varió de forma significativa. Además, el hecho de que el PT no fuera afectado por la heparina y el aPTT sí concordó con lo descrito por Fritsma (2002a) donde se reportaron pruebas validadas en humanos. Esto valida al plasma de conejo como modelo animal para el cribado de sustancias anticoagulantes usando como testigo a la heparina.

De acuerdo a lo recomendado por Ravel (1995), para tomar como válido un valor promedio de cualquier pureza de aPTT o PT, la variación para cada tratamiento fue menor al 10 %. Aunque la variación en el control correspondiente a cada extracto cumplió con esta premisa, es importante notar que, para el nivel normal de aPTT, se encontró una mediana de 17.9 segundos, con un percentil de 5° de 14.97 seg. y el percentil de 95° de 21.17 seg. Las variaciones encontradas en el nivel normal de aPTT pueden ser debidas a un cambio en la capacidad de coagulación por parte de los organismos de prueba debido al estrés al que estuvieron sometidos a lo largo del experimento.

Con la finalidad de comparar correctamente la actividad anticoagulante de los extractos, en el presente trabajo se manejan índices de coagulación y no tiempo de coagulación. En la tabla V se observa que el aPTT obtenido al agregar $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CM fue de 22.40 ± 0.79 segundos, mientras que para $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EF el aPTT fue de 20.25 ± 0.69 segundos, como lo muestra la tabla VII. Si únicamente se comparan estos datos, se puede concluir que CM tiene una mayor capacidad de prolongar el tiempo de coagulación. Sin embargo, al calcular el índice de aPTT se obtiene para ambos extractos un índice de 1.18; es decir, que $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CM y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EF tienen la misma capacidad anticoagulante.

El hecho de que un extracto obtenido en el presente trabajo tenga un aPTT o PT significativamente diferente al control indica que existe al menos una sustancia con potencial anticoagulante, y que por lo tanto debe ser fraccionado para su estudio posterior. Siddhanta et al. (1999) encontraron que la actividad anticoagulante del extracto frío de *C. dwarkense* incrementó o disminuyó dependiendo de la fracción purificada. Ninguno de los extractos probados en el presente estudio fue fraccionado y su purificación podría cambiar la capacidad anticoagulante del extracto.

En los extractos UE, EE, CF, EF, SC, PF y PC, figuras 5-10, el índice de PT indica una actividad coagulante (índice PT < 1.0) mientras el aPTT muestra una actividad anticoagulante (índice aPTT > 1.0). Aparentemente, las actividades anticoagulante y coagulante se contraponen y pareciera una incongruencia a primera vista. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que cada extracto probado es una mezcla de sustancias y por otra parte, que la naturaleza de las pruebas empleadas es diferente. Es decir, si bien los compuestos contenidos en cada extracto crudo comparten ciertas características debido al disolvente utilizado o a la temperatura de extracción, estas similitudes no garantizan que la actividad sea la misma. Por lo tanto, es probable que dentro de un mismo extracto sin fraccionar se encuentren sustancias que tengan diferente actividad farmacológica entre sí, no sólo anticoagulante.

Las pruebas de aPTT y PT nos dan un panorama general de cómo son afectadas la vía intrínseca y extrínseca del sistema de coagulación (Fritsma, 2002a). Al usar estas pruebas como herramienta en el cribado de sustancias anticoagulantes, nos permite identificar, no sólo las sustancias activas, sino también la vía de coagulación que afecta. De la misma manera que la heparina actúa sobre la vía intrínseca y la warfarina sobre la extrínseca, los extractos probados pueden actuar sobre una u otra vía, pero no sobre las dos. Es por ello que para la mayoría de los extractos no se observó una prolongación en el tiempo de coagulación tanto en el aPTT y PT.

A pesar de que la búsqueda de sustancias anticoagulantes en macroalgas se ha centrado en polisacáridos sulfatados (Shanmugam y Mody, 2000), en este trabajo se encontró que tanto los extractos orgánicos como los acuosos presentaron una actividad anticoagulante. De esta manera, tres de los diez extractos metanólicos y cuatro de los cinco extractos etanólicos presentaron un incremento en el aPTT. El extracto orgánico con mayor actividad anticoagulante por la vía intrínseca fue CM (tabla V), con un índice de aPTT de 1.31. Este extracto mostró un incremento en el tiempo de coagulación con respecto del control en un 31% a una concentración de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, según lo muestra la tabla VII. El efecto sobre la vía intrínseca de CM es similar al del extracto EC a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y con el de SC 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con un índice de aPTT de 1.38 y 1.29 respectivamente.

En cuanto al efecto de los extractos sobre la vía extrínseca, en CM no se encontraron diferencias significativas en el índice de PT con respecto del control, por lo que se puede suponer que no afectó la vía extrínseca. En las tablas V y VI se observa que para los extractos SM2, PM3, UE, EE y PE el índice de PT fue significativamente menor a la unidad. Por lo que se puede suponer que en dichos extractos hay sustancias que disminuyen de forma significativa la coagulación por la vía extrínseca.

UM1 es el único extracto orgánico capaz de prolongar el tiempo de coagulación tanto por la vía intrínseca como la extrínseca, como se observa en la tabla V. Con un índice de aPTT de 1.13, UM1 se puede comparar con el efecto producido por los extractos acuosos fríos de *E. menziessi* y *P. perforata* y con los extractos orgánicos PM2, UE, EE y SE. En cuanto a su capacidad de coagulación por la vía extrínseca, UM1 es el extracto, con el mayor índice de PT, 1.18 ± 0.6 , seguido por EC con un índice de PT de 1.11 ± 0.09 .

SE fue el extracto etanólico que mostró la mayor prolongación del tiempo de coagulación por la vía intrínseca, con un índice de aPTT de 1.20 a una concentración de $600 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por la vía extrínseca, este extracto de *S. compressa* no produjo cambios significativos con respecto al control. Por otra parte, aunque los extractos UE y EE presentaron un aumento significativo en el tiempo de coagulación con respecto al control, el índice de aPTT para cada

extracto fue de 1.09 y 1.13 respectivamente. Es importante notar que a pesar de que UE y EE tienen actividad anticoagulante por la vía intrínseca, por la vía extrínseca presentan actividad coagulante; lo que nuevamente puede indicar que existen sustancias anticoagulantes y coagulantes en los extractos UE y EE.

La única evidencia que se encontró sobre sustancias anticoagulantes obtenidas con a partir de extractos orgánicos fue un extracto metanólico del liquen *Umbilicaria esculenta* impidió la agregación plaquetaria, incrementando el tiempo de coagulación (Kim y Lee, 2006). En este estudio, los extractos orgánicos CM, UM1, UE, EE y SE prolongaron el aPTT, por lo que se puede suponer que tienen una actividad y mecanismo de acción similar a la encontrada para los extractos acuosos obtenidos en este trabajo. La falta de estudios en extractos orgánicos obtenidos a partir de algas denota la importancia de utilizar en el cribado no sólo sustancias con estructura similar a la de fármacos conocidos, en este caso la heparina, sino también sustancias con diferente estructura pero con el mismo potencial farmacológico.

Los resultados en cuanto al rendimiento de polisacáridos obtenido para las cinco especies de algas estudiadas varió de 1.40% para PF hasta un 8.37% para PC. En general, para una misma alga, los polisacáridos obtenidos a 85° C, tuvieron un rendimiento mayor que los extraídos a 4° C. Se

sabe que existe una relación entre el tamaño de las moléculas y la temperatura de extracción; Percival y McDowell, (1967) en Shanmugam y Mody, (2000) reportaron que a menor temperatura se extraen moléculas de bajo peso molecular mientras que a altas temperaturas, se extraen moléculas de mayor peso molecular. Sin embargo, en este trabajo, la diferencia en rendimiento entre la extracción con agua fría y caliente no es la misma para todas las especies. Entre EF y EC existe una diferencia en rendimiento de 0.06% mientras que para los polisacáridos obtenidos a partir de *P. perforata* la diferencia es de 6.97%. Asimismo, Siddhanta et al (1999) obtuvieron un rendimiento de 4.4% para el extracto frío de *C. dwarkense* y de 4.6 para el extracto caliente de la misma alga. Por lo que se asume que la diferencia en el rendimiento de los extractos acuosos obtenidos en el presente trabajo puede ser debida a cambios de temperatura, para una misma especie, puede ser el reflejo de la presencia en diferentes proporciones, de polisacáridos con diferente peso molecular.

Los extractos CF, CC UC, EF, EC, PF y PC prueban que es posible encontrar actividad anticoagulante en polisacáridos obtenidos a bajas y altas temperaturas; sin embargo, posiblemente el mecanismo de acción mediante el cual actúan las sustancias extraídas en agua fría es diferente al de las sustancias obtenidas en agua caliente debido a que su peso molecular puede ser diferente según lo reportado por Percival y McDowell, (1967) en Shanmugam y Mody, (2000). La heparina tiene diferentes mecanismos de

acción sobre el sistema de coagulación dependiendo de su estructura y tamaño. Las moléculas de heparina de más de 18 sacáridos se unen de manera simultánea a la trombina y a la antitrombina (AT) impidiendo de esta manera la coagulación (Hirsh et al., 2001). Nishino et al. (1989) encontraron que los extractos calientes de *E. kurome* presentaron actividad sobre la antitrombina pero no inhibían el factor Xa. Algo similar podría estar sucediendo con UC, EC, SC y PC, que al ser extraídos con agua caliente tienen un mayor tamaño que posiblemente les permite unirse al mismo tiempo a la trombina y a la AT y prologar de esa manera el tiempo de coagulación.

Es probable que los extractos CF, EF y PF tengan un menor tamaño al haber sido extraídos a una baja temperatura (Percival y McDowell, 1967 en Shanmugam y Mody, 2000) Como resultado de este bajo peso molecular el mecanismo de acción podría ser vía la inhibición del factor Xa, Hirsh et al. (2001) reportaron que las moléculas de heparina de menos de 17 sacáridos catalizan la inhibición del factor Xa mediante la modificación del sitio de acción de la AT. Melo et al (2004) encontraron que los galactanos sulfatados con un tamaño molecular menor a 15 kDa inhibían al factor Xa.

La actividad anticoagulante de los extractos frío y caliente de *C. fragile* concuerda con lo reportado por Siddhanta et al. (1999) para *C. dwarkense*. En la figura 9 se observa que CF presentó una mayor actividad anticoagulante que CC; de la misma manera, Siddhanta et al. (1999) reportaron una mayor

actividad anticoagulante para el extracto frío (CWE) que para el caliente (HWE) de *C. dwarkense*. El extracto CWE mostró actividad anticoagulante tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. Sin embargo, para CF la prueba de aPTT indicó actividad anticoagulante de 1.4, mientras que el índice de PT fue de 0.6 a una concentración de $7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se han reportado polisacáridos obtenidos a partir de *Codium* que presentan una actividad anticoagulante principalmente por la vía intrínseca, lo que concuerda con la actividad encontrada en CF y CC. Matsubara et al. (2000) reportaron que una fracción purificada a partir del extracto acuoso a temperatura ambiente de *C. pugniformis* produjo un aumento en el aPTT y TT pero el PT no presentó diferencias significativas con respecto al control. Siddhanta et al (1999) reportaron que una fracción purificada de *C. dwarkense* en agua fría tiene un índice de aPTT mayor a 10 para concentraciones mayores de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y sobre la vía extrínseca, el índice mayor a 10 es producido por concentraciones mayores a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. La diferencia en la concentración necesaria para obtener un índice de coagulación igual a 10 mediante las dos pruebas es debida a la sensibilidad de la prueba. Por lo tanto, se puede suponer, que si se purifica CF sea necesaria una mayor concentración de la fracción purificada para que produzca un efecto anticoagulante por la vía extrínseca.

El índice de aPTT obtenido a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CF fue de 1.40 ± 0.03 (figura 9), esta actividad fue una de las más altas, este hecho por si sólo ya es suficiente para continuar los estudios de este extracto. Sin embargo, otra de las ventajas que tiene CF, sobre el resto de los extractos, ya sean metanólicos, etanólicos o acuosos, es que es la concentración más baja probada y con una mayor actividad, como se muestra en las figuras 5, 7 y 9. EC tiene la misma actividad anticoagulante pero a una concentración 100 veces mayor que CF.

El caso de CC fue diferente al de CF, ya que presentó un índice de aPTT de 0.95 y de 1.06 para el caso de PT, como se muestra en la tabla VII. Es decir, CF tuvo actividad coagulante por la vía intrínseca mientras que por la vía extrínseca tuvo un efecto contrario. Los resultados encontrados para la prueba de PT concordaron con lo reportado por Siddhanta et al. (1999), y se espera que al aumentar la concentración del extracto, el índice aumente. Sin embargo, el índice de aPTT, que se esperaba fuera mayor que el de PT, fue menor a la unidad. Esto podría confirmar lo establecido previamente de que en los extractos existen diferentes sustancias con mecanismos de acción diferentes que provocan tanto una actividad anticoagulante como actividad coagulante.

El extracto que tuvo la mayor actividad anticoagulante fue UC que incrementó el índice de aPTT en un 80%, sin modificar significativamente el

PT. La actividad anticoagulante por la vía intrínseca se puede comparar con una fracción purificada obtenida a partir *U. conglobata* con agua a 100 °C, este polisacárido sulfatado produjo un índice de aPTT de aproximadamente 6 (Mao et al., 2006) Aunque el mecanismo de acción probablemente sea similar, ya que ambos extractos afectaron la vía intrínseca de coagulación, el índice de aPTT fue aproximadamente tres veces menor para UC con respecto al polisacárido de *U. conglobata* obtenido por Mao et al. (2006). Sin embargo, a pesar de no haber obtenido un índice de aPTT mayor a 2, es importante notar que la dosis terapéutica de heparina se ajusta en pacientes con tromboembolismo para lograr un aPTT de entre 1.5 y 2.5 (Hirsh et al. 2001). El extracto sin fraccionar UC produjo un índice de aPTT de 1.8, que se encuentra dentro del índice terapéutico de la heparina, por lo que podría ser un excelente candidato a ser purificado para buscar sustancias anticoagulantes.

El extracto EC incrementó el tiempo de coagulación tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca (figuras 9 y 10). Sin embargo, el porcentaje de actividad no fue el mismo, 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EC produjeron un aumento de un 24% en el aPTT, mientras que la misma concentración produjo un aumento de 10% en el PT. Siddhanta et al (1999) reportaron que fue necesaria una mayor concentración de una fracción purificada de *C. dwarkense* para producir un efecto anticoagulante por la vía extrínseca que por la intrínseca. Lo mismo fue reportado por Ronghua et al. (2003) para

diferentes tipos de sulfato de hidroxietil quitosán carboxibutirilado. Por lo tanto, si la misma fracción de EC produjo el efecto anticoagulante por las dos vías, es posible que una mayor concentración de esta fracción produzca un mayor índice de PT.

En cuanto a los extractos acuosos de *S. compressa*, únicamente SC presentó un aumento significativo en el índice de aPTT, con respecto al control. En la tabla VII se observa que para este extracto se obtuvo un índice de aPTT de 1.29 a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que a concentraciones menores la diferencia en el aPTT con respecto al control no resultó ser significativamente diferente. En la figura 9 se observa que el índice de aPTT obtenido con SC fue similar al obtenido con EC a una concentración 10 veces mayor. Esto puede implicar que a una mayor concentración de EC, la actividad anticoagulante incrementa.

Los dos extractos acuosos de *P. perforata* tuvieron un efecto similar sobre las dos vías del sistema de coagulación. En las figuras 9 y 10 se observa que los PF y PC incrementaron el tiempo de coagulación por la vía intrínseca en un 10 %. En cuanto a la vía extrínseca, ambos extractos redujeron el tiempo de coagulación entre un 10 y 20 %. Además, tanto para aPTT como para PT, los índices de actividad no varían mucho entre las diferentes concentraciones. *P. perforata* es la única alga para la cuál no se encontraron diferencias entre los polisacáridos obtenidos con agua fría y los

extraídos con agua caliente. Sin embargo, debido a la diferencia en temperatura utilizada para extraer PF y PC, es posible que los polisacáridos contenidos en los dos extractos sean diferentes.

En cuanto al contenido de sulfatos, no se encontró una relación directa entre su concentración y la actividad. En la tabla VIII se observa que el contenido de sulfatos en UC y PC fueron de las más altas. Sin embargo, en la figura 9 se observa que PC presentó un índice de aPTT de 1.10, que aunque resultó significativo no se compara con la actividad de 1.8 encontrada para UC. La diferencia en la actividad anticoagulante en este caso puede ser debida al patrón de sulfatación. Alban y Franz (2001) reportaron diferencias en la actividad anticoagulante dependiendo de la posición de grupos sulfatos. En el caso de la heparina, existen cuatro grupos sulfato presentes en la D-glucosamina que son fundamentales para que este compuesto tenga una actividad anticoagulante y la remoción de cualquiera de estos grupos disminuye significativamente la actividad anticoagulante (Majerus y Tollefsen, 2003).

En las tablas VII y VIII se observa que el índice de aPTT fue mayor para CF que para PC mientras que el contenido de sulfatos fue mayor en PC en comparación con CF. Nuevamente, no se encontró una relación directa entre el contenido de sulfatos y la actividad anticoagulante, por lo que debe existir otra variable, como la estructura de la molécula, que influye sobre la

actividad anticoagulante. Pereira et al. (1999) encontraron que los fucanos de *Acophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* tenían una estructura lineal y potencia anticoagulante similar, mientras que los polisacáridos de *Laminaria brasiliensis* tenían un contenido menor de sulfatos que los fucanos anteriores, pero su estructura presentó ramificaciones altamente sulfatadas de fucosa y una mayor actividad anticoagulante.

Los extractos EC y CF presentaron un contenido similar de sulfatos, como se muestra en la tabla VII. Sin embargo, en la figura 9 se observa que la concentración requerida de CF fue 100 veces mayor que la necesaria de EC para lograr la misma actividad anticoagulante por la vía intrínseca. Esta diferencia en la concentración necesaria de extractos parece indicar que existen variables, más allá del contenido de sulfatos que determinan la actividad anticoagulante de un compuesto. Una de estas variables podría ser la posición de los grupos sulfatos en las moléculas como lo reportaron Alban y Franz (2001), encontraron que además del grado de sulfatación y peso molecular de las moléculas, la distribución de los grupos sulfatos en los átomos de carbono en las unidades de glucosa influye sobre la actividad y el mecanismo de acción.

En este estudio se encontraron extractos con actividad anticoagulante, aunque UC y CF mostraron el mayor potencial, no se deben dejar de lado los otros extractos que presentaron diferencias significativas con respecto al

control. Este estudio es una primera aproximación para la búsqueda de sustancias anticoagulantes. Es necesario fraccionar los extractos, para poder evaluar su verdadera actividad anticoagulante, y estudiar su composición química, contenido de sulfatos, azúcares, ácido urónico y peso molecular. Adicionalmente, existen otros estudios, como el TT o Hepetest, que pueden ser usados para determinar con mayor claridad el mecanismo de acción. Finalmente, además de analizar las variables químicas se deben estudiar las variables ecológicas, si las variaciones estacionales de las algas pueden incrementar el rendimiento de los extractos y más importante aún si pueden incrementar la actividad anticoagulante.

8. Conclusiones

- Se encontró actividad anticoagulante mediante la vía intrínseca y extrínseca en extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de las cinco algas estudiadas.
- El extracto con mayor actividad anticoagulante fue el extracto caliente de *U. nematoidea* (UC) con un índice de aPTT de 1.8 a una concentración de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- El extracto caliente de *E. menziessi* (EC) presentó la mayor actividad anticoagulante por la vía intrínseca, con un índice de aPTT de 1.4, a la menor concentración probada, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Los extractos etanólicos de *U. nematoidea* (UE) y *E. menziessi* (EE), acuosos fríos de *C. fragile* (CF), *E. menziessi* (EF) y *P. perforata* (PF) y acuosos calientes de *S. compressa* (SC) y *P. perforata* (PC) tienen una actividad coagulante por la vía extrínseca y anticoagulante por la intrínseca.
- No se encontró una relación entre el contenido de sulfatos y la actividad anticoagulante.

9. Anexo 1

Codium fragile (Suringar) Hariot, es un alga de talo erecto, color verde oscuro, de 10-30 cm de largo con una o varias ramas erectas a partir del disco basal, tiene ramificación dicotómica cilíndrica de 3-8 mm de diámetro. Es un alga que se encuentra de forma frecuente a común en intermareal rocoso y en ocasiones en el submareal (Abbot y Hollenberg, 1976). Su distribución va desde las costas de Alaska al Pacífico de Baja California (Pedroche et al., 2005).

Ulva nematoidea Bory de Saint-Vincent, 1980, (sinónimo *Ulva costata*), es un alga verde de hasta 32 cm de largo, con una o dos ramificaciones basales. Las hojas de esta alga son de 2 cm de ancho con márgenes rizados y en ocasiones torcidas en espiral. *U. nematoidea* se encuentra en rocas o asociada a algas coralinas, en el bajo intermareal al submareal (Abbot y Hollenberg, 1976). Su distribución es desde California del Sur (Santa Bárbara) a Chile (Pedroche et al., 2005).

Egregia menziessi (Turn) Aresch es un alga parda perteneciente al orden de las laminariales. Esta alga consiste en un talo maduro con varias ramificaciones aplanadas cubiertas de forma dística de láminas delgadas y anchas. El talo de *E. menziessi* mide entre 5 y 15 metros de largo, su color va de café oscuro a verde olivo. Su estipe es plana y mide entre 1 y 3.5 cm de

ancho, mientras que las láminas miden hasta 8 cm de longitud. La superficie de estas últimas pueden tener tubérculos principalmente cerca de la base. Esta alga tiene pneumatocistos de forma elipsoidal a subesférica con o sin papilas. Aunque es fértil durante todo el año, es más abundante entre Abril y Noviembre. Es un alga común en áreas protegidas a moderadamente expuestas, se encuentra entre el inframareal y el submareal, asociada con *Macrocystis*. Su distribución va desde Alaska hasta Punta Eugenio, Baja California (Abbot y Hollenberg, 1976).

Silvetia compressa subs. compressa (J. Agardh) Serrão, Cho, Boo et Brawley, tiene un talo erecto, ramificado, perene con una altura de hasta 85 cm, su color va de café amarillento hasta olivo oscuro. Esta alga parda posee una estructura de fijación cónica y elástica, con varios ejes subcilíndricos partiendo de la base. Su ramificación es subdicotómica a todo lo largo de la planta con dicotimías, ligeramente más cortas hacia la parte terminal de la planta. Posee receptáculos terminales largos, simples o bifurcados de 3 a 6 mm de ancho y 1.5 a 11 cm de largo (Aguilar-Rosas et al., 2002). Se encuentra distribuida en el intermareal superior de la costa del Pacífico desde el Condado de Humboldt, California hasta Punta Baja, Baja California (Silva et al., 2000).

Porphyra perforata J. Agardh es un alga roja perteneciente al orden de las bangiales de entre 15 a 30 cm de alto. Su color va de un verde grisáceo a

púrpura café. Tiene un disco pequeño de fijación, esta alga tiene una proporción similar entre largo y ancho, con márgenes rizados y a menudo lobulados o divididos. Se encuentra de forma común a abundante en el intermareal superior, usualmente sobre las rocas. Su intervalo de distribución abarca desde Alaska hasta Baja California (Abbot y Hollenberg, 1976).

10. Referencias

- Abbot, I.A. y G.J. Hollenberg. 1976. Marine Algae of California. Stanford University Press. USA. 827 pp.
- Aguilar-Rosas, R., L.E. Aguilar-Rosas, C. Mendoza González, L.E. Mateo-Cid, F. Nuñez-Cebrero. 2000. Informe Final del Proyecto: S039 Macroalgas Marinas de la costa noroccidental de Baja California, México (Área marina prioritaria amenazada A1: Ensenadense). Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO).
- Aguilar-Rosas, R., L.E. Aguilar-Rosas, L.E. Mateo-Cid, A.C. Mendoza-González y H. Krauss-Cosío. 2002. *Hesperophycus* y *Silvetia* representantes de la familia Fucaceae (Fucales, Phaeophyta) en la costa del Pacífico de México. *Hidrobiológica* 12(2): 147-156.
- Alban, S y G. Franz. 2001. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. *Biomacromolecules*. 2: 354-361.
- Alban, S. 2005. The 'precautionary principle' as a guide for future drug development. *European Journal of Clinical Investigation*. 35(Suppl. 1): 33-44.
- Amano, H., M. Kakinuma, D. A. Coury, H. Ohno y T. Hara. 2005. Effect of a seaweed mixture on serum lipid level and platelet aggregation in rats. *Fisheries Science*. 71: 1160-1166.
- American Heart Association. 2007. Heart Facts: Latino/Hispanic Americans.

- Athukorala, Y., W.K. Jung, T. Vasanthan y Y.J. Jeon. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydrate Polymers. 66(2): 184-191.
- Basson, M. 2008. Cardiovascular Disease. Nature. Vol 451(7181):903.
- Cedro A, Porta R, Cattaneo F, Trento F, Ferro L, Lanzarotti L. Fucans with low molecular weight having anticoagulant, antithrombinic and antithrombotic activity. United States Patent No. 5,948,405 of September 1999.
- Colliec, S., A.M. Fischer, J. Tapon-Bretadiere, C. Boisson, P. Durand y J. Jozefonvicz. 1991. Anticoagulant properties of a fucoïdan fraction. Thrombosis Research. 64: 143-154.
- Contreras-Carreto, N.L. y L.P.A Robles-Landa. 2004. Trombocitopenia inducida por heparina. Médica Sur. 11(2): 99-108.
- Cunniff, P. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International Volume II. AOAC International. USA.
- De Lara-Isassi, G., S. Álvarez-Hernández y A. Quintana-Pimentel. 2004. Screening for anticoagulant substances in some marine macroalgae. Hibrobiología 14(1): 47-54.
- Dodgson, K.S y R.G. Price. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochemical Journal. 84: 106-110.
- Esmon, C. T., 2005. Regulatory mechanisms in hemostasis: natural anticoagulants. En. Hematology: basic principles and practice. 4ta ed.

- R. Hoffman, E.J. Benz, S.J. Shattil, B. Furie, H.J. Cohen, L. E. Silberstein y P. McGlave (Eds.) Elsevier. USA.
- Fareed, J., D. A. Hoppensteadt y R.L. Bick. 2000. An update on heparins at the beginning of the new millennium. *Semin Thromb Hemost.* 26 (supl. 1): 88-88.
- Fedan, J. S. 1984. Drogas anticoagulantes, antiplaquetarias y fibrinolíticas (trombolíticas) en *Farmacología Médica*. Craig y Stitzel (Eds). Interamericana. México.
- Fritsma, G. 2002a. Normal Hemostasis and coagulation. En *Hematology: clinical principles and applications*. 2da ed. A. Allen (ed).W.B. Saunders Company. USA.
- Fritsma, G. 2002b. Thrombosis Risk Testing. En *Hematology: clinical principles and applications*. 2da ed. A. Allen (ed).W.B. Saunders Company. USA.
- Hirsh, J., T.E. Warkentin, S.G. Shaughnessy, S.S. Anand, J.L. Halperin, R. Raschke, C. Granger, E. M. Ohman y J.E. Dalen. 2001. Heparin and low-molecular-weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*: 64S-94S.
- Ho, C.H. y S.Y. Wu. 1991. The influence of time, temperatura and packed celon activated partial thromboplastin time and prothrombin time. *Thrombosis Research*. 62: 625-633.
- Kim, M. S. y K. A Lee. 2006 Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*. 105: 342-345.

- Luppi, E., M. Cesaretti y M. Volpi. 2005. Purification and characterization of heparin from the Italian clam *Callista chione*. *Biomacromolecules*. 6: 1672-1678.
- Mackman, N. 2008. Triggers, targets and treatments for thrombosis, *Nature* Vol 451(7181):914-918.
- Majerus, P. W. y D. M. Tollefsen. 2003. Anticoagulantes, trombolíticos y antiplaquetarios. En Goodman y Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ma ed. J. G. Hardman, L. E. Limbird y A. G. Gilman. (Eds.). McGraw-Hill.
- Mao, W., X. Zang, Y. Li y H. Zhang. 2006. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology* 18: 9-4.
- Matsubara, K., Y. Matsubara, K. Hori y K. Miyazawa. 2000. An anticoagulant proteoglycan from marine green alga, *Codium pugniformis*. *Journal of Applied Phycology*. 12: 9-14.
- Melo, F.R., M.S. Pereira, D. Foguel y P.A.S. Mourão. 2004. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(20): 20824-20835.
- Nishino, T y T. Naguno. 1991. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Research*, 214: 193-197.

- Nishino, T y T. Naguno. 1992. Anticoagulant and antithrombin activities of ovesulfated fucans. *Carbohydrate Research*, 229: 355-362.
- Nishino, T., G. Yokoyama, K. Dobashi, M. Fujihara y T. Nagumo. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydrate Research*, 186: 119-129.
- Nishino, T., H. Kiyohara, H. Yamada y T. Nagumo. 1991a. An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry*. 30(2): 535-539.
- Nishino, T., Y. Aizu y T. Nagumo. 1991b. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thrombosis research*. 62: 765-773.
- Nishino, T., Y. Aizu y T. Nagumo. 1991c. The influence of sulfate content and molecular wieght of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis research*. 64: 723-731.
- NRC. Committee on Marine Biotechnology: Biomedical Applications of Marine Natural Products, National Research Council. 2002. *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*. National Academy Press. USA. 132 pp.
- Núñez-Quintana, A., N. Carmenaty-Campo, P. R. Matos-García, O. D. Rodríguez-Arias y J. A. De Dios-Lorente. 2001. Trombocitopenia inducida por heparina. *Medisan* 5 (2): 38-45.

- Pancras, C.W., E.J. Crain, R.M.Knabb, R.P. Meade, M.L. Quan, C. A. Watson, R. R. Wexler, M.R. Wright y A.M. Slee. 2000. Nonpeptide Factor Xa inhibitors II. Antithrombotic evaluation in a rabbit model of electrically induced carotid artery thrombosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 295(1): 212-218.
- Pedroche, F.F. y A. Senties G. 2003. Ficología marina mexicana. *Diversidad y Problemática actual. Hidrobiológica*. 13(1): 23-32.
- Pedroche, F.F., P.C. Silva, L.E. Aguilar Rosas, K.M. Dreckmann y R. Aguilar Rosas. 2005. Catálogo de las algas marinas bentónicas del Pacífico de México. I. Chlorophycota. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, University of California, Universidad Autónoma de Baja California. 136 pp.
- Pereira, M., B. Mulloy y P.A.S. Mourão. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(12):7656-7667.
- Purves, W. H., G. H. Orians, H. C. Heller y D. Sadava. 1998. *Life the science of biology*. 5ta edición. Sinauer Associates, Inc. USA.
- Ravel, R. 1995. *Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data*. 6ta edición. Mosby. USA. 736 pp.

- Ronghua, H., D. Yumin y Y. Jiahong. 2003. Preparation and anticoagulant activity of carboxybutyrylated hydroxyethyl chitosan sulfates. *Carbohydrate Polymers*. 51:431-438.
- Shanmugam, M. y K. H. Mody. 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*. Vol. 79 (12): 1672-1683.
- Shanmugam, M., K.H. Mody, R.M. Oza y B.K. Ramavat. 2001. Blood anticoagulant activity of a green marine alga *Codium dwarkense* (Codiceae, Chlorophyta) in relation to its growth stages. *Indian Journal of Marine Sciences*. 30: 49-52.
- Siddhanta, A. K., M. Shanmugam, K.H. Mody, A.M. Goswami y B.K. Ramavat. 1999. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. From the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 25: 151-154.
- Silva, P.C., F.F. Pedroche, M.E. Chacana, L.E. Aguilar-Rosas y R. Aguilar-Rosas. 2000. Geographical correlation of morphological variation in *Silvetia compressa* (Fucaceae, Fucales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*. 36(3S): 63.
- Spencer, B. 1960. The ultramicro determination of inorganic sulphate. *Biochemical Journal*. 75: 435-440.
- Trento, F., F. Cattaneo, R. Pescador, R. Porta y L. Ferro. 2001. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. *Thrombosis Research*. 102:457-465.

- Weitz, J. I. y S. M. Bates. 2005. New anticoagulants. *J. Thromb. Haemost.* 3: 1843-53.
- WHO. 2004. Death and DALY estimates by cause, 2002 (<http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls>)
- Yamada, M., T. Horiuchi, T. Oribe, S. Yamamoto, I. Sugie y P.A. Gentry. 1997. Bovine erythrocyte haemolysates enhance plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Veterinary Research Communications.* 21: 75-84.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. 4ta edición. New Jersey. 633 pp.