

**Universidad Autónoma de Baja California**

**Facultad de Ciencias Marinas**

**Instituto de Investigaciones Oceanológicas**

**Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología**

**Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina**



Evaluación de la actividad cardiotónica de extractos de *Undaria pinnatifida*.

TESIS

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**NALLELY CONCEPCIÓN JUÁREZ SÁNCHEZ**

Ensenada, Baja California, México. Enero del 2017.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“Evaluación de la actividad cardiotónica de extractos de *Undaria  
pinnatifida*”.**

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

**NALLELY CONCEPCIÓN JUÁREZ SÁNCHEZ**

Aprobada por:



---

Dra. Graciela Guerra Rivas

Directora de tesis



---

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal



---

Dr. José Luis Stephano Hornedo

Sinodal

*NO TE RINDAS - MARIO BENEDETTI*

*No te rindas, aun estas a tiempo  
de alcanzar y comenzar de nuevo,  
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,  
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,  
aunque el frío queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se esconda y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños,  
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,  
porque lo has querido y porque yo te quiero.....*

## DEDICATORIAS

*A mi mamá, mi fan #1, mi mejor amiga, gracias por creer en mí siempre, por tus consejos, por tus abrazos, por todo tu amor, gracias por ser un gran ser humano y por siempre impulsarme a seguir, simplemente gracias por existir. Este esfuerzo también es tuyo, eres el motor de mi vida, ¡te quiero mucho mamá!*

*A mi papá quien me educo para ser la mujer que soy hoy, este esfuerzo también es tuyo papí, gracias por creer en mí, por apoyarme en todo momento y alentarme a seguir cuando más lo necesitaba, ¡te quiero pa!*

*Simplemente a ustedes dos les debo todo lo que soy, los amo demasiado.*

*A mi bebé (Edgar), gracias mi amor por ir de mi mano todo este tiempo, por ayudarme y escucharme cuando me sentía frustrada o preocupada, por sacarme una sonrisa siempre, por brindarme tu apoyo, por todos los consejos científicos y personales, por ser mi amigo y una gran persona, gracias por ser mi equipo ¡Te amo!*

*A mis sobrinos Abraham, Daniela, Diego, Valentina y Renata, 5 personitas que me impulsan a ser mejor persona, y serviles de ejemplo, demostrándoles que todo lo que ellos se proponga con dedicación y esfuerzo siempre sucederá. Ustedes siempre contarán conmigo. ¡Los amo!*

## AGRADECIMIENTOS

A la UABC por haberme aceptado y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi posgrado, en especial a la facultad de ciencias, por permitirme llevar acabo esta investigación en sus instalaciones.

Al CONACyT por brindarme la beca, que me hizo posible tener acceso a un posgrado.

Especial a la Doctora Graciela Guerra Rivas, quien me tendió la mano desde que llegue a esta ciudad y creyó en mí en todo momento, a pesar de todo. Por no simplemente ser mi directora de tesis, si no también ser mi psicóloga y consejera, preocuparse por mí y apoyarme en todo momento, gracias, por compartir parte de su conocimiento conmigo y hacerme mejor científica, tenerme paciencia y guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, por todas las lecciones aprendidas y las que vienen por aprender, pero sobre todo ¡Gracias! por ayudarme a crecer como ser humano. Le estaré eternamente agradecida al universo por haberla puesto en mi vida. ¡Gracias por todo!

A la Doctora Claudia Gómez Gutiérrez, por ayudarme en todo momento, estar al pendiente de mí y apoyarme, contribuyendo al éxito de esta investigación.

Al Doctor José Luis Sthepano Hornedo, por sus consejos, comentarios y el tiempo dedicado a atenderme para la revisión de este trabajo.

A mi hermana Gaby, por creer en mí, apoyarme y quererme tanto. ¡Muchas gracias hermana! Yo también te quiero demasiado.

A Eduardo (chinos), por ayudarme cada que se lo pedí, por ser un gran apoyo y mi amigo, gracias por esas platicas infinitas.

A mis amigas del posgrado Carmen Elena Martín Hernández (Carmen gracias, por ser mi compañera de estudios y escuchar mis frustraciones jajaja), Sue Yamilette Duran Gracia, Itzel Montesinos Laffont y Patricia Gayo de Linos, por ser mi escape de las preocupaciones, por nuestras platicas donde las risas nunca faltaron, por las noches de baile, desvelo y diversión, las quiero chicas.

A los chicos del laboratorio en donde conocí nuevos amigos, gracias Elva, Marylena, David, Carlitos, Gastón y Sole.

A mi amigo Elihu Vázquez Ortiz por brindarme su confianza y amistad, por creer en mí, por todas las risas y por todas las veces que me ayudaste en algo. ¡Te quiero mucho!

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

## RESUMEN

Las cardiopatías son un problema de salud importante en el mundo, y en México son una de las principales causas de muerte, lo que constituye un problema de salud que va en aumento. Para controlar estos padecimientos se usan fármacos cardiotónicos entre los que se encuentran los glucósidos cardiacos, los cuales tienen un índice terapéutico bajo. Debido a esto, los científicos siguen en la búsqueda de alternativas de nuevos cardiotónicos que tengan un mayor índice terapéutico. *Undaria pinnatifida*, una macroalga parda de importancia comercial, ha llamado la atención de los científicos, debido a que se le atribuyen diversas actividades biológicas, por lo que en el presente trabajo se obtuvieron extractos del alga marina *Undaria pinnatifida* para evaluar el efecto cardiotónico sobre el corazón de la almeja *Tivela stultorum*, midiendo su fuerza de contracción y su frecuencia cardíaca. Se obtuvieron 3 extractos (dos extractos acuosos y un extracto etanólico), mediante extracción a reflujo durante 24 h. De los tres extractos obtenidos, sólo el extracto etanólico ocasionó efectos en pruebas preliminares sobre el sistema de prueba, por lo que el trabajo se centró en su estudio. El extracto etanólico se agregó en volúmenes de 75 µl, 150 µl, 225 µl, 300 µl, 375 µl, 450 µl, 525 µl y 600 µl a la cámara de prueba. Todas las adiciones ocasionaron efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo sobre el corazón de *T. stultorum*, pero sólo al agregar 525 µl y 600 µl se observó una disminución significativa en la frecuencia cardíaca. El extracto etanólico también ocasionó inhibición en la Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa, por lo que se concluye que *U. pinnatifida* posee algún componente tipo digitálico que tiene potencial como agente cardiotónico.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. OBJETIVOS .....	10
5. HIPÓTESIS.....	11
6. METODOLOGIA .....	12
6.1 Diseño experimental.....	12
6.2 Obtención de extractos acuosos de <i>U. pinnatifida</i> .....	14
6.3 Extracto acuoso de <i>U. pinnatifida</i> filtrado con acrodiscos.....	15
6.4 Obtención de extracto etanólico de <i>U. pinnatifida</i> .....	16
6.5 Mantenimiento de almeja pismo ( <i>Tivela stultorum</i> ) .....	17
6.6 Bioensayos .....	18
6.6.1 Tratamiento de datos para la evaluación de parámetros fisiológicos .....	19
6.6.2 Obtención de curvas de dosis-respuesta.....	19
6.6.3 Efecto del extracto etanólico de <i>Undaria pinnatifida</i> sobre la enzima Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa. ...	20
6.6.4 Tratamiento de datos para la cuantificación de la actividad de la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa. ....	23
6.7 Análisis estadístico.....	24
7 RESULTADOS.....	25
7.1 Parámetros biofísicos del corazón de almeja pismo ( <i>Tivela stultorum</i> ).....	25
7.2 Resultados preliminares del efecto fisiológico de los extractos de <i>Undaria pinnatifida</i> sobre el corazón de <i>T. stultorum</i> .....	26
7.3 Resultados bioensayos definitivos (Efecto fisiológico del extracto etanólico). ....	27
7.4 Curvas dosis respuesta y miogramas.....	29
7.5 Efecto del extracto etanólico de <i>Undaria pinnatifida</i> sobre la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa. ....	34
7.6 Efecto del extracto etanólico sobre la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa del corazón de <i>T. stultorum</i> .....	34
8. DISCUSIÓN .....	36
9. CONCLUSIONES .....	39
10. BIBLIOGRAFÍA.....	40

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros biofísicos de <i>T. stultorum</i> , los datos se refieren al promedio de valores obtenidos para cada corazón utilizado para medir el efecto de los extractos, para cada extracto se utilizaron tres corazones.....	25
Tabla II. Porcentaje de cambio de la fuerza de contracción, después de la adición de los extractos.	26
Tabla III. Porcentaje de cambio de la frecuencia cardíaca, después de la adición de los extractos. .	27
Tabla IV. Promedios obtenidos de la medición de la fuerza de contracción de tres corazones de <i>T. stultorum</i> al agregar las diferentes cantidades del extracto etanólico. (n=3). .....	28
Tabla V. Promedios obtenidos de la medición de la frecuencia cardíaca de tres corazones de <i>T. stultorum</i> al agregar las diferentes cantidades del extracto etanólico. ....	28
Tabla VI. Actividad enzimática de los corazones de almeja pismo ( <i>T. stultorum</i> ) sin tratamiento..	35
Tabla VII. Actividad enzimática de los corazones de almeja pismo ( <i>T. stultorum</i> ), con el extracto etanólico de <i>Undaria pinnatifida</i> . .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura común de los glucósidos cardíacos, donde se aprecia su anillo de lactona, su núcleo esteroidal y el monosacárido (Tomado de Lufrano et al., 1982)).....	5
Figura 2. Esquema del aparato circulatorio de molusco bivalvo (Tomado de Peteiro. 2003).....	8
Figura 3. Diagrama de flujo del diseño experimental para la obtención de extractos cardiotónicos del alga <i>Undaria pinnatifida</i> . .....	13
Figura 4. a) <i>Undaria pinnatifida</i> seca antes de molerla. b) Obtención del extracto acuoso mediante destilación a reflujo. ....	14
Figura 5 Filtración del extracto acuoso de <i>U. pinnatifida</i> mediante acrodiscos.....	15
Figura 6. a) Extracto etanólico (vaso de precipitados) después de ser filtrado al vacío en frío y a un lado (matraz) el sobrenadante que se le extrajo. b) Papeles filtro utilizados en el extracto etanólico, para eliminar los residuos de polímero. ....	16
Figura 7. En la figura se muestran los tres extractos obtenidos: a) extracto acuoso filtrado al vacío, b) extracto acuoso sin pasar por rotaevaporación, solo filtrado al vacío y con acrodiscos (tubos detrás del extracto a) y c) extracto etanólico filtrado al vacío en frío. ....	17
Figura 8. Mantenimiento de almeja pismo ( <i>T. stultorum</i> ) en las peceras .....	18
Figura 9. A) Almeja diseccionada para extraer el corazón b) Corazón extraído y colocado en caja petri con agua de mar. C) Corazón de la almeja, colocado en el transductor de fuerza. ....	19
Figura 10. Tubos de ensaye utilizados para realizar la curva de calibración para fosfatos. ....	22
Figura 11. Tubos de ensaye utilizados para realizar la curva de calibración para proteínas.....	23
Figura 12. Curva de dosis –respuesta donde se observa el aumento en la fuerza de contracción conforme se incrementa la dosis del extracto etanólico de <i>U. pinnatifida</i> . ....	29
Figura 13. Curva de dosis –respuesta donde se observa una disminución en la frecuencia cardíaca al agregar el extracto etanólico de <i>U. pinnatifida</i> al corazón de <i>T. stultorum</i> .....	29
Figura 14. Efecto del extracto etanólico 75 $\mu$ l sobre el corazón de <i>T. stultorum</i> , en donde se puede apreciar que de 6.2 gramos fuerza, aumenta a 7.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 17 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios .....	30
Figura 15. Efecto del extracto etanólico de 150 $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de <i>T. stultorum</i> , en donde se puede apreciar que de 5.8 gramos fuerza, aumenta a 6.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 8 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios.....	30
Figura 16. Efecto del extracto etanólico de 225 $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de <i>T. stultorum</i> , en donde se puede apreciar que de 5.5 gramos fuerza, aumenta a 6.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 14 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios.....	31
Figura 17. Efecto del extracto etanólico de 300 $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de <i>T. stultorum</i> , en donde se puede apreciar que de 7.60 gramos fuerza, aumenta a 9.9, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 30 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios.....	31
Figura 18. Efecto del extracto etanólico de 375 $\mu$ l sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca en el corazón de <i>T. stultorum</i> , en donde se puede apreciar que este corazón presentó latidos inestables, debido a que en algún punto se desprendió del gancho que se conecta al fisiógrafo, pero aun así se observa un aumento en la fuerza de contracción y cambios en su frecuencia cardíaca....	32

Figura 19. Efecto del extracto etanólico de 450 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de T. stultorum, en donde se puede apreciar que de 6.7 gramos fuerza, aumenta a 9.5, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 42 % en la fuerza de contracción. Con respecto a la frecuencia cardíaca se puede apreciar una leve disminución de esta entre cada latido. .... 32

Figura 20. Efecto del extracto etanólico de 525 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de T. stultorum, en donde se puede apreciar que de 4.7 gramos fuerza, aumenta a 11.1, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 136 % en la fuerza de contracción. La frecuencia cardíaca sufre una disminución evidente entre cada latido. .... 33

Figura 21. Efecto del extracto etanólico de 600 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de T. stultorum, en donde se puede apreciar que de 5.4 gramos fuerza, aumenta a 13.2, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 144 % en la fuerza de contracción. La frecuencia cardíaca sufre una notable disminución entre cada latido. .... 33

# 1. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías son la principal causa de muerte de adultos, la frecuencia de éstas éstas tiene relación con el incremento de la población longeva, puesto que las enfermedades cardiovasculares (EC) se incrementan con la edad, originando que constituyan un problema de salud que va en aumento (Monte *et al.*, 2001). Esto puede verse reflejado en todo el mundo: Europa gasta 196 millones de euros por año para tratar las enfermedades cardiovasculares, mientras que EE.UU. destina 444 mil millones de dólares, solo para cardiopatías, lo que equivale a una sexta parte del gasto total del país en materia de salud (Fawaz Alzaid, 2014).

En México cada hora mueren 10 personas por infartos al miocardio, situación que coloca a las enfermedades del corazón como la principal causa de decesos en el país principalmente por tabaquismo, obesidad, diabetes y alcoholismo. Se prevé que para el 2020 la mitad de las muertes por enfermedad en la República Mexicana serán derivadas de una cardiopatía. En el 2013 se registró la muerte de 283 mil 732 mexicanos por enfermedades cardiovasculares, de las cuales 74 mil 57 fueron por cardiopatías isquémicas (Salud, 2014).

En la actualidad los cardiotónicos son un grupo importante recetado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y arritmias. Los cardiotónicos, (llamados también glucósidos o digitálicos) han sido utilizados por años para acabar con los síntomas que ocasionan las

enfermedades cardiacas, los glucósidos cardíacos más utilizados hoy en día, son los provenientes de fuentes naturales como plantas y animales (Zeino et al., 2015).

Los glucósidos cardíacos son una clase importante de fármacos, usualmente conocidos por impedir el transporte de iones de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ , lo que conduce al efecto inotrópico positivo derivado del incremento del calcio intracelular en el musculo cardiaco (Borroto, 2009). El mecanismo de acción de los glucósidos cardiotónicos, es atribuido a la inhibición del transporte activo  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , mediante la afinidad del glucósido con la superficie extracelular de la bomba de sodio anclada a la membrana (Heasley, 2012). La enzima  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$  regula la homeostasis celular de sodio y potasio a través del transporte, expulsando 3 iones de sodio a la vez que ingresa dos iones de potasio a la célula (Konrad *et al.*, 2011). La especificidad de los cardiotónicos por la inhibición de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$  y la participación de la enzima en la expulsión de  $\text{Na}^+$  de la célula son algunas razones del gran interés farmacológico en este tipo de sustancias químicas llamadas cardiotónicos. (Yatime *et al.*, 2011). Los glucósidos cardíacos al inhibir la actividad de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$  aumentan la acumulación de  $\text{Na}^+$  en la célula incrementando el calcio intracelular, causando un mejor rendimiento contráctil del corazón (Guyton, 1987).

Uno de los principales inconvenientes que presentan los digitálicos es su bajo índice terapéutico, ya que puede causar efectos tóxicos severos sobre el corazón (Duan *et al.*, 2015). Es por eso que se buscan alternativas con márgenes terapéuticos más amplios; por lo cual ya se han empezado a explorar distintos campos que pueden ser fuente de productos cardioestimuladores, tales como las toxinas que producen los seres marinos, entre los cuales se han encontrado moléculas diferentes a las que sintetizan las especies terrestres (Duray *et al.*, 1990). Algunos organismos que se han estado explotando como fuente de compuestos

cardiotónicos son las anémonas de mar y equinodermos, principalmente los de la clase Holoturoidea (pepinos de mar) y Asteroidea (estrellas de mar). Estos organismos tienen un alto potencial comercial, debido a la demanda en países asiáticos. (Scheuer, 1988).

Otro organismo marino que constituye un grupo económica y ecológicamente importante, son las algas marinas que se utilizan como: alimento humano, fuente de alginato y para una amplia gama en la industria (textil, papel, cosmética y farmacéutica). (Peteiro *et al.*, 2016). Las algas son muy apreciadas en diferentes culturas por su contenido en vitaminas, proteínas, ácidos grasos, fibra, azúcares entre otras (Steneck *et al.*, 2003).

Una especie de gran valor comercial es *Undaria pinnatifida*, una macroalga parda, de importancia económica como fuente de alimento en países como Japón, Corea y China, de la cual se sabe que tiene diversas actividades biológicas, tales como: antioxidantes, anticoagulante, y anticancerígenas, además de ser ricas en vitaminas, minerales y proteínas, (Prabhasankar *et al.*, 2009). Debido a su potencial, se evaluó el efecto de extractos de *Undaria pinnatifida*, sobre la fuerza y frecuencia del latido del corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*), para validar su actividad como posible glucósido cardíaco.

## 2. ANTECEDENTES

Duan y colaboradores (2015) mencionan que las enfermedades cardiovasculares son consideradas como la principal causa de muerte en el mundo, más que cualquier otra enfermedad. De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2015), 17.5 millones de personas murieron a causa de enfermedades cardiovasculares.

Los primeros glucósidos cardiotónicos se obtuvieron de las hojas del género *Digitalis*. En 1785, Withering publicó las primeras observaciones científicas sobre su uso en pacientes que padecían de hidropesía (acúmulo de líquido de origen hepático o cardíaco) y otros trastornos. Esta publicación está basada en la simple observación de sus efectos, se establecen sus primeras indicaciones y se advierte de sus riesgos, tales como mareos, náuseas, vómitos y diarreas. (Withering, 1785). Más adelante se logró establecer que su efecto farmacológico se debe al contenido de numerosos compuestos, que se denominan genéricamente “glucósidos cardiotónicos”. Estos glucósidos tienen una estructura común esteroidal, unida a una lactona y a un glucósido (comúnmente es un monosacárido) (Fig. 1). Los cardiotónicos más utilizados son la digitoxina, obtenida de la *Digitalis purpurea* y la digoxina extraída de la *Digitalis lanata*. (Alves *et al.*, 2015).

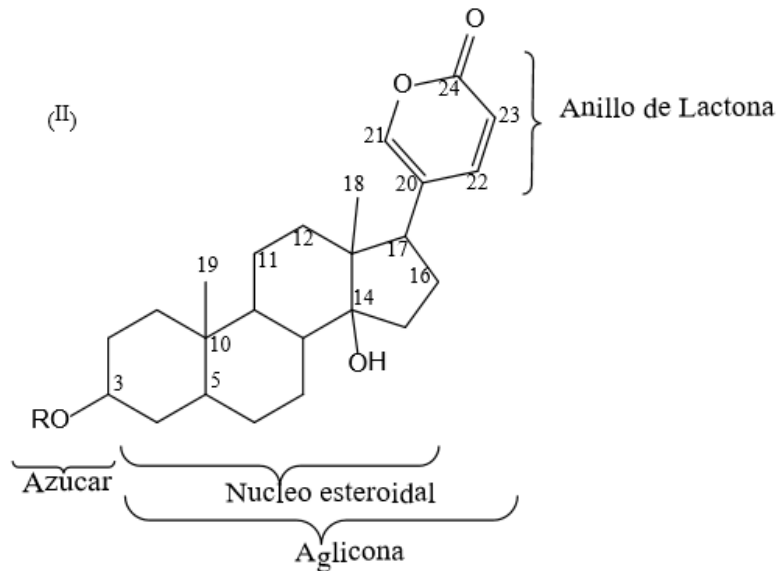


Figura1. Estructura común de los glucósidos cardíacos, donde se aprecia su anillo de lactona, su núcleo esteroidal y el monosacárido (Tomado de Lufrano et al., 1982))

Una de las propiedades de los cardiotónicos es el aumentar la fuerza y velocidad de las contracciones cardíacas (Ortiz *et al.*, 2003). Este aumento en la fuerza y velocidad de la contracción se debe al bloqueo de la ATPasa dependiente de sodio-potasio. Al inhibirse esta enzima se aumenta la concentración de calcio intracelular, lo que provoca una mayor fuerza de contracción en el corazón al activarse las proteínas contráctiles de la célula cardiaca, con lo cual se incrementa el gasto cardiaco, disminuye el tamaño del corazón y la presión pulmonar (Borroto, 2009). El fenómeno de acoplamiento excitación-contracción representa una comunicación rápida entre los eventos eléctricos que ocurren en la membrana plasmática y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Calderún-Vélez & Figueroa-Gordon,

2009). La sobre carga de calcio está relacionada con el efecto tóxico de los digitalicos, lo que conlleva a que la homeostasis no se pueda mantener y ocurra una degradación celular (Schmidt & Kjeldsen, 1998). El aumento de calcio intracelular es uno de los mecanismos que participan en el vasoespasmo coronario.

Debido a los efectos tóxicos de los actuales cardiotónicos comerciales de origen terrestre, se sigue intentando sintetizar compuestos menos tóxicos, y en la actualidad los organismos marinos han cobrado importancia ya que se ha descubierto que sus compuestos son más potentes en menores concentraciones (Guyton, 1987)

Los equinodermos como los pepinos y las estrellas de mar son algunos de los organismos marinos que se han explorado para la búsqueda de sustancias con actividad sobre el corazón. En dichos organismos se han encontrado saponinas. Las saponinas son un tipo de glucósido cardiaco, que producen los equinodermos y que poseen un amplio espectro de efectos farmacológicos incluyendo hemolítica, antitumoral, anti-inflamatorio, antifúngico, antibacteriano, o actúan como inhibidores de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$  (Van Dyck *et al.*, 2009). Íñiguez Martínez (1995) aisló y propuso la estructura para uno de los componentes presentes en el extracto de pepino, la cual es similar a la de los glucósidos cardiotónicos.

Los ofiúridos son organismos marinos que también han sido estudiados en la búsqueda de cardiotónicos, Lumbreras-Martínez (2012) caracterizo compuestos cardiotónicos de *Ophiderma panamense* obteniendo extracto crudo que ocasionó efecto cardiotónico, concluyendo que estos organismos poseen químicos con actividad cardiotónica.

Otros organismos que podemos encontrar dentro del medio marino son las macroalgas tales como *Undaria pinnatifida*, un alga parda muy utilizada como alimento en Asia, estas algas son ricas en proteínas, vitaminas, minerales esenciales, fibra y varios componentes activos tales como los carotenoides y el fucoidan. Se sabe que las algas pardas contienen más componentes bioactivos que cualquier alga verde o roja (Caulier *et al.*, 2013). Algunos de los compuestos bioactivos identificados en las algas pardas como *U. pinnatifida*, incluyen ácidos grasos, fucoxantina, fitoesteroles, entre otros metabolitos (Prabhasankar *et al.*, 2009). *U. pinnatifida* contiene ácido eicosapentaenoico, ácido graso empleado tras sufrir un infarto en el miocardio. Aunque la mayoría de los estudios sobre *U. pinnatifida*, se han centrado en la evaluación de las funciones biológicas, también se sabe que es rica en altos niveles de calcio, yodo, tiamina y niacina (Rafiquzzaman *et al.*, 2013). Hasta el momento no se ha reportado algún estudio con *U. pinnatifida* usada como cardiotónico.

*Tivela stultorum* es una almeja conocida con su nombre común como almeja pismo, esta especie es un organismo validado como herramienta de cribado para la localización de cardiotónicos, el corazón de este organismo reacciona fisiológica y bioquímicamente hacia los glucósidos cardíacos de la misma manera que el corazón humano, mostrando inhibición a la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  (Cuellar Roheri, 1991), y efecto inotrópico positivo seguido de efecto cronotrópico negativo o disminución de la frecuencia cardíaca (Guerra-Rivas, 1994). Una característica que comparten los moluscos con el humano es el corazón miogénico, es decir que tiene un grupo de células que estimula el corazón y dicta la frecuencia cardíaca (Randall & Burggren, 2002). El corazón de los bivalvos se encuentra en la cavidad pericárdica y está formado por dos aurículas posteriores y un ventrículo anterior que forman el atrio. Al atrio

llega la sangre oxigenada procedente de las branquias que pasa al ventrículo el cual la reparte a todo el cuerpo a través de las aortas (Fig.2) (Peteiro *et al.*, 2003).

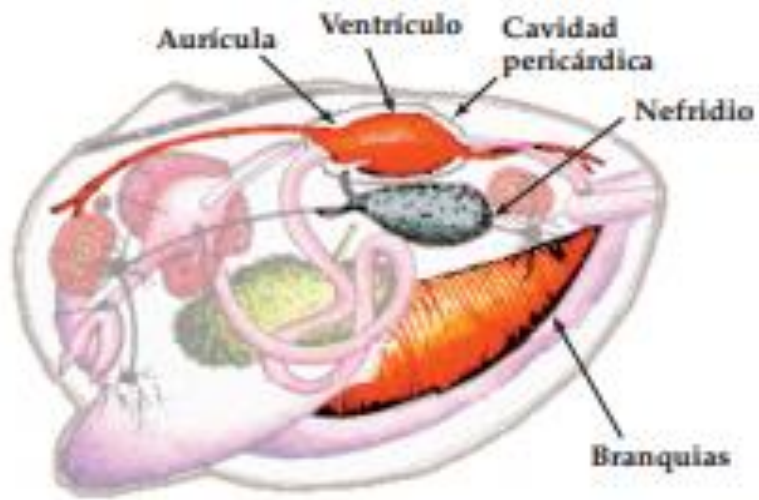


Figura 2. Esquema del aparato circulatorio de molusco bivalvo (Tomado de Peteiro. 2003).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad los glucósidos cardíacos, dosificados en enfermedades cardiovasculares, poseen un índice terapéutico muy bajo es necesario buscar un fármaco con alta efectividad y baja toxicidad, es decir, un alto índice terapéutico. Se ha demostrado que fármacos obtenidos a partir de organismos marinos proporcionan sustancias con capacidad cardiotónica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto cardiotónico de extractos de *Undaria pinnatifida*, mediante la fuerza y frecuencia del latido del corazón.

### 4.2 Objetivos particulares

- Elaborar una curva dosis-respuesta, para evaluar los efectos de los extractos de *Undaria pinnatifida*, sobre la fuerza y frecuencia del latido del corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*).
- Evaluar el efecto de los extractos de *Undaria pinnatifida*, sobre la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa del corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*).

## 5. HIPÓTESIS

El corazón de la almeja pismo (*Tivela stultorum*) responde con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo cuando es expuesto a la acción de los extractos de *Undaria pinnatifida*

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Diseño experimental

Se obtuvieron extractos de *Undaria pinnatifida*. Cada extracto fue evaluado mediante un bioensayo, el cual consistió en utilizar el corazón perfundido de *Tivela stultorum* conectado a un fisiógrafo. Tomando en consideración los datos obtenidos se seleccionaron los extractos con mayor efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo. El extracto que presento inhibición fue validado mediante el mismo bioensayo en el corazón de almeja pismo (*T. stultorum*), consiguiendo curvas de dosis-respuesta en donde se registraron los cambios en la fuerza de contracción y frecuencia cardiaca, también se evaluó la inhibición de cada extracto sobre la  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ .

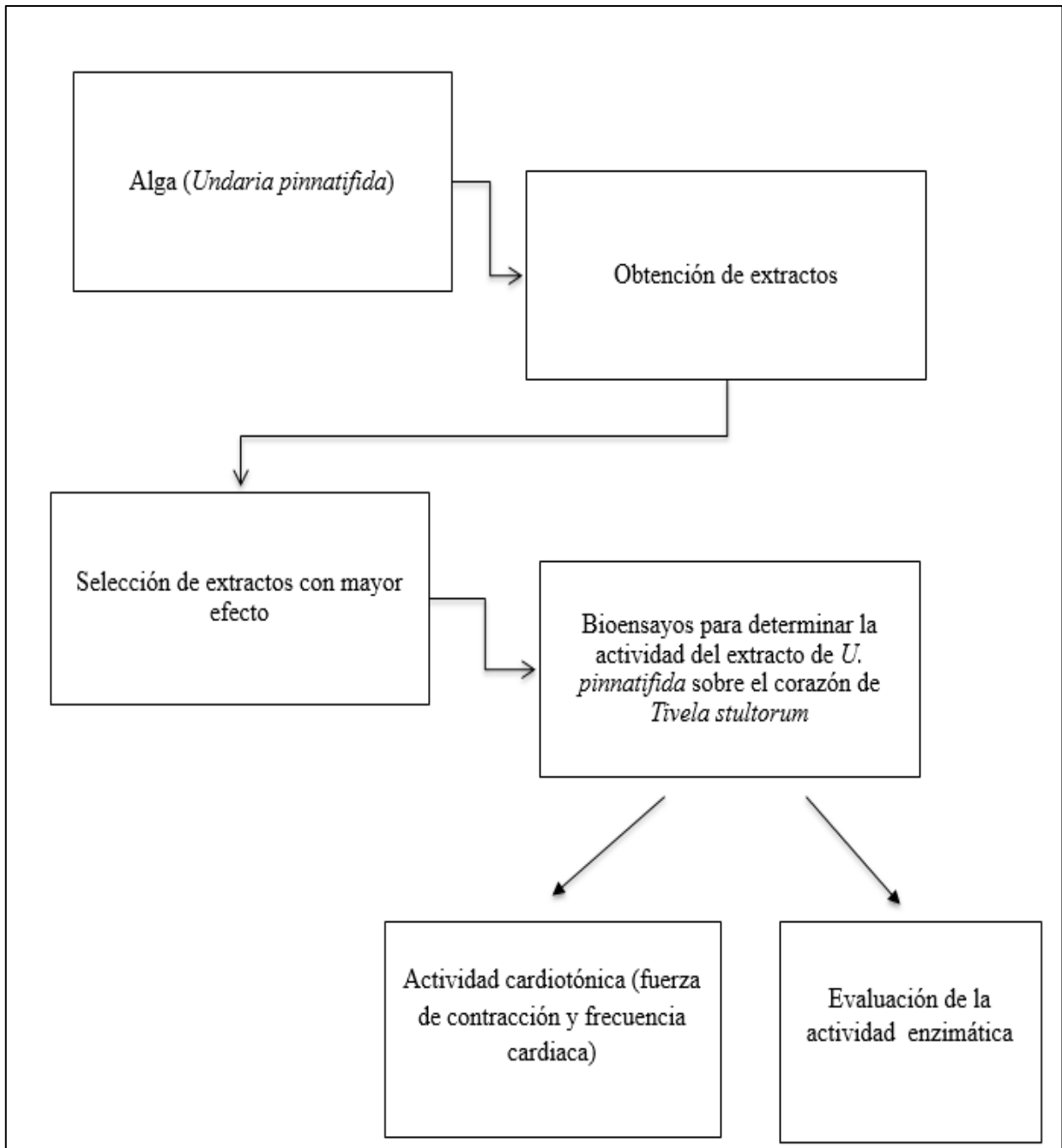


Figura 3. Diagrama de flujo del diseño experimental para la obtención de extractos cardiotónicos del alga *Undaria pinnatifida*.

## 6.2 Obtención de extractos acuosos de *U. pinnatifida*.

El alga se secó durante 24 horas a temperatura ambiente, una vez seca se procedió a la preparación del extracto de la siguiente manera: El alga se trituró con ayuda de una licuadora, y el polvo obtenido se pesó y almacenó en un bote de plástico con tapa. Este polvo fue sometido a extracción continua durante 24 horas mediante destilación a reflujo. El proceso de extracción se realizó empleando 100 g de polvo de alga en 2000 ml de agua destilada. El extracto obtenido se filtró al vacío, y posteriormente se sometió a rotaevaporación para separar el solvente (agua), el solvente se eliminó y el extracto sin solvente se almacenó en refrigeración hasta su uso (Fig. 4).

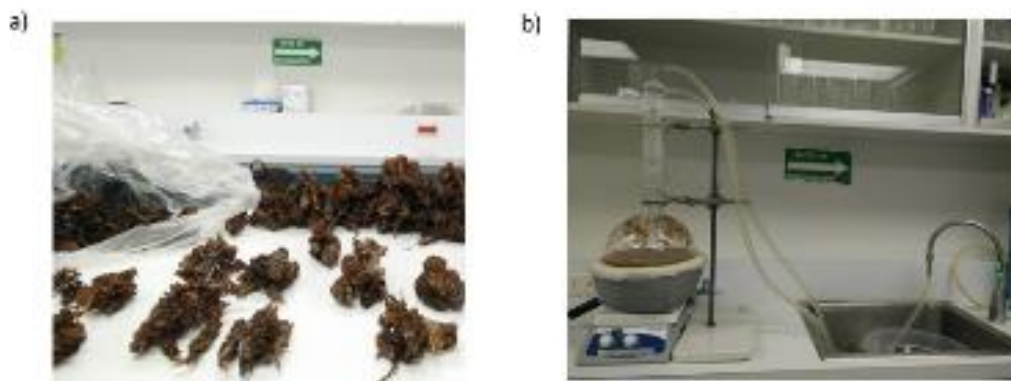


Figura 4. a) *Undaria pinnatifida* seca antes de molerla. b) Obtención del extracto acuoso mediante destilación a reflujo.

### 6.3 Extracto acuoso de *U. pinnatifida* filtrado con acrodiscos.

Este proceso fue similar al anterior, con la variante que el extracto no fue sometido a rotaevaporación, sino que después de ser filtrado al vacío, pasó por una segunda filtración pero esta vez con ayuda de acrodiscos (Fig. 5).

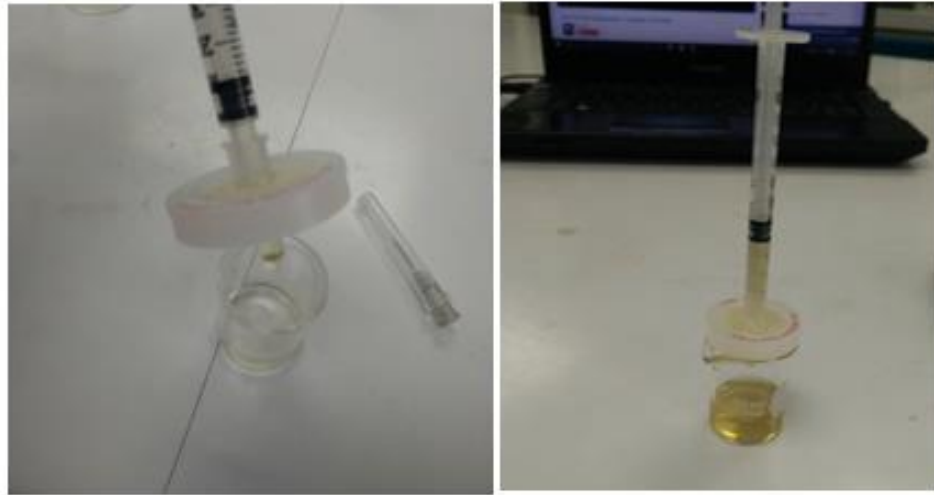


Figura 5 Filtración del extracto acuoso de *U. pinnatifida* mediante acrodiscos.

#### 6.4 Obtención de extracto etanólico de *U. pinnatifida*.

El proceso de extracción se llevó a cabo mediante una destilación a reflujo durante 24 horas, utilizando 50 g de polvo de alga en 1000 ml de etanol. El extracto obtenido se filtró al vacío y posteriormente se rotaevaporó para eliminar el solvente, el extracto se mantuvo en refrigeración por un día. Al día siguiente se realizó un filtrado al vacío en frío, con la finalidad de eliminar el sedimento, (sedimento que se encontró después de ser guardado en refrigeración) y el sobrenadante final (sin sedimento) se mantuvo en refrigeración hasta su uso (Fig. 6).

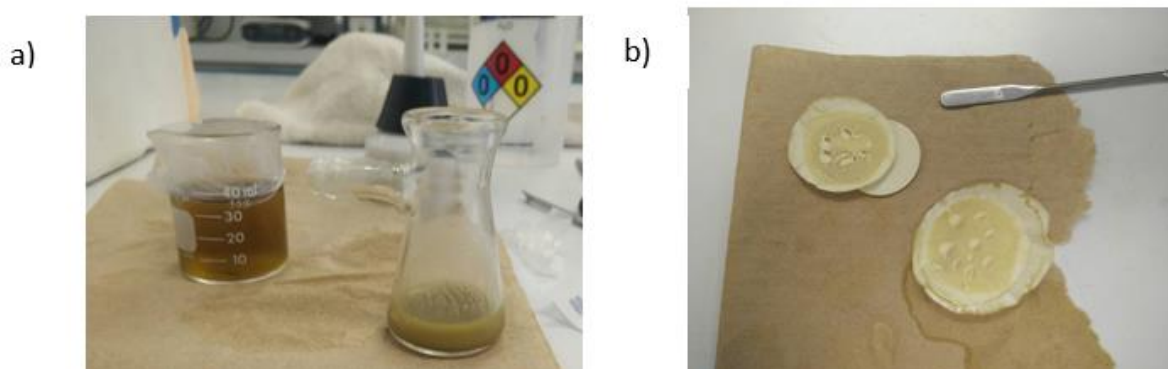


Figura 6. a) Extracto etanólico (vaso de precipitados) después de ser filtrado al vacío en frío y a un lado (matraz) el sobrenadante que se le extrajo. b) Papeles filtro utilizados en el extracto etanólico, para eliminar los residuos de polímero.

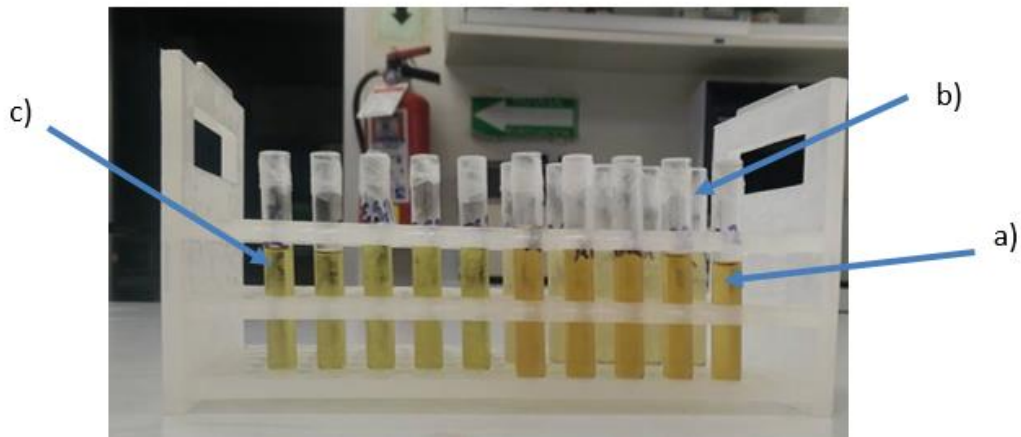


Figura 7. En la figura se muestran los tres extractos obtenidos: a) extracto acuoso filtrado al vacío, b) extracto acuoso sin pasar por rotaevaporación, solo filtrado al vacío y con acrodiscos (tubos detrás del extracto a) y c) extracto etanólico filtrado al vacío en frío.

### 6.5 Mantenimiento de almeja pismo (*Tivela stultorum*)

Las almejas fueron obtenidas del mercado negro localizado en el Boulevard Costero en Ensenada Baja California, México. Los organismos se colocaron en peceras con aireación constante a una temperatura controlada de 17 °C, el recambio de agua y la alimentación fueron diarios (Fig. 8).



Figura 8. Mantenimiento de almeja pismo (*T. stultorum*) en las peceras

## 6.6 Bioensayos

En todos los bioensayos realizados para probar el efecto del extracto, sobre el corazón de la almeja, se utilizó el corazón en perfusión de *T. stultorum* siguiendo el procedimiento de (Guerra-Rivas, 1994). Brevemente, se realizaron de la forma siguiente: se practicó la disección de la almeja para extirpar el corazón, que se colocó inmediatamente en un vaso de precipitado de 50 ml con una punta de aguja para líquido cefalorraquídeo sujetando al ventrículo por un extremo, a la vez que permitía la aireación constante del agua de mar. El otro extremo del corazón se sujetó por un gancho al transductor de fuerza MLT050/A, conectado al amplificador del PowerLab 10T de ADInstruments. El registro de la fuerza de contracción se realizó en la computadora mediante el programa Chart 5.0, de ADInstruments. El volumen de agua de mar fue constante para todos los ensayos. La adición del extracto, se realizó una vez alcanzada la constancia en la fuerza y frecuencia de contracción. La temperatura a la que se realizaron los ensayos fue de 17 °C.

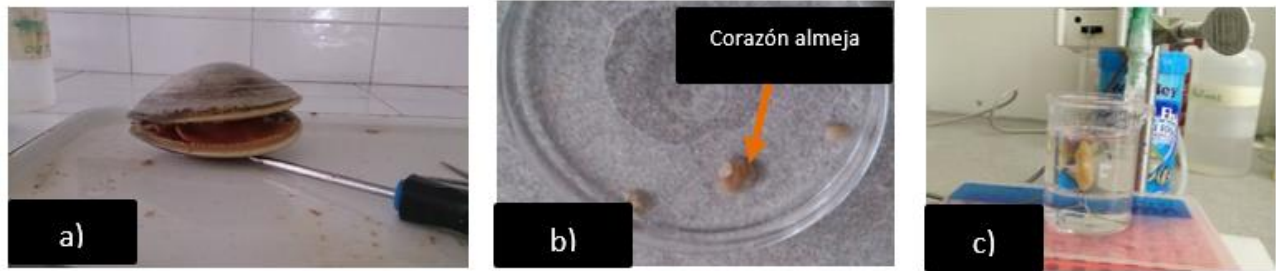


Figura 9. A) Almeja diseccionada para extraer el corazón b) Corazón extraído y colocado en caja petri con agua de mar. C) Corazón de la almeja, colocado en el transductor de fuerza.

#### 6.6.1 Tratamiento de datos para la evaluación de parámetros fisiológicos

Para cada registro (con o sin tratamiento) se obtuvo la fuerza de contracción (F) promedio en un bloque de seis latidos. Se definió fuerza de contracción como la diferencia entre el máximo y mínimo valor registrado de cada latido expresado en gramos fuerza. Además se obtuvo la frecuencia cardiaca, definida como la cantidad de latidos registrados en un minuto. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de cambio provocado por el tratamiento para la fuerza y frecuencia.

#### 6.6.2 Obtención de curvas de dosis-respuesta

Curva dosis-fuerza de contracción: el efecto ocasionado sobre la fuerza de contracción del corazón de la almeja pismo por cada concentración probada, se graficó colocando las concentraciones del material de prueba sobre las abscisas y la fuerza de contracción en las ordenadas.

Curva dosis-frecuencia cardíaca: el efecto ocasionado sobre la frecuencia de latido del corazón de la almeja pismo por cada concentración probada, se graficó colocando las concentraciones del material sobre las abscisas y la frecuencia cardíaca en las ordenadas. Cada extracto obtenidos se probó para evaluar sus efectos sobre el corazón de *Tivela stultorum*.

### 6.6.3 Efecto del extracto etanólico de *Undaria pinntifida* sobre la enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa.

#### 6.6.3.1 Preparación de homogenados

Con la ayuda de un homogeneizador manual se molió el corazón de la almeja en una solución amortiguadora de HEPES-Sacarosa (0.5-0.25mM), con un pH 7, a una proporción de 75 mg/ml. Todo se realizó en frío, colocando el corazón en un vaso de precipitados, que a su vez este se encontraba dentro de un recipiente con hielo, el homogenado fue utilizado inmediatamente después de molerlo.

### 6.6.3.2 Ensayo enzimático

Del homogenado preparado en la sección 8.1 se tomó 0.2 ml y se le agregó HEPES 50 Mm y  $\text{MgSO}_4$  6 mM, se dejó reposar 10 minutos. Pasando los 10 minutos se le agregó el NaATP 0.8 mM, se agitó durante 15 segundos con la ayuda de un vortex y se dejó reposar otros 10 minutos, transcurrido el tiempo se le agregó el KCl mM. Finalmente la mezcla se incubó durante 60 minutos a 25° C en baño maria. Por último se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 5 % para detener la reacción. Se centrifugó 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se almacenó en el congelador para después ser utilizado para análisis de fosfatos y el precipitado se almacenó en el refrigerador para ser utilizado para analizar proteínas.

### 6.6.3.3 Determinación de fosfatos

A una muestra de 1 ml de sobrenadante se le agregó 3 ml de butanol, 0.2 ml de solución ácida de molibdato y 0.2 ml de solución de citrato de sodio 0.68 M, agitando después de cada adición con ayuda de un vortex. Antes se realizó una curva de calibración con fosfato monobásico de sodio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) de 0 a 2  $\mu\text{moles/ml}$  (figura 12).

Se leyó la absorbancia de la fase butanólica a 400 nm en un espectrofotómetro (Helios $\alpha$  de Thermo Electron Corporation) y se determinó la concentración de fosfatos con la curva de calibración (Fig. 10).

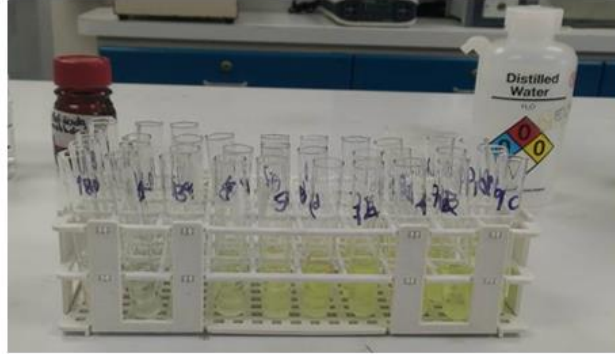


Figura 10. Tubos de ensaye utilizados para realizar la curva de calibración para fosfatos.

#### 6.6.3.4 Determinación de proteínas.

El precipitado obtenido en la sección 6.9.2, se resuspendió en 2ml de NaOH 1N. De la muestra anterior se tomó 1 ml y se le agregó 5 ml de reactivo alcalino (1 ml de  $\text{CuSO}_4$  al 5 % en tartrato sódico potásico al 1 % y 50 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N) se dejó reposar 10 minutos y se le agregó 0.5 ml de reactivo Folin 2 N diluido en agua 1:1. Se agitó con vortex después de cada adición. Se puso a reposar durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotometro (Helios $\alpha$  de Thermo Electron Corporation). La concentración de proteína se obtuvo con una curva de calibración de albúmina de 0-500  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 11)

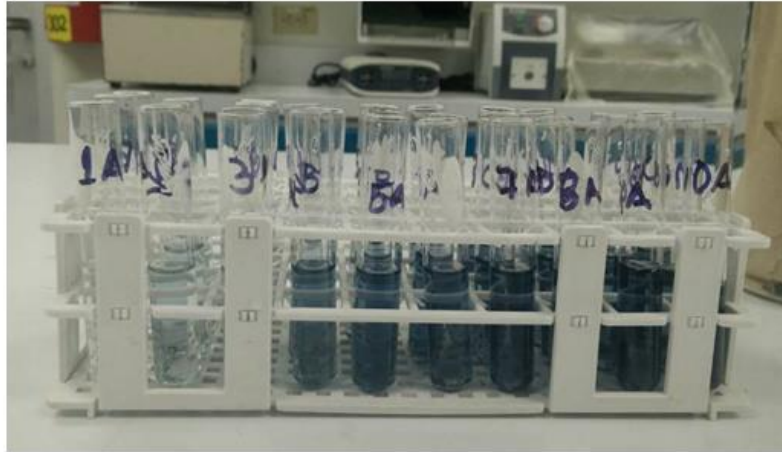


Figura 11. Tubos de ensaye utilizados para realizar la curva de calibración para proteínas

#### 6.6.4 Tratamiento de datos para la cuantificación de la actividad de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa.

La actividad de la  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPasa fue definida como la cantidad de  $\text{Pi}$ , en  $\mu\text{moles}$ , producido por 1 mg de proteína en una hora. Para obtener los valores de actividad en cada prueba, se dividió el valor de  $\text{Pi}$  encontrado entre el valor de proteína presente en el tejido utilizado. A todos los tubos se les restó el control correspondiente, el cual indica la cantidad de  $\text{Pi}$  endógeno presente en cada tejido.

## 6.7 Análisis estadístico.

A cada paquete de datos obtenidos en los bioensayos, se les realizó prueba de Kruskal-Wallis, y posteriormente para evaluar las diferencias entre cada tratamiento, se realizaron pruebas de Fisher y de Tukey. Todo esto con un nivel de significancia de  $\alpha= 0.01$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Parámetros biofísicos del corazón de almeja pismo (*Tivela stultorum*).

Los datos de que se muestran en la tabla I, son los datos biométricos para la almeja pismo *T. stultorum*, tanto parámetros del corazón como características de la concha del organismo.

Tabla I. Parámetros biofísicos de *T. stultorum*, los datos se refieren al promedio de valores obtenidos para cada corazón utilizado para medir el efecto de los extractos, para cada extracto se utilizaron tres corazones.

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio ± error estándar</b>
Peso del corazón	0.2220 ± 0.0037 (g)
Volumen	0.1825 ± 0.0075 (cm <sup>3</sup> )
Eje auricular	0.4458 ± 0.0190 (cm)
Eje intestinal	1.0041 ± 0.0244 (cm)
Largo de la concha	11.6125 ± 0.1062 (cm)
Ancho de la concha	7.925 ± 0.0998 (cm)

## 7.2 Resultados preliminares del efecto fisiológico de los extractos de *Undaria pinnatifida* sobre el corazón de *T. stultorum*.

En las tabla II y III se muestra el efecto de cada extracto sobre la fuerza y frecuencia del corazón de *T. stultorum*, se puede observar el porcentaje de cambio, después de agregarles el extracto. A cada corazón utilizado se le agregó 25 µl de extracto cada 5 minutos durante un periodo aproximado de 1 hora.

Al agregar el extracto acuoso y el extracto acuoso filtrado con acrodiscos, se observa una disminución en la fuerza de contracción del corazón de la almeja, mientras que al agregar el extracto etanólico, se puede ver que el porcentaje de cambio de la fuerza de contracción, aumenta un 21 %.

Tabla II. Porcentaje de cambio de la fuerza de contracción, después de la adición de los extractos.

	<b>Fuerza de contracción (g)</b>		
	<b>Extracto acuoso</b>	<b>Extracto acuoso filtrado con acrodiscos</b>	<b>Extracto etanólico</b>
# Corazón	% de cambio después de agregar el extracto	% de cambio después de agregar el extracto	% de cambio después de agregar el extracto
1	-7.4	-7.4	19
2	-8.8	-8.7	22.5
3	-9.4	-9.4	21.5
<b>Promedio</b>	<b>-8.5</b>	<b>-8.5</b>	<b>21</b>

El extracto etanólico disminuyó la frecuencia cardíaca sobre el corazón de *T. stultorum*, mientras que los extractos acuosos no mostraron ningún cambio en el corazón de la almeja.

Tabla III. Porcentaje de cambio de la frecuencia cardíaca, después de la adición de los extractos.

	<b>Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)</b>		
	<b>Extracto acuoso</b>	<b>Extracto acuoso filtrado con acrodiscos</b>	<b>Extracto etanólico</b>
# Corazón	% de cambio después de agregar el extracto.	% de cambio después de agregar el extracto	% de cambio después agregar el extracto
1	0	0	-20
2	0	0	-20
3	0	0	-20
Promedio	0	0	-20

### 7.3 Resultados bioensayos definitivos (Efecto fisiológico del extracto etanólico).

Con base en los resultados anteriores, mostrados en las tablas (II – III), se seleccionó el extracto etanólico, para evaluar el efecto sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca. Se probó el efecto fisiológico del extracto etanólico a diferentes cantidades (75  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 225  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 375  $\mu$ l, 450  $\mu$ l, 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l), para probar su efecto sobre el corazón de *T. stultorum*.

Para cada cantidad del extracto etanólico se obtuvo la fuerza de contracción promedio en un bloque de cinco latidos, cada dos minutos. Además se obtuvo la frecuencia cardíaca, definida como el número de latidos por minuto. Los valores que se muestran, (tabla IV y V) son los promedios obtenidos de tres mediciones. (n=3) tanto de frecuencia cardíaca, como de fuerza de contracción:

Tabla IV. Promedios obtenidos de la medición de la fuerza de contracción de tres corazones de *T. stultorum* al agregar las diferentes cantidades del extracto etanólico. (n=3).

Tiempo (Minutos)	Fuerza de contracción (g)							
	Promedio 75 µl (n=3)	Promedio 150 µl (n=3)	Promedio 225 µl (n=3)	Promedio 300 µl (n=3)	Promedio 375µl (n=3)	Promedio 450µl (n=3)	Promedio 525 µl (n=3)	Promedio 600 µl (n=3)
2	6.3	5.7	7.4	8.6	7.5	9.5	11.2	11.2
4	6.5	6.2	8.4	10	9.7	10.6	11.3	12.2
6	6.6	6.8	9	10.7	10.3	11.1	11.7	12.1
8	6.6	6.9	9.5	11.2	10.6	11.2	11.7	13.1
10	6.5	6.6	9.9	11.4	11.6	11.8	11.7	13.2
<b>Promedio</b>	<b>6.5</b>	<b>6.4</b>	<b>8.9</b>	<b>10.4</b>	<b>9.9</b>	<b>10.8</b>	<b>11.5</b>	<b>12.4</b>

Tabla V. Promedios obtenidos de la medición de la frecuencia cardíaca de tres corazones de *T. stultorum* al agregar las diferentes cantidades del extracto etanólico.

Tiempo (Minutos)	Frecuencia cardíaca							
	Promedio 75 µl (n=3)	Promedio 150 µl (n=3)	Promedio 225 µl (n=3)	Promedio 300 µl (n=3)	Promedio 375 µl (n=3)	Promedio 450 µl (n=3)	Promedio 525 µl (n=3)	Promedio 600 µl (n=3)
3	11.7	12	11	8.3	7	9.3	8.3	8.3
6	11.7	11.7	10.3	8.3	7.7	9	7.3	6.6
9	11.7	11.3	10.3	7.7	8	7.7	5.7	5
12	11.3	11.3	10.3	7.7	7.7	7.3	5	4.3
15	11	11.7	10.3	7.3	8.3	7	4.7	4
<b>Promedio</b>	<b>11.5</b>	<b>11.6</b>	<b>10.4</b>	<b>7.9</b>	<b>7.7</b>	<b>8.1</b>	<b>6.2</b>	<b>5.6</b>

## 7.4 Curvas dosis respuesta y miogramas

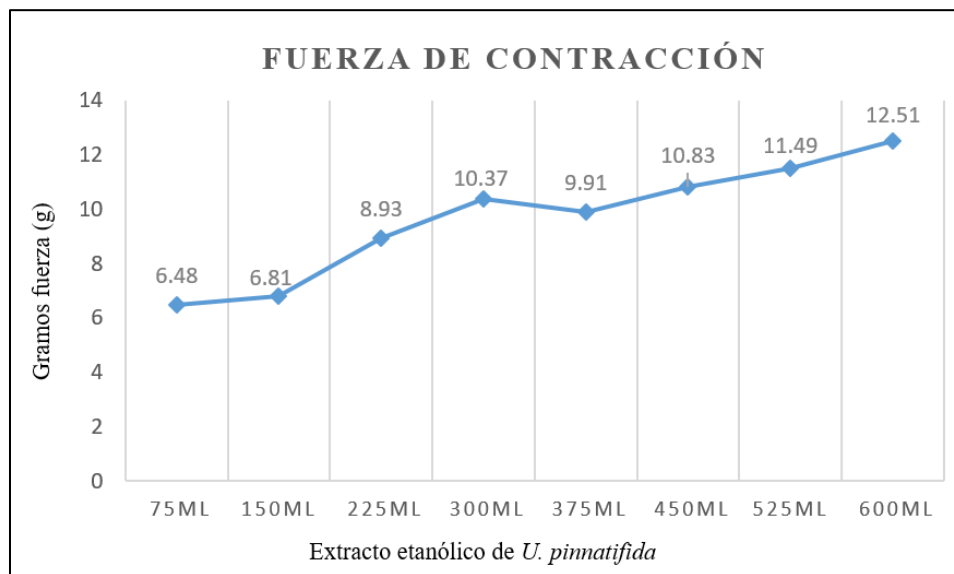


Figura 12. Curva de dosis –respuesta donde se observa el aumento en la fuerza de contracción conforme se incrementa la dosis del extracto etanólico de *U. pinnatifida*.

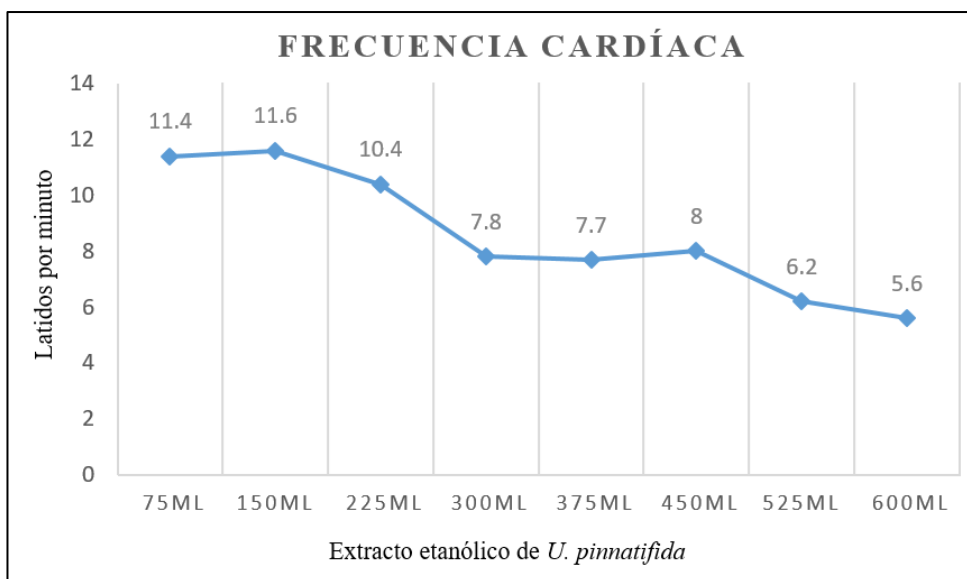


Figura 13. Curva de dosis –respuesta donde se observa una disminución en la frecuencia cardíaca al agregar el extracto etanólico de *U. pinnatifida* al corazón de *T. stultorum*.

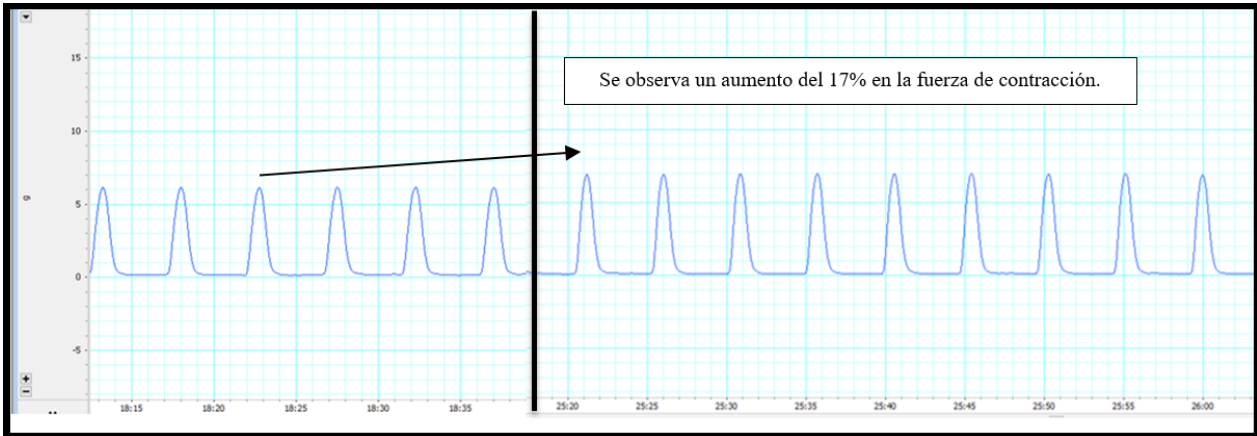


Figura 14. Efecto del extracto etanólico 75 µl sobre el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 6.2 gramos fuerza, aumenta a 7.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 17 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios

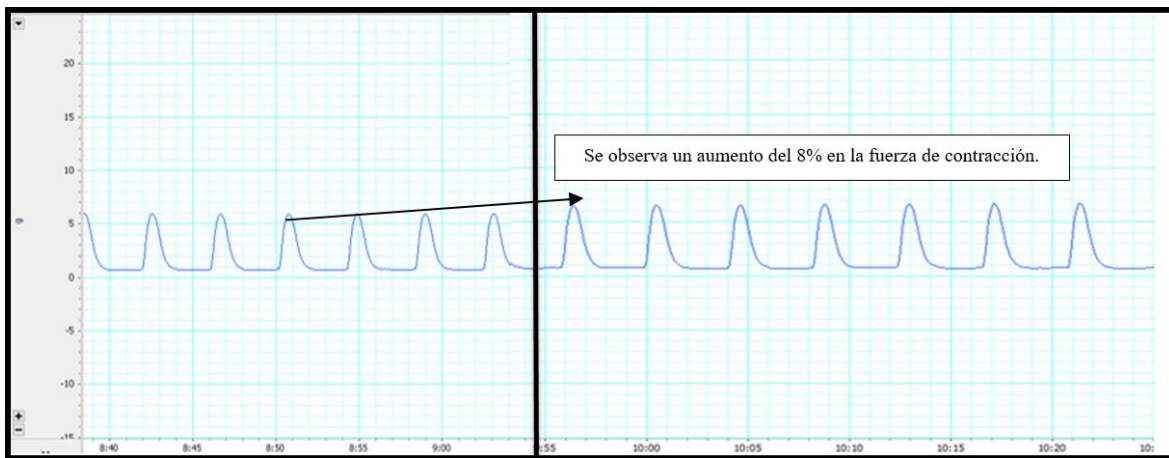


Figura 15. Efecto del extracto etanólico de 150 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 5.8 gramos fuerza, aumenta a 6.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 8 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios.

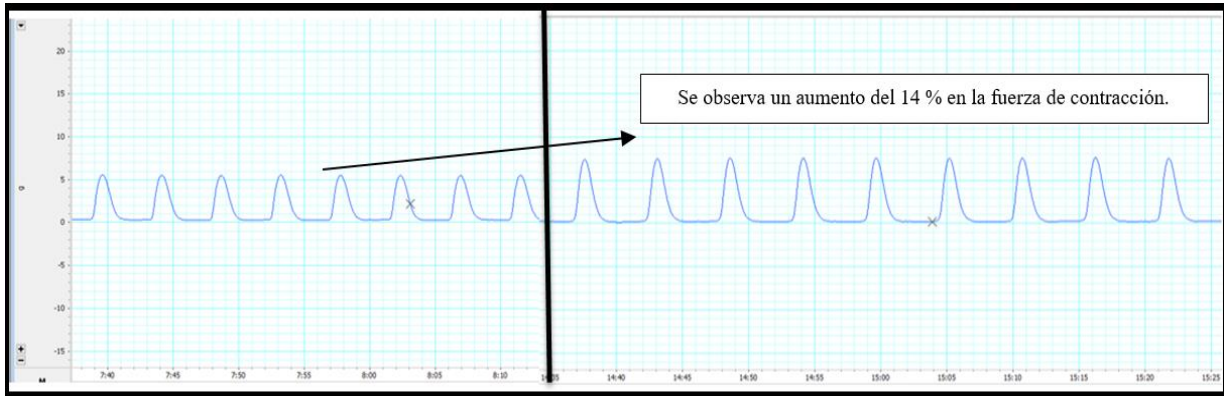


Figura 16. Efecto del extracto etanólico de 225  $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 5.5 gramos fuerza, aumenta a 6.3, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 14 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios

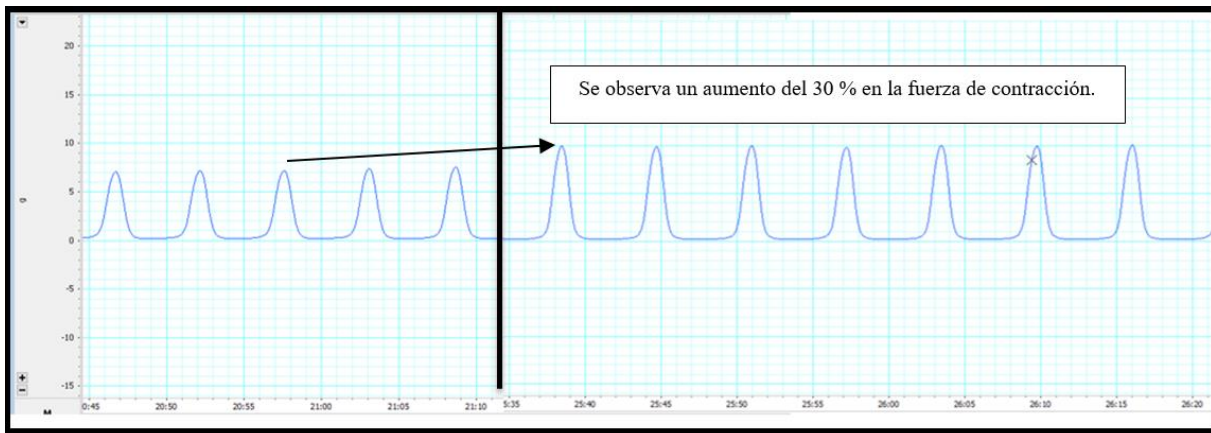


Figura 17. Efecto del extracto etanólico de 300  $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 7.60 gramos fuerza, aumenta a 9.9, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 30 % en la fuerza de contracción, aunque su frecuencia cardíaca permanece sin cambios.

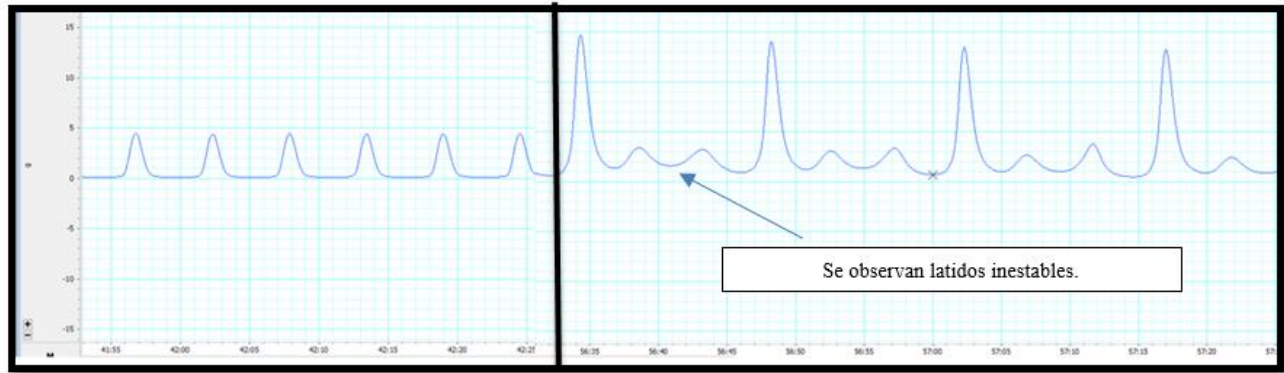


Figura 18. Efecto del extracto etanólico de 375  $\mu$ l sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que este corazón presento latidos inestables, debido a que en algún punto se desprendió del gancho que se conecta al fisiógrafo, pero aun así se observa un aumento en la fuerza de contracción y cambios en su frecuencia cardíaca.

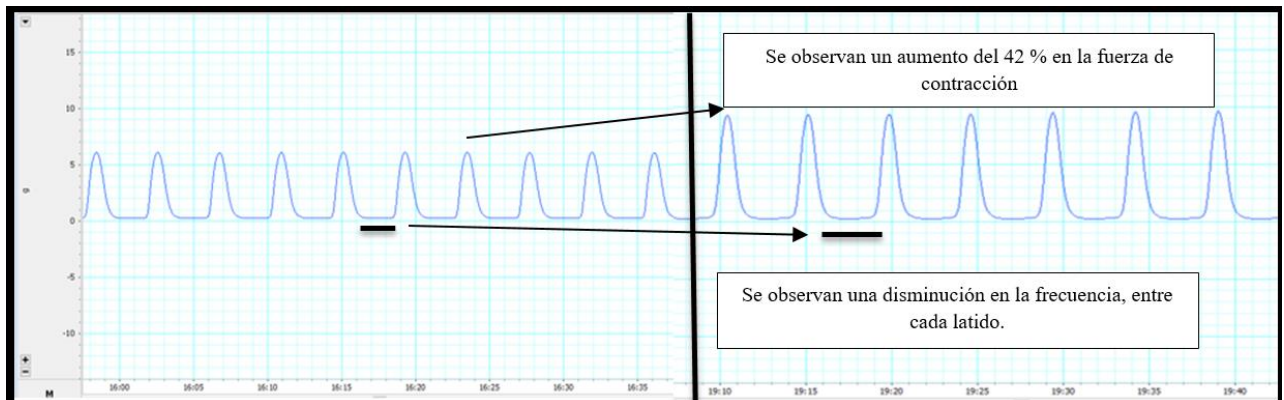


Figura 19. Efecto del extracto etanólico de 450  $\mu$ l sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 6.7 gramos fuerza, aumenta a 9.5, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 42 % en la fuerza de contracción. Con respecto a la frecuencia cardíaca se puede apreciar una leve disminución de esta entre cada latido.

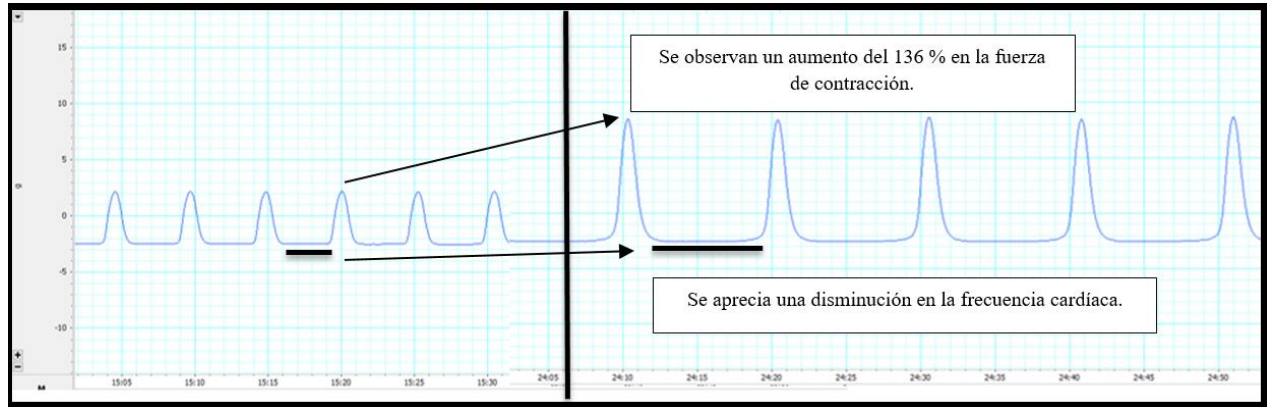


Figura 20. Efecto del extracto etanólico de 525 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 4.7 gramos fuerza, aumenta a 11.1, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 136 % en la fuerza de contracción. La frecuencia cardíaca sufre una disminución evidente entre cada latido.

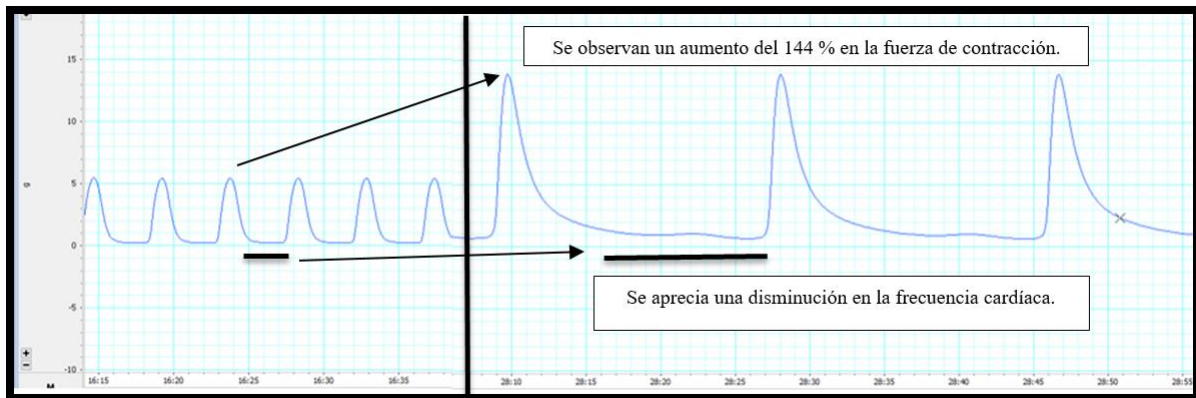


Figura 21. Efecto del extracto etanólico de 600 µl sobre la fuerza de contracción en el corazón de *T. stultorum*, en donde se puede apreciar que de 5.4 gramos fuerza, aumenta a 13.2, lo que se representa en porcentaje como un aumento del 144 % en la fuerza de contracción. La frecuencia cardíaca sufre una notable disminución entre cada latido.

### 7.5 Efecto del extracto etanólico de *Undaria pinnatifida* sobre la Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa.

El extracto etanólico (en todas sus cantidades utilizadas) ocasionó un aumento en la fuerza de contracción sobre el corazón de *T. stultorum*, aunque en la frecuencia cardíaca solo se observan cambios significativos en las cantidades de 525 µl y 600 µl.

### 7.5 Efecto bioquímico del extracto etanólico sobre el corazón de *T. stultorum*.

### 7.6 Efecto del extracto etanólico sobre la Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa del corazón de *T. stultorum*.

Con cada una de las cantidades (75 µl, 150 µl, 225 µl, 300 µl, 375 µl, 450 µl, 525 µl y 600 µl), del extracto etanólico se realizaron ensayos enzimáticos para probar su efecto en la Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa. Los valores de inhibición se muestran en la tabla VII. La tabla VI muestra la actividad enzimática en los corazones de almeja pismo, sin tratamiento. Se puede afirmar con un 99 % de confianza y un  $\alpha=0.01$  que se encontraron diferencias significativas entre los corazones tratados con el extracto etanólico y el control sin extracto.

Entre los valores de los controles, como en los valores de cada cantidad del extracto etanólico, no se encontraron diferencias significativas, esto se puede afirmar con un 99 % de confianza con un  $\alpha= 0.01$ .

Tabla VI. Actividad enzimática de los corazones de almeja pismo (*T. stultorum*) sin tratamiento

Actividad enzimática sin tratamiento ( $\mu\text{g}$ de Pi/mg prot en 60min).					
# Tubo	Control 1(n=3)	Control 2 (n=3)	Control 3 (n=3)	Control 4 (n=3)	Control 5 (n=3)
1	1.30E-05	1.01E-05	1.15E-05	1.00E-05	1.11E-05
2	1.26E-05	9.60E-06	1.18E-05	9.79E-06	9.06E-06
3	1.27E-05	1.01E-05	1.16E-05	1.05E-05	1.02E-05
4	1.30E-05	1.04E-05	1.22E-05	1.05E-05	1.11E-05
5	1.44E-05	1.07E-05	1.17E-05	9.95E-06	1.08E-05

Tabla VII. Actividad enzimática de los corazones de almeja pismo (*T. stultorum*), con el extracto etanólico de *Undaria pinnatifida*.

Actividad enzimática del corazón de <i>T. stultorum</i> con el extracto etanólico ( $\mu\text{g}$ de Pi/mg prot en 60min).								
# Tubo	Concentración 75 $\mu\text{l}$ (n=3)	Concentración 150 $\mu\text{l}$ (n=3)	Concentración 225 $\mu\text{l}$ (n=3)	concentración 300 $\mu\text{l}$ (n=3)	concentración 375 $\mu\text{l}$ (n=3)	Concentración 450 $\mu\text{l}$ (n=3)	Concentració 525 $\mu\text{l}$ (n=3)	Concentración 600 $\mu\text{l}$ (n=3)
1	1.04E-06	9.69E-07	1.01E-06	1.21E-06	9.38E-07	8.52E-07	6.62E-07	8.11E-07
2	9.05E-07	1.05E-06	1.04E-06	1.20E-06	9.89E-07	9.36E-07	7.38E-07	8.84E-07
3	9.19E-07	9.19E-07	6.98E-07	1.19E-06	9.86E-07	9.38E-07	8.14E-07	8.09E-07
4	1.21E-06	1.07E-06	1.23E-06	1.26E-06	1.03E-06	7.63E-07	8.11E-07	7.36E-07
5	9.70E-07	1.26E-06	1.11E-06	1.11E-06	1.56E-05	8.50E-07	7.38E-07	8.10E-07

## 8. DISCUSIÓN

De los tres extractos obtenidos de *Undaria pinnatifida*, solo el extracto etanólico presentó potencial como posible glucósido cardíaco, ya que fue el único que ocasionó un efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo en el corazón de la almeja, por otro lado, los extractos acuosos ocasionaron una disminución en la fuerza de contracción, lo que a su vez nos sugiere la presencia de algún otro compuesto tóxico soluble en agua.

De las 8 cantidades del extracto etanólico adicionadas al corazón perfundido de *T. stultorum* (75  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 225  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 375  $\mu$ l, 450  $\mu$ l, 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l), todas presentaron un ligero incremento en la fuerza de contracción y un pequeño decremento en la frecuencia cardíaca. Sin embargo, solo al adicionar 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l se observó una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia cardíaca, por lo que se puede inferir que el principio activo de interés se encuentra presente en *U. pinnatifida* esto a su vez provoca que el extracto se comporte como un cardiotónico de utilidad; esto es, aumentando la fuerza de contracción y disminuyendo la frecuencia cardíaca. La evidencia observada nos indica que, a menor cantidad de extracto, el efecto causado sobre el corazón de la almeja es menor.

Sabemos que el índice terapéutico (IT) es el limitante para la dosificación de un fármaco, ya que el IT es la relación que existe entre la dosis de un medicamento que produce un efecto terapéutico y la que provoca efecto tóxico:  $IT = \text{Dosis tóxica} / \text{Dosis terapéutica}$ .

Por otra parte, el efecto que causa el fármaco, a su vez, se encuentra ligado a las variables de dosis-respuesta, en las cuales, conforme se va aumentando la dosis del fármaco, también se puede observar un aumento en el efecto tóxico (Salas *et al.*, 2008). Por lo tanto, si un medicamento tiene un margen terapéutico bajo, al aumentar la dosis del fármaco, también se aumentarán los efectos tóxicos. En el presente trabajo ninguna de las cantidades del extracto etanólico presentó reacciones adversas sobre el corazón de *T. stultorum*, por lo que podemos asumir que el extracto etanólico de *Undaria pinnatifida* podría tener potencial como cardiotónico con un buen índice terapéutico.

En cuanto a las curvas de dosis-respuesta que se elaboraron en este trabajo, se observó una respuesta gradual, esto se refiere a que conforme fuimos aumentando la cantidad de extracto etanólico, mayor fue la respuesta del corazón de la almeja respecto a su fuerza de contracción, logrando una disminución en la frecuencia cardíaca.

El extracto etanólico de *Undaria pinnatifida* no causó un efecto tóxico en el corazón de la almeja pismo (*T. stultorum*), a pesar de que de que previamente se ha reportado que el etanol puede ser tóxico a concentraciones mayores al 0.5 % Lumbreras, (2012). La ausencia de efectos nocivos de los componentes activos sobre el corazón, nos ayuda a inferir que el extracto utilizado, a pesar de haber sido obtenido por destilación a reflujo con etanol, fue eliminado total o en gran parte al realizar la rotaevaporación, quedando probablemente un porcentaje menor al 0.5%. Gracias a este hecho logramos obtener una curva de dosis-respuesta amplia, al poder agregar mayores cantidades del extracto, pudiendo observarse claramente el efecto de la dosis a cada aumento de volumen de extracto añadido a la cámara de prueba.

Al comparar los datos obtenidos en la fuerza de contracción del presente trabajo con los reportados por (Guerra-Rivas, 1994) para el ventrículo de *T. stultorum*, se observa que, mientras que en este trabajo se reporta una máxima fuerza de contracción de 12 g, ella reporta una fuerza máxima de 2.67 g con digoxina, lo que representa un porcentaje de aumento en la fuerza de contracción de 449 %.

En lo que concierne a los resultados de los ensayos enzimáticos (Tablas VI y VII) se puede apreciar una tendencia a inhibir a la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPasa al aumentar la cantidad de extracto, encontrando una inhibición significativa de esta enzima a las más altas concentraciones de extracto de *U. pinnatifida* probadas. Juntos, los resultados sobre la bioquímica del corazón y las observaciones previamente descritas (efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo), sugieren que el mecanismo de acción del extracto es similar al de los glucósidos cardíacos administrados actualmente para el tratamiento de arritmias, como la digoxina. Por lo anterior, podemos concluir que los componentes activos presentes en *U. pinnatifida* que ocasionan inotropía positiva, cronotropía negativa e inhibición de la bomba de sodio y potasio sobre el corazón de *T. stultorum* pueden ser considerados de manera preliminar como glucósidos cardiotónicos.

## 9. CONCLUSIONES

- 1) El extracto etanólico de *U. pinnatidifida*, en adiciones de 75  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 225  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 375  $\mu$ l, 450  $\mu$ l, 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l, ocasionaron efecto inotrópico positivo sobre el corazón de la almeja *T. stultorum*.
- 2) El extracto etanólico de *U. pinnatidifida*, en adiciones de 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l, ocasionó una disminución significativa en la frecuencia cardíaca de la almeja *T. stultorum*.
- 3) El extracto etanólico de *U. pinnatidifida*, tiene un efecto gradual en el corazón de la almeja, pues al aumentar la dosis, aumenta la fuerza de contracción y su frecuencia cardíaca disminuye.
- 4) El extracto etanólico de *U. pinnatidifida* ocasiona inhibición significativa sobre la enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPasa en adiciones de 75  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 225  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 375  $\mu$ l, 450  $\mu$ l, 525  $\mu$ l y 600  $\mu$ l
- 5) *Undaria pinnatidifida*, tiene potencial como fuente de glucósidos cardíacos novedosos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, S. L., Paixao, N., Ferreira, L. G., Santos, F. R., Neves, L. D., Oliveira, G. C., . . . Villar, J. A. (2015). gamma-Benzylidene digoxin derivatives synthesis and molecular modeling: Evaluation of anticancer and the Na,K-ATPase activity effect. *Bioorg Med Chem*, 23(15), 4397-4404. doi: 10.1016/j.bmc.2015.06.028
- Borroto, R. (2009). Fármacos utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. In C. Medicas (Ed.), *Farmacología Procesos de Atención en Enfermería* (pp. 193-212). La Habana- Cuba. Retrieved from <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---oenfermeria-0enfermeria-00-0--0dc.Date-10-0prompt--0-0---0prompt-10---4--0---4--0-1l-50-10-ca-50-1bout--11-am-50--0-20-about-00-0-10-0-1-00-0-0-11-1-1gbk-00&a=d&cl=CL1&d=HASHc011eae1caa185f67fd5cf.6.1>.
- Calderún-Vélez, J. C., & Figueroa-Gordon, L. C. (2009). El acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomédica*. doi: 10.1590/s0120-41572009000100017
- Caulier, G., Flammang, P., Rakotorisoa, P., & Gerbaux, P. (2013). Preservation of the bioactive saponins of *Holothuria scabra* through the processing of trepang. *Cah. Biol. Mar.* (2013) 54: 685-690.
- Cuellar Roheri, M. (1991). *Utilización de la almeja pismo Tivela stultorum (Mawe 1823) como un organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos. Tesis de licenciatura.* Facultad de ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B.C.
- Duan, L. M., Yu, H. Y., Li, Y. L., & Jia, C. J. (2015). Design and discovery of 2-(4-(1H-tetrazol-5-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-4-(4-phenyl)thiazole derivatives as cardiotonic agents via inhibition of PDE3. *Bioorg Med Chem*, 23(18), 6111-6117. doi: 10.1016/j.bmc.2015.08.002
- Duray, P. H., Hatfill, S. J., & Pellis, N. R. (1990). Venom Peptides as Human Pharmaceuticals. *SCIENCE*.
- Fawaz Alzaid, V. B. P., Victor R. Preedy. (2014). Cardiovascular Disease in Aging and the Role of Oxidative Stress. *Elsevier*, 23-28. doi: 10.1016/B978-0-12-405933-7.00003-2
- Guerra-Rivas, G. (1994). *Evaluación experimental del uso del corazón de almeja pismo (Tivela stultorum) como modelo biológico en Farmacología Marina. Tesis de Maestría.* Facultad de Ciencias Marinas. UABC. Ensenda. B.C.
- Guyton, A. (1987). *Human physiology and mechanisms of disease* (fourth edition ed.). Washington.
- Heasley, B. (2012). Chemical synthesis of the cardiotonic steroid glycosides and related natural products *Chemistry*. Chimestry a European Journal, (18) 3092-3120.
- Konrad, L., Dietze, R., Kirch, U., Kirch, H., Eva, A., & Scheiner-Bobis, G. (2011). Cardiotonic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertoli cells via the alpha4 isoform of the sodium pump. *Biochim Biophys Acta*, 1813(12), 2118-2124. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.012
- Lufrano, P., Starita, S., & Baldini, O. (1982). Actividad cardiotónica de las semillas de Mandevilla pentlandiana (A. DC.) Woodson. *Actividad cardiotónica de las semillas de Mandevilla pentlandiana (A. DC.) Woodson*.
- Lumbreras, H. (2012). *Caracterización de compuestos cardiotónicos del ofiuroideo Ophiderma panamense Lütken, 1859 y validación del corazón de Mytilus californianus como métodos de cribado.*, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.
- Monte, A., Yaquis, A., & Valdés, Y. (2001). Reformulación de digoxina 250 µg/mL inyectable para la producción nacional. *Revista Cubana de Farmacia*, 35(2), 85-89.

- Ortiz, P. L., Valdés, X. S., Rivera, B. F., & Pérez, E. R. (2003). Homeostasis de calcio y función cardiovascular. Implicaciones Anestésicas. *Instituto Nacional de Cardiología*, 26, 87-100.
- Peteiro, C., Sánchez, N., & Martínez, B. (2016). Mariculture of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* and the native kelp *Saccharina latissima* along the Atlantic coast of Southern Europe: An overview. *Algal Research*, 15, 9-23. doi: 10.1016/j.algal.2016.01.012
- Peteiro, L. G., Filgueira, R., & Fernandez-Resendiz, M. J. (2003). Anatomía funcional de moluscos bivalvos. Retrieved 17/06/2016, 2016, from [http://digital.csic.es/bitstream/10261/116192/1/moluscos\\_2.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/116192/1/moluscos_2.pdf)
- Prabhasankar, P., Ganesan, P., Bhaskar, N., Hirose, A., Stephen, N., Gowda, L. R., . . . Miyashita, K. (2009). Edible Japanese seaweed, wakame (*Undaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta: Chemical, functional and structural evaluation. *Food Chemistry*, 115(2), 501-508. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.047
- Rafiquzzaman, S. M., Kim, E. Y., Kim, Y. R., Nam, T. J., & Kong, I. S. (2013). Antioxidant activity of glycoprotein purified from *Undaria pinnatifida* measured by an in vitro digestion model. *Int J Biol Macromol*, 62, 265-272. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.009
- Randall, D., & Burggren, K. (2002). Eckert Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations. . *W. H. Freeman and Company*, 736.
- Salas, E., Grau, S., Mateu-de Antonio, J., & Pellicer, R. (2008). Robotización de la farmacia comunitaria aplicada a la farmacia hospitalaria: un nuevo reto. *Farmacia Hospitalaria*, 32(2), 132-133. doi: 10.1016/s1130-6343(08)72829-0
- Salud, S. d. (2014). Retrieved 10/04/15, 2015, from <http://portal.salud.gob.mx/>
- Scheuer, P. J. (1988). Bioorganic Marine Chemistry. *Bioorganic Marine Chemistry*, 2. doi: 10.1007/978-3-642-48346-2
- Schmidt, T., & Kjeldsen, k. (1998). Human myocardial Na,KATPase quantification regulation and relation to Ca. *Cardiovasc Res.*, 37, 335-345.
- Steneck, R. S., Graham, M. H., Bourque, B. J., Corbett, D., Erlandson, J. M., Estes, J. A., & Tegner, M. J. (2003). Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental Conservation*, 29(04). doi: 10.1017/s0376892902000322
- Van Dyck, S., Gerbaux, P., & Flammang, P. (2009). Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 152(2), 124-134. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.10.011
- Withering, W. (1785). An account of the foxglove, and some of its medical uses. *An account of the foxglove, and some of its medical uses*.
- Yatime, L., Laursen, M., Morth, J. P., Esmann, M., Nissen, P., & Fedosova, N. U. (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Struct Biol*, 174(2), 296-306. doi: 10.1016/j.jsb.2010.12.004
- Zeino, M., Brenk, R., Gruber, L., Zehl, M., Urban, E., Kopp, B., & Efferth, T. (2015). Cytotoxicity of cardiotonic steroids in sensitive and multidrug-resistant leukemia cells and the link with Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 150, 97-111. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.03.008