

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**Caracterización de compuestos cardiotónicos del
Ofiuroideo *Ophioderma panamense* Lütken, 1859 y
validación del corazón de
Mytilus californianus como método de cribado.**

T E S I S

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

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

PRESENTA

HOMERO LUMBRERAS MARTÍNEZ.

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO DEL 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización de compuestos cardiotónicos del
Ofiuroideo *Ophioderma panamense* Lütken, 1859 y
validación del corazón de
Mytilus californianus como método de cribado.**

T E S I S

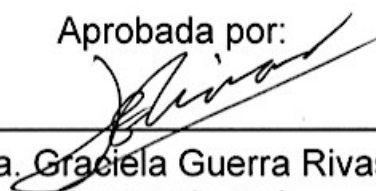
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

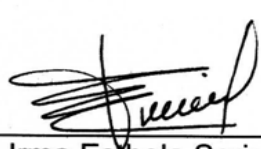
PRESENTA

HOMERO LUMBRERAS MARTÍNEZ

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Director de tesis



Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Co-Directora de tesis



M.C. Albino Muñoz Barbosa
Sinodal

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico con mucho amor a mis padres, que siempre me han apoyado en mis decisiones, que siempre han tenido palabras de aliento para mí, que siempre creyeron en que podía lograr mis metas y nunca dejaron que desistiera aun en los momentos más difíciles; este logro es de ustedes y para ustedes, los amo.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la vida y permitirme cumplir una meta más; a mis hermanos por su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional.

*Especialmente agradezco a mi niña hermosa **Marísela Rodríguez Méndez**, sin ti no hubiese podido hacer realidad este sueño y culminar con éxito este trabajo, no me alcanzan las palabras para expresarte mi profunda gratitud, mil gracias por todo tu amor, tu comprensión y paciencia con este niño berrinchudo. Mi niña hermosa, este éxito lo comparto contigo, te Amo.*

*A la M.C. **Eunice Vanesa Torres Delgado** por tenderme la mano cuando llegue a esta hermosa ciudad a iniciar este sueño que hoy culmina, gracias Vane por ofrecirme tu casa cuando no tuve a donde llegar y por tus vales cuando aún no tenía beca, y gracias también por tus buenos consejos durante todo este tiempo.*

*Independientemente de haber sido mis co-directoras de tesis, doy gracias a las doctoras **Graciela Guerra Rivas** e **Irma E. Soría***

Mercado por apoyarme durante el tiempo que fui su alumno y tesista, por ser guías y consejeras en mi preparación profesional. Dra. Irma gracias por esos postres tan ricos que hace y que amablemente nos invitaba; Dra. Graciela gracias por su confianza al abrirme las puertas de su casa.

A la Oceanóloga Yulízet Sánchez García y a la M.C. Cynthía López Montoya, compañeras de laboratorio que aportaron su granito de arena para que este trabajo pudiera ser concluido, además de ofrecerme una hermosa amistad que conservare hasta que dios me lo permita.

No paso por alto a todos mis compañeros de la maestría, gracias por ofrecerme su amistad desde que juntos iniciamos este posgrado, les deseo éxito a todos.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca económica que me permitió cursar la maestría durante estos dos años.

RESUMEN

En México las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte. Uno de los problemas más conocidos debido a su alta incidencia es la insuficiencia cardíaca, que se caracteriza por una disminución en la fuerza de contracción del corazón. Para controlar este padecimiento se usan fármacos, entre los que se encuentran los digitálicos. Estos compuestos, también conocidos como glucósidos cardiotónicos, han sido por mucho tiempo la base para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Desafortunadamente, para estas sustancias se han registrado efectos tóxicos severos sobre el corazón, sistema nervioso y gastrointestinal en algunos tratamientos. Los ofiúridos se caracterizan por producir compuestos similares a los glucósidos cardiotónicos por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento y elucidación estructural de compuestos presentes en el ofiúrido *Ophioderma panamense* Lütken, 1859 y la determinación de su actividad cardiotónica empleando como modelo biológico el corazón de *Mytilus californianus* como método de cribado validado mediante curvas dosis-respuesta y digoxina como testigo. De 10 concentraciones probadas, 5 ocasionaron cambios significativos sobre la fuerza de contracción y todas tuvieron efecto sobre la frecuencia cardíaca. Se obtuvieron 9 fracciones del extracto crudo, de las cuales 4 mostraron efectos cardiotónicos, siendo la obtenida con metanol la que presentó el mayor aumento en la fuerza de contracción y la mayor disminución en la frecuencia cardíaca sin efectos tóxicos, por lo cual se escogió para las

siguientes pruebas. De las fracciones purificadas se obtuvieron compuestos esteroideos que se analizaron mediante Espectroscopia de IR y RMN en 1 y 2 dimensiones. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el corazón del mejillón es apto para ser usado como modelo biológico en la bioprospección de actividad cardiotónica; y que los ofiúrido poseen compuestos químicos con actividad cardiotónica.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos particulares	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1. Diseño experimental.....	18
5.2. Área de colecta	20
5.2.1. Colecta de organismos	21
5.3. Validación del corazón de <i>M. Californianus</i> como modelo biológico y aplicación para la evaluación de actividad cardiotónica en extractos.....	21
5.3.1. Efecto fisiológico de la digoxina sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	22
5.3.2. Evaluación del efecto del excipiente de Lanoxin® sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	22
5.3.3. Obtención de curvas de dosis-respuesta.....	23
5.3.4. Evaluación de la actividad de extractos y fracciones obtenidas de <i>Ophioderma panamense</i>	23
5.4. Obtención del extracto crudo de ofiúridos	24
5.4.1. Purificación de los compuestos activos	24

5.5. Determinación de la estructura química	25
5.6. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Validación del corazón de <i>M. californianus</i> como modelo biológico para la evaluación de agentes cardiotónicos	27
6.1.1. Biometría del corazón de <i>M. californianus</i>	27
6.1.2. Efecto del etanol sobre el corazón del <i>M. californianus</i>	27
6.1.3. Efecto de la digoxina sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	30
6.2. Evaluación de la actividad cardiotónica de extractos crudos de <i>Ophioderma panamense</i> sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	40
6.3. Determinación de la estructura química	46
6.3.1. Espectroscopía de infrarrojo	46
6.3.2. Espectrometría de masas	47
6.3.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear protónica (^1H RMN)	48
6.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece (^{13}C RMN)	49
6.3.5. Correlación espectroscópica de RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY ..	49
6.3.6. Correlación de protones y carbonos mediante espectroscopía de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC	50
6.3.7. Correlación de protones a carbonos mediante espectroscopía de RMN bidimensional ^1H a ^{13}C HMBC	50
7. DISCUSION	59

8. CONCLUSIONES	70
9. BIBLIOGRAFIA	72

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Parámetros de <i>M. californianus</i> ; los valores corresponden a un promedio de 63 organismos sin la adición de ningún compuesto.....	27
Tabla II. Efectos del etanol a 0.5 % sobre la fuerza de contracción. Cada par de valores de fuerza de contracción (antes y después) representa un corazón analizado.	29
Tabla III. Efectos del etanol a 0.5 % sobre la frecuencia cardíaca. Cada par de valores de fuerza de contracción (antes y después) representa un corazón analizado.	29
Tabla IV. Efecto de la digoxina a 0.2 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.0425 ± 0.017 g.....	31
Tabla V. Efecto de la digoxina a 0.4 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0408 \pm 4.6\text{e-}3$ g.....	31
Tabla VI. Efecto de la digoxina a 0.6 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.0405 ± 0.0129 g.....	31
Tabla VII. Efecto de la digoxina a 0.9 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.031 \pm 6.488\text{e-}3$ g.....	31
Tabla VIII. Efecto de la digoxina a 1.2 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0391 \pm 4.625\text{e-}3$ g.....	32
Tabla IX. Efecto de la digoxina a 1.6 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.039 ± 0.011 g.....	32
Tabla X. Efecto de la digoxina a 2.0 μM sobre la fuerza de contracción. n=6,	

peso promedio del corazón $0.0342 \pm 7.978e-3$ g.....	32
Tabla XI. Efecto de la digoxina a $2.5 \mu\text{M}$ sobre la fuerza de contracción. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0334 \pm 7.007e-3$ g.....	32
Tabla XII. Efecto de la digoxina a $3.0 \mu\text{M}$ sobre la fuerza de contracción. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0349 \pm 3.521e-3$ g.....	33
Tabla XIII. Efecto de la digoxina a $4.0 \mu\text{M}$ sobre la fuerza de contracción. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0351 \pm 5.477e-3$ g.....	33
Tabla XIV. Porcentaje de aumento por concentración de digoxina probada. Los valores se obtuvieron de la diferencia de cada corazón perfundido sin y con digoxina. Se tomaron en cuenta valores significativos y no significativos.....	33
Tabla XV. Efecto de la digoxina a $0.2 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón 0.0425 ± 0.017 g.....	35
Tabla XVI. Efecto de la digoxina a $0.4 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0408 \pm 4.6e-3$ g.....	35
Tabla XVII. Efecto de la digoxina a $0.6 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón 0.0405 ± 0.0129 g.....	36
Tabla XVIII. Efecto de la digoxina a $0.9 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.031 \pm 6.488e-3$ g.....	36
Tabla XIX. Efecto de la digoxina a $1.2 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0391 \pm 4.625e-3$ g.....	36
Tabla XX. Efecto de la digoxina a $1.6 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón 0.039 ± 0.011 g.....	36
Tabla XXI. Efecto de la digoxina a $2.0 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$,	

peso promedio del corazón $0.0342 \pm 7.978e-3$ g.....	37
Tabla XXII. Efecto de la digoxina a $2.5 \mu\text{M}$	37
Tabla XXIII. Efecto de la digoxina a $3.0 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0349 \pm 3.521e-3$ g.....	37
Tabla XXIV. Efecto de la digoxina a $4.0 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0351 \pm 5.477e-3$ g.....	37
Tabla XXV. Porcentaje de disminución por concentración. Los valores se obtuvieron de la diferencia de cada corazón per fundido sin y con digoxina. Se tomaron en cuenta valores significativos y no significativos.	38
Tabla XXVI. Datos obtenidos del bioensayo de cada fracción que presentó actividad cardiotónica. Se muestran las concentraciones que fueron necesarias para obtener el efecto señalado. De la fracción 4 se muestran los valores obtenidos con el volumen total de la solución preparada. Los valores entre paréntesis muestran el efecto en la fuerza de contracción y de frecuencia cardíaca; el signo negativo significa disminución. $n= 1$ organismo por fracción.	41
Tabla XXVII. Porcentaje de cambio por concentración de extracto metanólico (Fracción 4, Tabla 26). Los valores se obtuvieron de la diferencia antes y después del tratamiento con el extracto metanólico.	43
Tabla XXVIII. Efecto del extracto metanólico sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca a una concentración de $150 \mu\text{g/ml}$. Cada par de valores de fuerza de contracción y frecuencia cardiaca (antes y después) representa un	

corazón analizado.....	45
Tabla XXIX. Señales principales del compuesto esteroidal seleccionado.....	47
Tabla XXX. Correlaciones de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C del compuesto obtenido.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura común de los glucósidos cardíacos donde se aprecia la diferencia en los anillos de lactona. La imagen (I) corresponde a un cardenólido con su gama lactona; la imagen (II) corresponde a un bufadienólido con su delta lactona. R: uno o varios azúcares. (Tomado de Lufrano <i>et al</i> , 1982).....	7
Figura 2. Saponinas de estrellas de mar y de holotúridos. R: uno o varios azúcares. (Tomado de Maier, 2007).....	11
Figura 3. Esteroides disulfatados aislados de <i>O. echinata</i> y <i>O. januarii</i> . (Tomado de Maier y Murray, 2006).	12
Figura 4. Diseño experimental para la obtención de compuestos cardiotónicos de organismos de la clase Ofiuridea y validación del corazón de <i>M. californianus</i> como herramienta de cribado.	19
Figura 5. Localización del área de colecta.	20
Figura 6. Actividad ventricular antes y después de la adición de etanol. En las abscisas se registra el tiempo en minutos iniciando en tiempo cero al momento de la adición, que se marca por la línea vertical. La concentración final fue 0.75 %. Se observa la ausencia de latidos después de 10 s.	29
Figura 7. Bloques de latidos irregulares en el corazón del mejillón provocados por el etanol al 1 % en el volumen final. En las abscisas se registra el tiempo en minutos.	30
Figura 8. Curva de dosis-respuesta donde se observa el aumento en la fuerza de contracción conforme se incrementa la dosis de digoxina; se tomó en cuenta	

hasta el máximo porcentaje de aumento.	34
Figura 9. Disminución de la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción después	34
Figura 10. Curva de dosis-respuesta donde se observa como disminuye la frecuencia cardíaca conforme se incrementa la dosis de digoxina; se tomó en cuenta hasta el máximo porcentaje de disminución.....	38
Figura 11. Bloques de latidos con fuerza de contracción uniforme ocasionados por la digoxina a 2.5 μ M y 0.39 % de etanol en volumen final.	39
Figura 12. Ausencia de latidos ocasionados por la digoxina a 3.0 μ M y 0.46 % de etanol en volumen final.	40
Figura 13. Latidos irregulares y de menor fuerza de contracción ocasionados por la digoxina a 4.0 μ M y 0.6 % de etanol en volumen final.	40
Figura 14. Latidos irregulares ocasionados por la fracción obtenida con agua: metanol 2:1. La concentración en el medio es de 18 μ g/ml.	42
Figura 15. Comparación de los latidos del corazón de <i>M. californianus</i> sin extracto y con extracto del fracción obtenida con metanol; se observa un aumento en la fuerza de contracción del 100%. La concentración en el medio es de 545 μ g/ml y 0.47 % de etanol en el volumen final.....	42
Figura 16. Aumento en la fuerza de contracción del corazón de <i>M. californianus</i> ocasionado por el extracto metanólico. La concentración máxima de etanol en el medio fue de 0.47%.	43
Figura 17. Disminución de la frecuencia cardiaca ocasionada por el extracto metanólico. La concentración máxima de etanol en el medio fue de 0.47%.....	44

Figura 18. Promedio de 5 bioensayos a una misma concentración del extracto metanolico donde se observa el efecto sobre la fuerza de contracción y la frecuencia cardíaca.....	45
Figura 19. Espectro de Infrarrojo del compuesto esteroidal con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo.....	46
Figura 20. Espectro de masas del compuesto esteroidal seleccionado.....	48
Figura 21. Espectro de ^1H -RMN donde se muestran las señales comunes que identifican un compuesto esteroidal.....	51
Figura 22. Espectro de ^1H -RMN amplificado donde se muestran las señales comunes que identifican un compuesto esteroidal.	52
Figura 23. Espectro de ^{13}C -RMN amplificado donde se muestran las asignaciones de los carbonos del compuesto esteroidal.....	53
Figura 24. Continuación del espectro de ^{13}C -RMN donde se muestran las asignaciones de los carbonos del compuesto esteroidal.....	54
Figura 25. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^1H COSY del compuesto esteroidal.....	55
Figura 26. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence del compuesto esteroidal.	56
Figura 27. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence del compuesto esteroidal.	57
Figura 28. Estructura propuesta para el esteroil aislado del ofiúrido <i>Ophioderma panamense</i> con actividad cardiotónica.....	69

1. INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades cardiovasculares ocupan la tercera causa de muerte en los pacientes menores de 15 años, y la primera en la población adulta (20-69 años) (Vásquez-Antona, 2007). Las cardiopatías congénitas tienen una contribución significativa para esta estadística, pero cada día más, un estilo de vida poco saludable (mala alimentación, tabaquismo y falta de ejercicio) es responsable de un incremento alarmante de problemas cardiovasculares en la infancia y adolescencia (Rosas-Peralta y Attie, 2007; Vásquez-Antona, 2007).

Quizá el padecimiento más conocido del corazón debido a su alta incidencia, sea la insuficiencia cardíaca, que es una condición en la que el daño estructural difuso de la miofibrilla (necrosis, apoptosis o inflamación) o bien una sobrecarga hemodinámica excesiva, provoca disminución de la fuerza contráctil del corazón (inclusive la fracción de expulsión); y consecuentemente aumentan los volúmenes ventriculares con o sin disminución del gasto cardíaco (Brandt *et al.*, 1993).

Los medicamentos usados para controlar las enfermedades cardíacas se conocen como agentes inotrópicos y actúan aumentando la fuerza de contracción del músculo cardíaco, efecto conocido como inotrópico positivo y algunas veces disminuyendo la frecuencia de latidos o efecto cronotrópico negativo. Los principales grupos de medicamentos inotrópicos son el ión calcio,

las aminas adrenérgicas, los inhibidores de fosfodiesterasas y los digitálicos (Pastelín-Hernández, 2002).

Entre estos fármacos los digitálicos (llamados también glucósidos cardiotónico), han sido la base del tratamiento y los más usados en la insuficiencia cardíaca (Méndez, 1986).

Los mecanismos por los cuales los digitálicos comerciales ejercen su acción son complejos y no se limitan a una sola vía ya que actúan sobre el corazón modificando la actividad mecánica y eléctrica, sobre el músculo liso vascular y sobre el sistema nervioso autónomo. Además del efecto inotrópico, los digitálicos ejercen efectos tóxicos severos sobre el corazón y los sistemas nervioso y gastrointestinal (Del valle-Mondragón *et al.*, 2003; The digitalis investigation group, 1997).

Debido a los efectos tóxicos de los digitálicos, desde hace décadas se buscan alternativas con márgenes terapéuticos más amplios; un nuevo campo que se está explorando como fuente de productos cardioestimuladores, son las toxinas de organismos marinos, entre las cuales se han observado algunas propiedades de interés para el hombre (Miljanich, 1997).

Los organismos marinos están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sinteticen moléculas diferentes a las de las especies terrestres, lo cual podría generar compuestos con actividad farmacológica diferente o con diferente potencia que las de sus contrapartes terrestres. Muchas de las moléculas producidas por los organismos marinos les sirven principalmente como defensa ante depredadores y en ocasiones las usan como mecanismo

para atrapar a sus presas, por lo cual éstas han ido evolucionando a la par que sus presas y depredadores (Bartosz, *et al.*, 2008), lo que las hace muy potentes a bajas concentraciones. Todos estos factores hacen a las moléculas de origen marino de gran utilidad potencial como fármacos para el tratamiento de enfermedades, entre las que se incluyen los problemas cardíacos.

Algunos organismos que se han estado explotando como fuente de compuestos cardiotónicos son las anémonas de mar y equinodermos, principalmente los de la clase Holothuroidea (pepinos de mar) y Asteroidea (estrellas de mar) (Honma y Shiomi, 2005; Iñiguez-Martínez, 1995; Alarcón-Arteaga, 2005).

Aunque estas toxinas son prometedoras, no han sido las ideales para sustituir a los digitálicos, lo que deja abierta la necesidad de buscar opciones más eficaces. En el presente trabajo se plantea la investigación en extractos orgánicos de Ofiúridos de los cuales se han aislado compuestos esteroidales, con diversas actividades farmacológicas (Roccatagliata *et al.*, 1996). Debido a las características estructurales que presentan estos compuestos, similar a la encontrada en la mayoría de los glucósidos cardiotónicos, cabe esperar que puedan tener alguna actividad cardioestimuladora. Lo que hace de los ofiúridos una buena opción, es también su abundancia en las aguas del Pacífico mexicano así como en el Golfo de México, registrándose en alguna zonas, como la clase más abundante de los equinodermos (Caso-Muñoz *et al.*, 1993; Solís-Marín *et al.*, 1997). Uno de los factores que determina la abundancia de estos organismos es la disponibilidad de refugio y protección proporcionados

por el ambiente, prefiriendo zonas rocosas como las encontradas en el Golfo de California (Benítez-Villalobos, 2000; Ríos-Jara *et al.*, 2008), poniendo de manifiesto el potencial biológico de las costas de Baja California para albergar a estos organismos.

Un paso importante para identificar un compuesto cardiotónico, son sus efectos directos sobre el corazón, específicamente, su acción sobre la contractilidad muscular, con el consiguiente cambio en la fuerza de contracción y la frecuencia cardíaca. Generalmente se usan corazones de mamíferos para realizar el cribado, esto por su semejanza al corazón del humano, aunque también ha cobrado importancia la utilización de organismos marinos para este objetivo, especialmente los bivalvos, que han dado buenos resultados en el cribado de compuestos cardiotónicos (Guerra-Rivas, 1994; Alarcón-Arteaga, 2005).

2. ANTECEDENTES

El calcio es el principal elemento en el proceso de acoplamiento entre la excitación y la contracción de las células cardíacas; se le ha utilizado como punto de referencia para valorar la eficacia inotrópica de todos los compuestos capaces de ejercer esta acción; sin embargo la utilidad del efecto inotrópico del calcio en la clínica, se ve limitada entre otras razones, porque sus altas concentraciones plasmáticas, activan a la proteincinasa C intracelular, que tiene un efecto desensibilizador al calcio sobre las proteínas contráctiles (MacGowan *et al.*, 2001).

Las aminos adrenérgicas inician su acción inotrópica al unirse a un receptor tipo beta adrenérgico, unión que estimula la enzima adenililciclase, que es una enzima que actúa sobre el adenosintrifosfato (ATP), para convertirlo en adenosinmonofosfato cíclico (AMPc). Conforme aumentan los niveles de AMPc, se libera una mayor proporción de calcio del sistema de túbulos longitudinales del retículo sarcoplasmático y tiene lugar como respuesta fisiológica, un aumento en la fuerza de contracción del corazón. Además como consecuencia del acoplamiento de la amina con el receptor beta, se abren canales membranales de calcio, que permiten una corriente de entrada de este ión hacia el sistema de acoplamiento de la excitación con la contracción celular cardíaca (Pastelín-Hernández, 2002).

Además del aumento en la fuerza de contracción del corazón, la estimulación de los receptores adrenérgicos produce un aumento importante en

la frecuencia cardíaca, con un componente arritmógeno, un incremento en el consumo de oxígeno y una vasoconstricción generalizada que se opone a la función de bomba del corazón (Pastelín-Hernández, 2002).

Los inhibidores de fosfodiesterasas actúan inhibiendo la enzima fosfodiesterasa III. Esta enzima se encargar de degradar el AMPc hacia 5-AMP, por lo que su inhibición ocasiona que el AMPc sea canalizado hacia la activación de los canales de calcio en lugar de ser hidrolizados a 5-AMP (Pastelín-Hernández, 2002).

Los digitálicos, que tienen un mecanismo de acción no dependiente de AMPc, pertenecen a un grupo de compuestos llamados glucósidos cardiotónicos, los cuales están conformados por una aglicona unida a uno o varios azúcares, responsables de la solubilidad y duración de la acción; el núcleo de la aglicona está formado por un esteroide con un anillo de lactona, siendo éste el responsable de la actividad farmacológica de la molécula y es similar para todos los cardiotónicos (Katzung, 1983).

De acuerdo a la naturaleza de este anillo lactónico, los cardiotónicos naturales pueden dividirse en dos grandes grupos: *cardenólidos* (I) y *bufadienólidos* (II) (Fig. 1). Los cardenólidos presentan una γ lactona α - β insaturada, mientras que los bufadienólidos poseen una lactona de seis miembros con dos dobles enlaces conjugados (Lufrano *et al.*, 1982). Los glucósidos cardiotónicos se encuentran en plantas de familias muy diversas y se les ubica en pequeñas cantidades en semillas, hojas, raíces, corteza, tallos y bulbos (Fieser y Fieser, 1959).

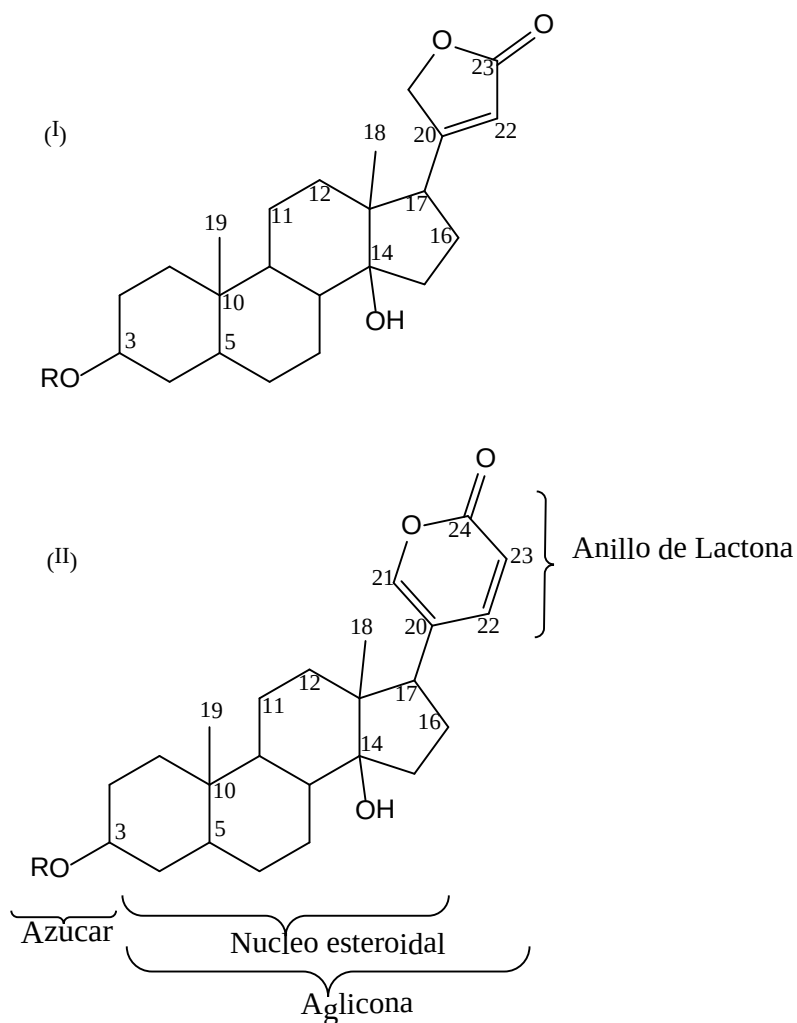


Figura 1. Estructura común de los glucósidos cardíacos donde se aprecia la diferencia en los anillos de lactona. La imagen (I) corresponde a un cardenólido con su gama lactona; la imagen (II) corresponde a un bufadienólido con su delta lactona. R: uno o varios azúcares. (Tomado de Lufrano *et al*, 1982).

Estas moléculas no sólo necesitan de la electronegatividad para generar interacciones fármaco-receptor, y así, generar una respuesta farmacológica óptima, sino que también necesitan de otra propiedad molecular que es la conformación estructural. Esta propiedad depende de las energías

vibracionales, rotacionales y traslacionales siendo estas dos últimas las que modulan la unión al receptor (Wieser y Tsai, 1986; Helm *et al.*, 1985).

Sin embargo, pese a su gran utilidad como fármaco, los digitálicos también causan serios problemas al organismo, llegándose a registrar intoxicaciones por algunos digitálicos como la ouabaína (Ramírez-Ortega *et al.*, 2002).

El efecto inotrópico positivo se ha atribuido principalmente a la inhibición parcial o total de la enzima responsable del transporte activo de sodio y potasio a través de la membrana celular, la adenosín trifosfatasa dependiente de sodio y potasio (ATPasa- Na^+/K^+). La inhibición de esta enzima trae como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de ($[\text{Na}^+]_i$) y una disminución intracelular de ($[\text{K}^+]_i$); el incremento de $[\text{Na}^+]_i$ activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana citoplasmática aumentando por lo tanto el Ca^{2+} intracelular, el cual es almacenado en el retículo sarcoplásmico y liberado con cada potencial de acción para activar el aparato contráctil (Hauptman y Kelly, 1999).

Para el efecto cronotrópico negativo la digoxina actúa mediante la estimulación vagal, retardando los impulsos en el nódulo aurículo-ventricular (AV), por lo tanto aumentando el periodo refractario, y es ese aumento del periodo refractario y no al retardo en la transmisión de impulsos, el que provoca la disminución de la frecuencia cardíaca. Por otro lado, la digoxina tiene una acción inhibitoria sobre el sistema simpático, provocando también de esta manera la disminución de la frecuencia cardíaca (Méndez, 1986).

El mecanismo para el efecto tóxico se atribuye a la sobrecarga de Ca^{2+} y disminución de K^{+} intracelulares por la inhibición persistente de la bomba de $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$, de tal forma que la homeostasis no se puede mantener y sobreviene la degradación celular (Schmidt y Kjeldsen, 1998). Por otra parte, se ha observado fragmentación en el DNA de células tratadas con algunos de estos compuestos y se ha reportado que el desequilibrio electrofisiológico ocasionado por la inhibición de la ATPasa- $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ es detonante de la muerte celular por apoptosis (Ramírez-Ortega *et al.*, 2002).

Aunque hay una enorme cantidad de compuestos cardiotónicos de origen terrestre y de los intentos por sintetizar compuestos menos tóxicos a través de cambios estructurales, como es el caso de la actodigina (Pastelín-Hernández, 2002; Del Valle-Mondragón *et al.*, 2003), los que han cobrado importancia son aquéllos provenientes de organismos marinos ya que son más potentes en concentraciones menores.

Entre los organismos marinos explorados para la búsqueda de sustancias con actividad sobre el corazón, se encuentran las anémonas, estas han sido fuente importante de compuestos peptídicos capaces de ejercer acciones fisiológicas muy específicas sobre su blanco; sus venenos contienen una gran variedad de compuestos activos, incluidas potentes toxinas que afectan los canales de Na^{+} y K^{+} dependientes de voltaje (Retuerto *et al.*, 2007; El-Sherif *et al.*, 1992; Garateix *et al.*, 2000). Debido a esta propiedad, de especies como *Anthopleura elegantissima* y *Anthopleura xantogrammica* se han aislado algunas toxinas capaces de ejercer efectos inotrópico positivo

superior a cardiotónicos comerciales, aunque carentes de efecto cronotrópico negativo (Quinn *et al.*, 1974; Norton *et al.*, 1975). Aunque *A. elegantissima* y *A. xantogrammica* han sido las más estudiadas en cuanto a cardiotónicos, no son las únicas que presentan toxinas con efectos inotrópicos y pese a que no todas tienen la misma potencia, la mayoría presentan actividad hemolítica (Cline y Wolowyk, 1997).

Las toxinas de Equinodermos también han sido muy estudiadas, principalmente las provenientes de las clases Holoturoidea (holoturinas) y Asteroidea (asterosaponinas) (Fig. 2), aunque las de mayor importancia han sido las provenientes de los holoturoideos por ser de mayor potencia, se encuentran en mayor proporción en los organismos productores y son específicas para diferentes grupos taxonómicos de holoturoideos, además de que han mostrado ejercer efectos inotrópicos positivos (Maier, 2007; Gorshkova *et al.*, 1989; Alarcón-Arteaga, 2005). Es de destacar que las asterosaponinas contienen un núcleo esteroidal con un grupo sulfato unido al C-3 y una cadena de oligosacáridos unida al C-6 de la aglicona. Las holoturinas presentan una cadena de oligosacárido unida al C-3 del esqueleto triterpenoidal con grupos sulfato unidos a las unidades de monosacárido (Maier y Murray, 2006).

Además de las características antes mencionadas, las holoturinas comparten con los glucósidos cardiotónicos la capacidad de hemolizar células sanguíneas, cosa que no es deseable en un cardiotónico (Chanley *et al.*, 1959; Pérez- Plascencia, 1991).

Por otro lado, los ofiuros se caracterizan por producir esteroides disulfatados en el C-3 (α) y C-21 con grupos hidroxilo adicionales en los anillos A y C y unión en posición cis de los anillos A/B. Existen reportes de caracterización de varios esteroides sulfatados novedosos de ofiuros del Atlántico Sur (Fig. 3); por ejemplo los aislados de *Ophiocoma echinata* y *Ophioplocus januarii* (D' Auria *et al.*, 1995; Maier y Murray, 2006).

Los esteroides sulfatados han sido registrados en una gran variedad de organismos marinos, principalmente esponjas y equinodermos. Se ha demostrado que estos compuestos tienen un amplio espectro de actividades biológicas como por ejemplo, inducir la liberación de Ca^{++} del retículo sarcoplasmático, poder antibacterial y recientemente actividad antiviral (Fusetani *et al.*, 1981; Kobayashi *et al.*, 1989; McKee *et al.*, 1994).

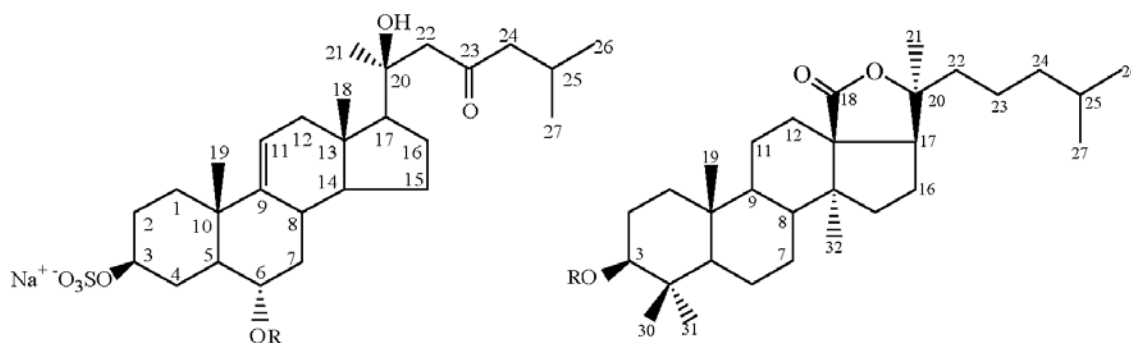


Figura 2. Saponinas de estrellas de mar y de holotúridos. R: uno o varios azúcares. (Tomado de Maier, 2007).

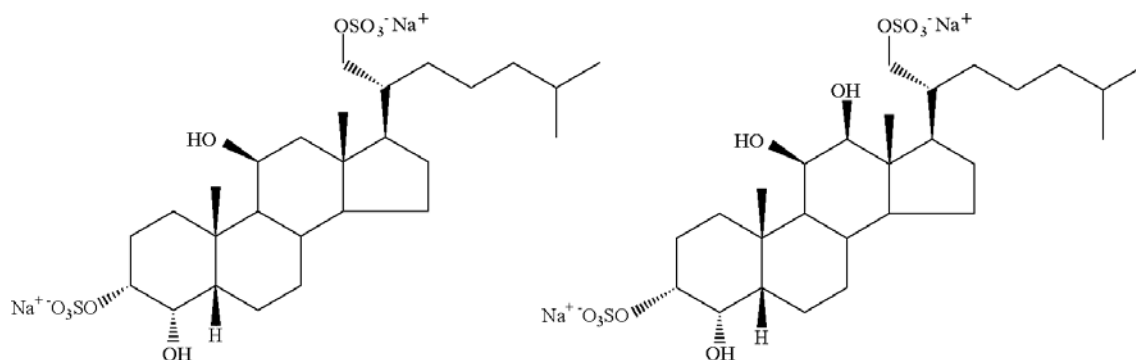


Figura 3. Esteroides disulfatados aislados de *O. echinata* y *O. januarii*. (Tomado de Maier y Murray, 2006).

Los ofiúridos, organismos pertenecientes al Filo Echinodermata, son los que más esteroides sulfatados han aportado y cada vez más se incrementa el interés de estos compuestos desde que se descubrió que poseían actividad antiviral contra el HIV-1 y HIV-2, algunas veces inhibiendo la replicación del ADN (D' Auria *et al.*, 1995; McKee *et al.*, 1994; Roccatagliata *et al.*, 1996).). Algunos de estos compuestos disulfatados también han presentado efectos hemolíticos y citotóxicos (Natasu *et al.*, 1983).

Al igual que los glucósidos cardiotónicos, las asterosaponinas y las holoturinas, en los compuestos sulfatados de los ofiúridos es el esteroide el responsable de la actividad, siendo la posición de los sulfatos lo que en algunas ocasiones determina su potencia y tipo de actividad que presentan (McKee *et al.*, 1994). Esto deja abierta la posibilidad de que sirvan como cardiotónicos eficaces ya que son pocos los estudios que se han realizado en

cuanto a efectos cardioestimulantes por parte de los esteroides sulfatados de Ofiúridos.

Otro factor que alienta a buscar compuestos activos en ofiúridos, en especial, con actividad cardioestimulante, es su gran abundancia. Actualmente existen 7000 especies vivientes de equinodermos, de los cuales más de 2000 corresponden a los ofiuroideos. En México se han registrado 228 especies, 98 encontradas en las aguas del Golfo de México y el mar Caribe y el resto en el Océano Pacífico (Laguarda-Figueras *et al.*, 2009). Esta mayor diversidad de ofiúridos en el Océano Pacífico en parte se debe a que los contaminantes producidos por las actividades humanas han sido menores que en el Golfo de México, además de contar con un alto número de hábitats, lo que hace de Baja California una zona de abundancia de estas especies (Hernández-Herrejón *et al.*, 2008).

Un paso importante para determinar si un compuesto tiene propiedades cardioestimulantes, es realizar pruebas en corazones perfundidos; entre los más usados están los corazones de ratas y cobayos (Norton *et al.*, 1975; Céspedes *et al.*, 1999).

La mayoría de los modelos biológicos para el análisis de cardiotónicos son de mamíferos terrestres (Flores-Pérez y Pérez-Martínez, 2006), aunque los organismos marinos han hecho su aporte de manera satisfactoria, especialmente los bivalvos.

El sistema nervioso de los bivalvos consta principalmente de tres pares de ganglios: el cerebral, el pedal y el visceral (Zaixso, 2003). Kuwasawa y Hill

(1997) estudiando la almeja *Mercenaria mercenaria* encontraron que es el ganglio visceral quien inerva el corazón, este ganglio está conectado con el ganglio cerebral por un conectivo cerebro-visceral, del cual surgen un par nervios cardíacos que penetran bilateralmente las aurículas para ramificarse por toda esta; también, un par de filamentos penetran al ventrículo a través de las válvulas aurículo-ventricular extendiéndose la inervación sobre todo el corazón; además Kuwasawa y Hill (1997) observaron que el corazón de *M. mercenaria* es controlado por nervios colinérgicos que inhiben el potencial de acción, y nervios serotoninérgicos que excitan el miocardio y la válvula A-V; También encontraron que la estimulación de los nervios viscerales que controlan los sifones incurrentes y excurrentes provocan braquicardia o taquicardia. Ya anteriormente se había puesto de manifiesto que la serotonina provocaba un aumento en la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción debido a que este neurotransmisor aumentaba los niveles de AMP cíclico en el corazón de mejillones (Michaelidis *et al*, 1993).

Además de la presencia de nervios cardíacos, otra característica que justifica la utilización de bivalvos para el cribado de cardiotónicos, es que el proceso para la contracción de los músculos, es el mismo que el de los mamíferos, además de que poseen el mismo receptor para los digitálicos que es la Na(+) K(+)-ATPasa (Johson y Twarog, 1959., Butler y Siegman, 2010).

Entre los bivalvos destaca el modelo ya validado de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Guerra- Rivas, 1994). Desafortunadamente la sobreexplotación de esta especie impide su uso como método de cribado,

siendo necesario buscar nuevos modelos con características biológicas similares. Una opción viable es el mejillón *Mytilus californianus* pues se ha encontrado que algunos extractos de pepinos y de anémonas de mar han mostrado efectos inotrópicos sobre éste, además de inhibir la $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, aunque este modelo biológico no está validado aún (Alarcón- Arteaga, 2005).

Los esteroides disulfatados de los ofiúridos poseen una amplia variedad de propiedades biológicas entre las que se encuentran algunas que también poseen los cardiotónicos ya conocidos, como la estimulación de liberación de Ca^{++} , elemento importante en la contracción muscular. Aunque la mayoría de los estudios están relacionados al efecto antivírico, es necesario realizar estudios de propiedades cardioestimulantes aprovechando la gran cantidad de propiedades que presentan estos compuestos sulfatados, utilizando como método de cribado el corazón del mejillón *M. californianus*.

3. HIPÓTESIS

- El corazón de *Mytilus californianus* responde con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo cuando es expuesto a la acción de un digitálico y a la de extractos provenientes de ofiúridos de las costas de Baja California.
- El compuesto con actividad cardiotónica obtenido de un ofiuroideo será de tipo esteroidal, ya que este tipo de moléculas son los responsables de diversas propiedades farmacológicas en un organismo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Llevar a cabo el aislamiento y caracterización química de un compuesto con actividad cardiotónica a partir del ofiúrido *Ophioderma panamense* utilizando como sistema de prueba el corazón del mejillón *Mytilus californianus*

4.2. Objetivos particulares

- Determinar los efectos que el digitálico digoxina tiene sobre el corazón de *M. californianus* elaborando una curva de dosis-respuesta.
- Validar el corazón del mejillón *Mytilus californianus* como herramienta de cribado para compuestos cardiotónicos.
- Aislar compuestos a partir del ofiúrido *Ophioderma panamense* y probar su actividad cardiotónica en corazón perfundido de *Mitylus californianus*.
- Llevar a cabo la caracterización química de un compuesto con actividad cardiotónica.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño experimental

La validación del corazón de *M. californianus* como modelo de cribado de compuestos cardiotónicos se realizó mediante bioensayos de actividad en corazón perfundido, obteniendo curvas de dosis-respuesta en donde se registraron los cambios en la fuerza y frecuencia de contracción provocados por digoxina comercial, Lanoxin, M. R. Una vez validado el corazón, se evaluaron diferentes extractos obtenidos de ofiúridos. Los extractos se obtuvieron con diferentes solventes orgánicos y se separaron mediante técnicas cromatográficas. Cada fracción obtenida fue evaluada mediante un bioensayo en el que se utilizó el corazón perfundido de *M. californianus*. Se seleccionó el extracto más activo y se purificó mediante TLC y HPLC. Finalmente, para determinar la estructura química del compuesto con efectos cardioestimulantes purificado a partir de *Ophioderma panamense* fue sometido a análisis por Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear e Infrarrojo. En la figura 4 se muestra el diagrama de bloques que representa la metodología utilizada en el presente trabajo.

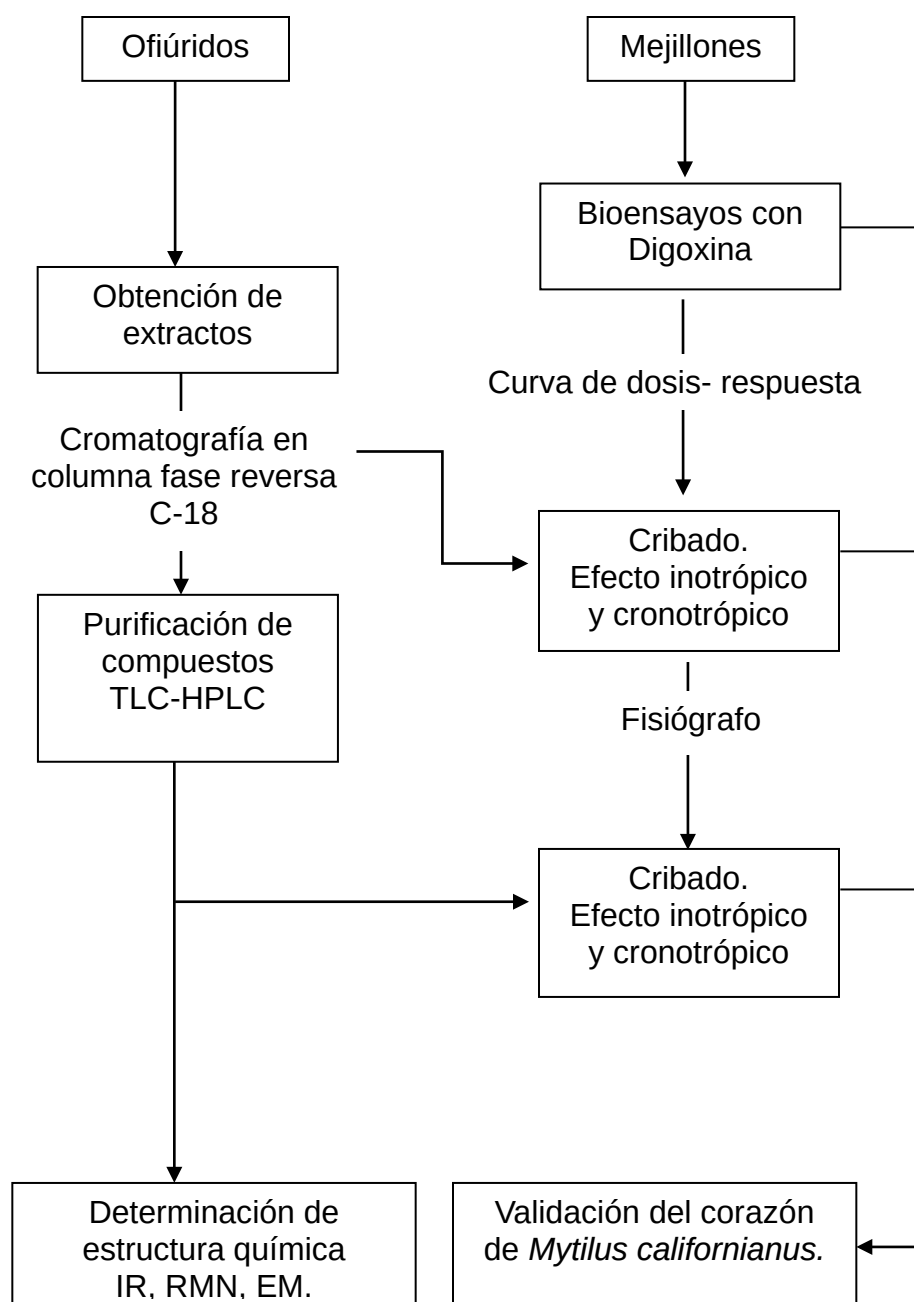


Figura 4. Diseño experimental para la obtención de compuestos cardiotónicos de organismos de la clase Ofiuridea y validación del corazón de *M. californianus* como herramienta de cribado.

5.2. Área de colecta

Los mejillones fueron colectados en la playa de la Punta San Isidro, que se localiza en el poblado Eréndira, situado en el Municipio de Ensenada, B. C. con coordenadas $31^{\circ}17'05.10''$ N y $116^{\circ}23'59.68''$ O (Fig. 5); el ejido se encuentra a 100 Km al sur de la ciudad de Ensenada.

Los Ofiúridos fueron colectados en la ciudad de Ensenada, B. C., detrás de los terrenos de la Universidad Autónoma de Baja California; las coordenadas del sitio de colecta son $31^{\circ}51'42.36''$ N y $116^{\circ}40'05.70''$ O.



Figura 5. Localización del área de colecta.

5.2.1. Colecta de organismos

Los ofiúridos y mejillones fueron colectados en el mes de mayo del 2010. Para el caso de los mejillones, sólo se escogieron aquéllos con una medida de 8 (± 0.5) cm. Éstos fueron mantenidos en peceras con aireación, recambio de agua diaria y temperatura controlada de 17°C. Se dejaron en acondicionamiento por 2 semanas, alimentados con pasta comercial de microalgas (Isochrysis 1800®, Reed mariculture), hasta su posterior uso en los bioensayos.

Los ofiúridos fueron congelados hasta su posterior uso. La identificación de los organismos se realizó con el apoyo de guías taxonómicas en base en los trabajos de Hernández- Herrejón *et al.*, (2008) así como de otros trabajos con ayuda visual.

5.3. Validación del corazón de *M. Californianus* como modelo biológico y aplicación para la evaluación de actividad cardiotónica en extractos

La evaluación del efecto de la digoxina sobre el corazón de *M. californianus*, se llevó a cabo realizando bioensayos en corazón perfundido del organismo para obtener curvas de dosis-respuesta mediante el método de Guerra-Rivas (1994). Básicamente, el método consiste en la realización de bioensayos en los que se mide el cambio en la fuerza y frecuencia de contracción del ventrículo después del tratamiento con el compuesto.

5.3.1. Efecto fisiológico de la digoxina sobre el corazón de *M. californianus*

El corazón extirpado del mejillón se colocó en una cámara de prueba, un extremo del corazón se sujetó a un transductor de fuerza MLT050/D conectado a un amplificador PowerLab 10T. Se registraron la fuerza y frecuencia de contracción y una vez alcanzado un registro constante, se adicionó la digoxina en concentraciones crecientes probando un intervalo de 0.2 a 4.0 μM .

Para cada registro (con y sin tratamiento) se midió la fuerza de contracción en bloques de latidos. Se definió la 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 cardíaca, definida como el número de latidos por minuto. Con estos datos se calculó el porcentaje de cambio provocado por el tratamiento para la fuerza y la frecuencia siguiendo la metodología de Guerra- Rivas (1994), que considera el registro inicial como el 100 % y con esta base se calcula el porcentaje de cambio. Los datos de fuerza de contracción y frecuencia cardíaca sin tratamiento fueron utilizados para establecer los datos de biometría del corazón de *M. Californianus*.

5.3.2. Evaluación del efecto del excipiente de Lanoxin® sobre el corazón de *M. californianus*

Debido a la presencia de etanol en la digoxina comercial (Lanoxin®), se realizaron pruebas para determinar el efecto de éste sobre el corazón de *M. californianus*. El método básicamente consistió en realizar bioensayos como los

descritos en la sección 5.3.1. pero aplicando al corazón concentraciones crecientes de etanol. Se probó el intervalo de 0.5 % hasta 1% de etanol.

5.3.3. Obtención de curvas de dosis-respuesta

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

Curvas dosis-frecuencia cardíaca: el efecto ocasionado sobre la frecuencia de latido del corazón del mejillón por cada concentración probada, fue graficado colocando las concentraciones del material de prueba sobre las abscisas y la frecuencia cardíaca en las ordenadas.

5.3.4. Evaluación de la actividad de extractos y fracciones obtenidas de *Ophioderma panamense*

Cada fracción o extracto a probar se disolvió en etanol y se utilizó como tratamiento sobre el corazón perfundido siguiendo la metodología descrita en la sección 5.3.1., usando la fracción a evaluar en lugar de digoxina. Para cada extracto o fracción se probaron concentraciones crecientes de 5 a 545 µg/ml.

5.4. Obtención del extracto crudo de ofiúridos

Las muestras congeladas fueron cortadas en trozos pequeños y se extrajeron tres veces con metanol (MeOH, 1 litro por 1 kg de muestra). El solvente se eliminó mediante destilación a presión reducida en un rotaevaporador marca Heidolph Collegiate modelo WBEco y el residuo seco se disolvió en metanol y se extrajo con n-hexano. La fase acuosa se extrajo con n-butanol y nuevamente se llevó a sequedad para obtener el extracto crudo (ApSimon *et al.*, 1972). El extracto crudo fue evaluado en su capacidad para actuar como agente inotrópico positivo.

5.4.1. Purificación de los compuestos activos

El extracto orgánico obtenido en la sección anterior fue separado en nueve fracciones con diferente mezcla de solventes mediante cromatografía en columna con gel de sílice fase reversa C18; empleando como disolventes, proporciones de 300 ml conteniendo cada una lo siguiente: agua 100%, agua-metanol 3:1, agua-metanol 2:1, agua-metanol 1:3, metanol 100%, metanol-acetonitrilo 3:1, metanol-acetonitrilo 1:3, acetonitrilo 100% y acetato de etilo 100%.

De las fracciones anteriores sólo se escogió la de metanol 100% debido a que causó un mayor efecto inotrópico positivo. Posteriormente, a partir de ésta se obtuvieron 5 subfracciones extrayendo con diferentes disolventes (metanol, diclorometano, hexano, tolueno y éter). A las 5 subfracciones se le realizaron bioensayos para determinar actividad sobre el corazón del mejillón.

Los compuestos presentes en las subfracciones fueron monitoreados y separados mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ como fase estacionaria y una mezcla 3:1 Isooctano: acetato de etilo como fase móvil; compuestos tipo esterol fueron identificados en las 5 subfracciones por su coloración en TLC al ser revelados con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N, ya que este tipo de compuesto dan coloraciones rojas o azules y cambian a café cuando se usan reveladores a base de ácido sulfúrico. Estos compuestos de interés de la subfracción de hexano se purificaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromathography) en una columna Phenomenex 105 Jupiter 10μ, de 250 X 10 mm, a un flujo de 3.0 mL/min y un detector de índice de refracción; eluyendo con una mezcla de Isooctano:Acetato de etilo 3:1, y se colectó el compuesto mayoritario correspondiente al esterol. Cada fracción y compuesto puro obtenidos fueron evaluados para determinar sus efectos sobre el corazón de *M. californianus* de acuerdo al método descrito en el apartado 5.3. 1.

5.5. Determinación de la estructura química

Para determinar los grupos funcionales del compuesto seleccionado se corrieron espectros de infrarrojo (IR) en un espectrómetro PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR; por el método de dilución con cloroformo y la asignación de señales se realizó utilizando diferentes tablas de correlaciones.

El peso molecular del compuesto se obtuvo mediante Espectrometría de Masas API-ES $[M+Na]^+$ (Ionización a Presión Atmosférica- Electrospray).

Finalmente para elucidar la estructura molecular del compuesto, se realizaron estudios de Resonancia Magnética Nuclear protónica (^1H RMN) y de carbono trece (^{13}C RMN) en un equipo Bruker de 600 MHz, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y los desplazamientos químicos fueron referenciados a las señales del disolvente a $\delta 7.24/77.0$. Todos los experimentos en 1 y 2 dimensiones ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC y HMBC fueron determinados de acuerdo a los pulsos estándares del equipo. La asignación de algunas señales se hizo mediante diversas tablas y por comparación con otros trabajos.

5.6. Análisis estadístico

A cada grupo de datos obtenido en los bioensayos, se le evaluó la normalidad y homogeneidad de varianzas (Kolmogorov-Smirnov y Bartlett). Se realizaron pruebas t para determinar diferencias antes y después del tratamiento. Se realizaron pruebas *a posteriori* para determinar diferencias entre los efectos ocasionados a diferentes concentraciones utilizadas (Zar, 1999).

6. RESULTADOS

6.1. Validación del corazón de *M. californianus* como modelo biológico para la evaluación de agentes cardiotónicos

6.1.1. Biometría del corazón de *M. californianus*

Para realizar la validación de *M. californianus* como método de cribado, se registraron los parámetros fisiológicos y biométricos del corazón sin ningún tipo de compuesto que alterara sus funciones para establecer una metodología de trabajo en la prueba de los extractos (Tabla 1).

Tabla I. Parámetros de *M. californianus*; los valores corresponden a un promedio de 63 organismos sin la adición de ningún compuesto.

Parámetro	Promedio $\pm$ error estándar
Fuerza de contracción	2.17 ± 0.069 g
Frecuencia cardíaca	24.66 ± 0.73 latidos min^{-1}
Peso del corazón	$0.0415 \pm 4.0653e^{-3}$ g
Longitud de concha	8.0 ± 0.5 cm

6.1.2. Efecto del etanol sobre el corazón del *M. californianus*

La digoxina comercial contiene 10 % de etanol según su etiqueta. En base a esto se calculó la cantidad de alcohol presente en el volumen final de cada bioensayo para las diferentes concentraciones de digoxina, siendo 0.4 %

la máxima concentración calculada en las dosis no tóxicas. Con una concentración de 0.5% de etanol en el medio, se comprobó mediante pruebas pareadas que no existe cambio significativo para la fuerza y frecuencia antes y después del tratamiento (Tablas 2 y 3). El patrón de los latidos fue constante aunque se registró en algunos casos una breve ausencia de latidos al momento de agregar el etanol, después el corazón volvía a latir normalmente.

Se encontró que concentraciones de etanol mayores al 0.7% provocan efectos tóxicos sobre el corazón del mejillón (Figuras 6 y 7). A estas concentraciones se observaron diferentes situaciones, una de ellas fue la disminución inmediata en la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca hasta llegar a la ausencia de latidos. También se registraron intervalos de tiempo en los que se daban latidos con una fuerza incluso mayor a la presente antes del tratamiento, para posteriormente presentarse ausencia de latidos hasta por 14 s. En algunos casos se observaron latidos que fueron progresivamente despegándose de la base, con picos dobles o triples y de forma irregular (Fig. 7).

Tabla II. Efectos del etanol a 0.5 % sobre la fuerza de contracción. Cada par de valores de fuerza de contracción (antes y después) representa un corazón analizado.

% de etanol en vol. Final	Fuerza de contracción (g)		% de cambio
	Antes	Después	
0.5	0.7092	0.7221	1.8
	0.9736	1.031	5.8
	0.5737	0.5806	1.2
	0.3976	0.37	-7
	0.4281	0.4232	1.2
Prom.	0.616	0.625	0.6
Desv.std	0.235	0.265	4.66

Tabla III. Efectos del etanol a 0.5 % sobre la frecuencia cardíaca. Cada par de valores de fuerza de contracción (antes y después) representa un corazón analizado.

% de etanol en vol. final	Frecuencia cardíaca (lat/min)		% de cambio
	Antes	Después	
0.5	22	22	0
	18	18	0
	26	29	11.5
	25	24	-4
	21	19	-9.5
Prom.	22.4	22.4	0.4
Desv.std	3.209	4.392	7.7

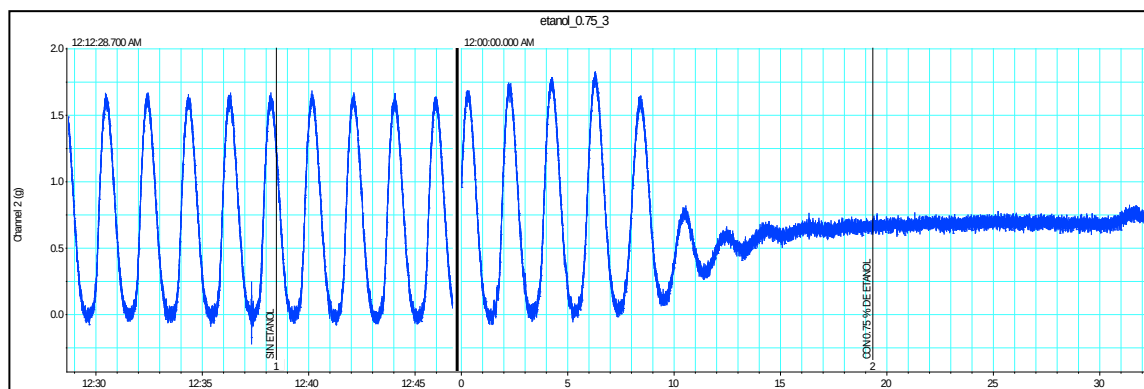


Figura 6. Actividad ventricular antes y después de la adición de etanol. En las abscisas se registra el tiempo en minutos iniciando en tiempo cero al momento de la adición, que se marca por la línea vertical. La concentración final fue 0.75 %. Se observa la ausencia de latidos después de 10 s.

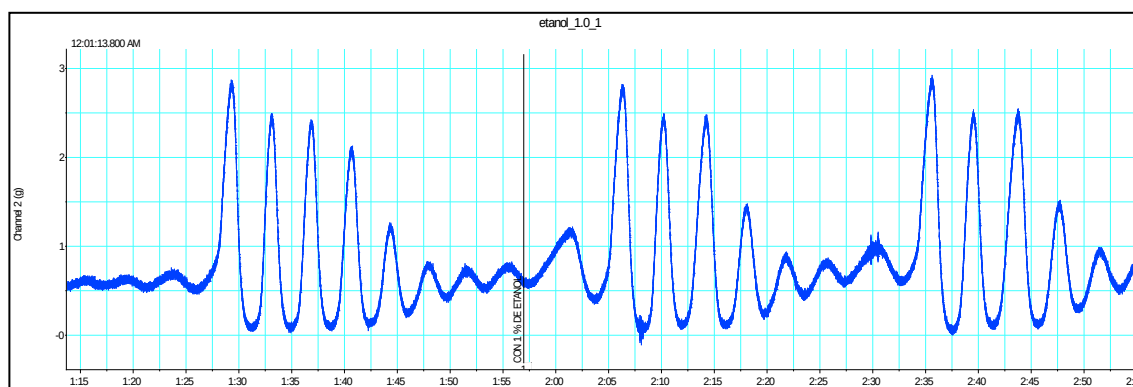


Figura 7. Bloques de latidos irregulares en el corazón del mejillón provocados por el etanol al 1 % en el volumen final. En las abscisas se registra el tiempo en minutos.

6.1.3. Efecto de la digoxina sobre el corazón de *M. californinaus*

Las tablas de la 4 a la 13 muestran los efectos provocados por la digoxina a diferentes concentraciones sobre la fuerza de contracción. Cada tabla corresponde a un total de 6 organismos con una longitud de concha de $8.0 \pm 0.5\text{cm}$.

Se encontró que a partir de $0.6 \mu\text{M}$ de digoxina se observa un aumento en la fuerza de contracción, aunque estadísticamente los cambios en las concentraciones de 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.9 y $4.0 \mu\text{M}$ no son significativas. En las concentraciones de 1.2 , 1.6 , 2.0 , 2.5 y $3.0 \mu\text{M}$ se registraron los mayores aumentos en la fuerza de contracción, con un 95 % de confianza se encontró que estos cambios son significativos.

Tabla IV. Efecto de la digoxina a 0.2 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.0425 ± 0.017 g

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
0.2	0.78	0.77	0
	2	2	0
	2.31	2.31	0
	2.3	2.3	0
	2.1	2	0
	2.24	2.24	0
Prom.	1.955	1.9367	0
Desv. std	0.5882	0.5886	0

Tabla V. Efecto de la digoxina a 0.4 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0408 \pm 4.6\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
0.4	3.3	3.3	0
	2.1	2.1	0
	2.5	2.5	0
	3.5	3	0
	1.8	1.8	0
	2.1	2.1	0
Prom.	2.55	2.4667	0
Desv. std	0.6979	0.582	0

Tabla VI. Efecto de la digoxina a 0.6 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.0405 ± 0.0129 g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
0.6	2.35	2.5	6.3
	2.14	2.31	7.9
	2.13	2.2	3.2
	1.7	1.6	-6
	3.28	3	-9
	2.7	2.3	-15
Prom.	2.3833	2.3183	2.9
Desv. std	0.5469	0.4534	3.5180

Tabla VII. Efecto de la digoxina a 0.9 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.031 \pm 6.488\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
0.9	1.45	1.64	13.1
	1.69	1.69	0
	2.2	2.68	21.8
	1.83	1.72	-6
	2.29	2.22	-3
	1.34	1.6	19.4
Prom.	1.8	1.925	9
Desv. std	0.3866	0.4339	10.3130

Tabla VIII. Efecto de la digoxina a 1.2 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0391 \pm 4.625 \times 10^{-3}$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
1.2	1.91	2.26	18.3
	1.75	2	14.2
	1.6	1.67	4.3
	2.54	2.75	8.2
	2.72	3.6	32.3
	3.08	3.6	16.8
Prom.	2.2667	2.6467	15.6
Desv. std	0.5967	0.8185	9.7158

Tabla IX. Efecto de la digoxina a 1.6 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón 0.039 ± 0.011 g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
1.6	1.79	2.14	19.5
	1.48	1.52	2.7
	2.18	2.48	13.7
	2.26	3.24	43.3
	3.08	3.84	24.6
	1.94	2.28	17.5
Prom.	2.1217	2.5833	20.2
Desv. std	0.5469	0.8295	13.4852

Tabla X. Efecto de la digoxina a 2.0 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0342 \pm 7.978 \times 10^{-3}$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
2.0	2.55	3.03	18.8
	1.42	1.9	33.8
	2.46	3.34	35.7
	3.11	3.71	19.2
	2.23	2.61	17
	2.03	2.4	18.2
Prom.	2.3	2.8317	23.7
Desv. std	0.565	0.6592	8.5483

Tabla XI. Efecto de la digoxina a 2.5 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0334 \pm 7.007 \times 10^{-3}$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
2.5	3.09	3.78	22.3
	2.16	2.9	34.2
	2.34	3.44	47
	2.88	3.32	15.2
	1.42	1.82	28.1
	2.8	3.26	16.4
Prom.	2.4483	3.0867	27.2
Desv. std	0.6122	0.6825	12.0540

Tabla XII. Efecto de la digoxina a 3.0 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0349 \pm 3.521 \times 10^{-3}$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
3.0	1.58	1.83	15.8
	1.76	2.27	28.9
	2.25	3.17	40.8
	2.03	2.64	30
	2.11	2.2	4.2
	2.92	3.42	17.1
Prom.	2.1083	2.5883	22.8
Desv. std	0.4659	0.6099	12.9653

Tabla XIII. Efecto de la digoxina a 4.0 μM sobre la fuerza de contracción. n=6, peso promedio del corazón $0.0351 \pm 5.477 \times 10^{-3}$ g.

Conc. μM	Fuerza de contracción (g)		% de aumento
	Antes	Después	
4.0	2	2.52	24
	1.5	1.98	30
	1.77	1.67	-6
	1.84	1.14	-38
	2.33	2.78	-19
	1.82	1.59	-12
Prom.	1.8767	1.9467	12.2
Desv. std	0.2751	0.613	14.0712

Los valores de las tablas 4-13 fueron reordenados y recopilados para obtener los porcentajes de aumento (Tabla 14) y a partir de éstos, se construyó la curva de dosis-respuesta para la fuerza de contracción (Fig. 8)

Tabla XIV. Porcentaje de aumento por concentración de digoxina probada. Los valores se obtuvieron de la diferencia de cada corazón perfundido sin y con digoxina. Se tomaron en cuenta valores significativos y no significativos.

Valores promedios de fuerza de contracción.		
# de corazones	Concentración (μM)	% de aumento en la Fuerza de contracción.
6	0.2	0
6	0.4	0
6	0.6	2.9
6	0.9	9
6	1.2	15.6
6	1.6	20.2
6	2	23.7
6	2.5	27.2
6	3	22.8
6	4	12.2

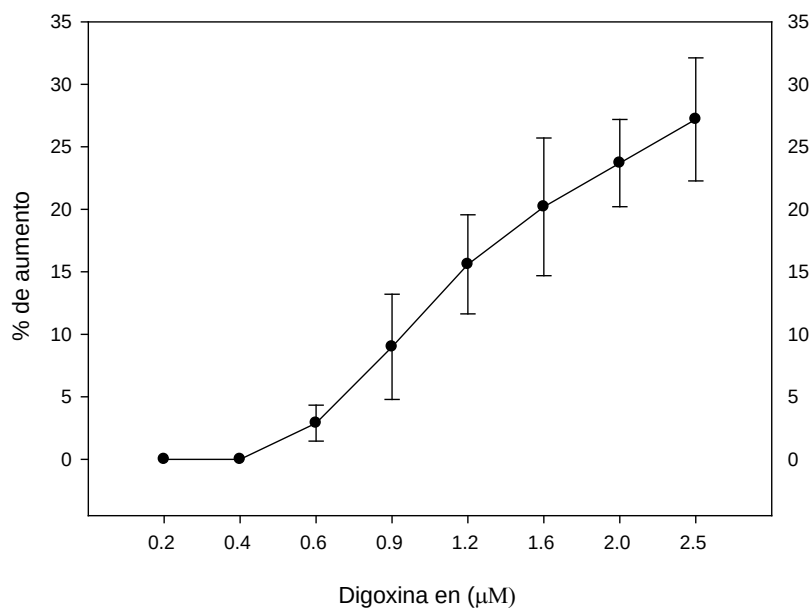


Figura 8. Curva de dosis-respuesta donde se observa el aumento en la fuerza de contracción conforme se incrementa la dosis de digoxina; se tomó en cuenta hasta el máximo porcentaje de aumento.

En algunos bioensayos, generalmente en las concentraciones menores a 1 μM , inmediatamente después de agregar la digoxina, observamos la disminución de la fuerza de contracción (Fig. 9).

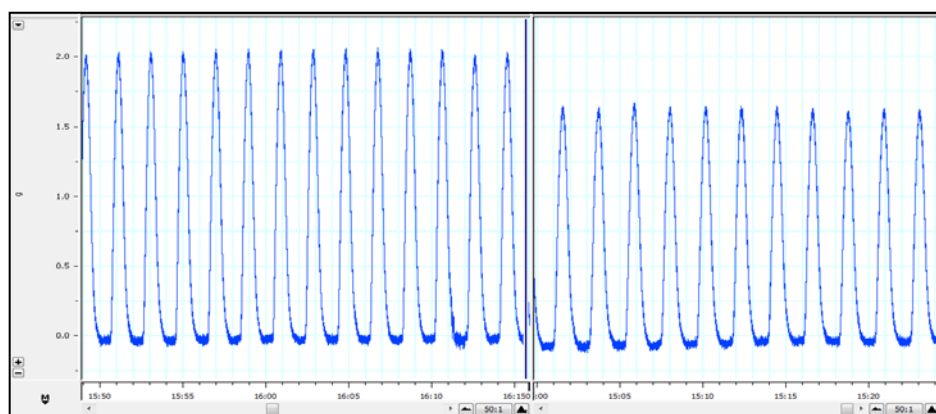


Figura 9. Disminución de la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción después de agregar digoxina a 0.5 μM .

Las tablas de la 15 a la 24 muestran los efectos provocados por la digoxina sobre la frecuencia cardíaca. Cada tabla corresponde a un total de 6 organismos con una longitud de concha de $8.0 \pm .5\text{cm}$.

Todas las concentraciones provocaron una disminución de la frecuencia cardíaca, con un 95 % de confianza se encontró que estos cambios son significativos.

Tabla XV. Efecto de la digoxina a $0.2 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0425 \pm 0.017 \text{ g}$.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
0.2	28	28	0
	32	32	0
	25	24	-4
	31	28	-9.6
	35	31	-11.4
	34	31	-8.8
Prom.	30.8	29	-5.6
Desv. std	3.7	2.9	5

Tabla XVI. Efecto de la digoxina a $0.4 \mu\text{M}$ sobre la frecuencia cardíaca. $n=6$, peso promedio del corazón $0.0408 \pm 4.6\text{e-}3 \text{ g}$.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
0.4	28	25	-10.7
	31	28	-9.6
	21	21	0
	27	23	-14.8
	28	24	-14.2
	30	28	-6.6
Prom.	27.5	24.8	-9.3
Desv. std	3.5	2.7	5.4

Tabla XVII. Efecto de la digoxina a 0.6 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón 0.0405 ± 0.0129 g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
0.6	37	31	-16.2
	25	20	-20
	24	15	-37.5
	43	40	-6.9
	24	22	-8.3
	27	24	-11.1
Prom.	30	25.3	-16.6
Desv. std	8	8.8	11.3

Tabla XVIII. Efecto de la digoxina a 0.9 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.031 \pm 6.488\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
0.9	30	14	-53.3
	17	10	-41.7
	22	18	-18.1
	29	24	-17.2
	30	26	-13.3
	30	25	-16.6
Prom.	26.3	19.5	-26.7
Desv. std	5.5	6.5	16.6

Tabla XIX. Efecto de la digoxina a 1.2 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.0391 \pm 4.625\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
1.2	24	19	-20.8
	25	14	-44
	33	28	-15.1
	21	11	-47.6
	19	16	-15.7
	19	11	-42.1
Prom.	23.5	16.5	-30
Desv. std	5.2	6.4	15.2

Tabla XX. Efecto de la digoxina a 1.6 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón 0.039 ± 0.011 g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
1.6	23	13	-43.4
	23	19	-17.3
	22	13	-40.9
	18	6	-66.6
	23	10	-56.5
	21	8	-61.9
Prom.	21.6	11.5	-47.7
Desv. std	1.9	4.5	18

Tabla XXI. Efecto de la digoxina a 2.0 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.0342 \pm 7.978\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
2.0	30	12	-60
	22	13	-40
	22	10	-54.5
	18	9	-50
	28	10	-64.2
	20	3	-85
Prom.	23.3	9.5	-58.9
Desv. std	4.6	3.5	15.2

Tabla XXII. Efecto de la digoxina a 2.5 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.0334 \pm 7.007\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
2.5	20	8	-60
	25	7	-72
	21	9	-57
	17	5	-70.5
	15	4	-76.4
	21	8	-61.9
Prom.	19.8	6.8	-66.3
Desv. std	3.4	1.9	7.7

Tabla XXIII. Efecto de la digoxina a 3.0 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.0349 \pm 3.521\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
3.0	28	7	-75
	22	6	-72.7
	26	4	-84.6
	19	15	-21
	18	4	-77.7
	19	5	-73.6
Prom.	22	6.8	-67.4
Desv. std	4.1	4.1	23.1

Tabla XXIV. Efecto de la digoxina a 4.0 μM sobre la frecuencia cardíaca. n=6, peso promedio del corazón $0.0351 \pm 5.477\text{e-}3$ g.

Conc. μM	Frecuencia (Lat. Min ⁻¹)		% de disminución
	Antes	Después	
4.0	34	13	-61
	21	5	-76
	14	4	-72
	14	7	-50
	27	5	-81.4
	19	3	-84.2
Prom.	21.5	6.1	-70.7
Desv. std	7.8	3.6	13.0

En la tabla 25 se muestran los porcentajes de disminución por concentración. La figura 10 muestra la curva de dosis-respuesta obtenida.

Tabla XXV. Porcentaje de disminución por concentración. Los valores se obtuvieron de la diferencia de cada corazón per fundido sin y con digoxina. Se tomaron en cuenta valores significativos y no significativos.

Valores promedios de frecuencia cardíaca.		
# de corazones	Concentración (μM)	% de disminución de la frecuencia cardíaca.
6	0.2	5.6
6	0.4	9.3
6	0.6	16.6
6	0.9	26.7
6	1.2	30
6	1.6	47.7
6	2	58.9
6	2.5	66.3
6	3	67.4
6	4	70.7

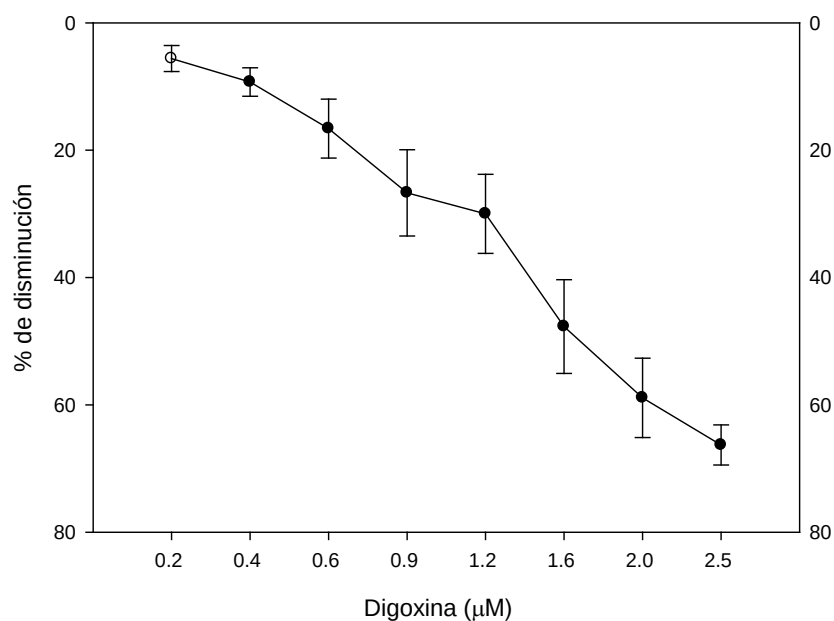


Figura 10. Curva de dosis-respuesta donde se observa como disminuye la frecuencia cardíaca conforme se incrementa la dosis de digoxina; se tomó en cuenta hasta el máximo porcentaje de disminución.

Se encontró que a partir de la concentración de $1.6 \mu\text{M}$ se comienzan a notar los efectos tóxicos de la digoxina, estos efectos se reflejaron mayormente sobre la frecuencia cardíaca, ya que en algunos corazones se obtuvieron patrones de latidos diferentes a los observados antes del tratamiento; se registraron principalmente bloques de latidos con fuerzas de contracción uniforme con periodos de ausencia de 30 segundos (Fig. 11).

En las concentraciones mayores a $2.5 \mu\text{M}$ se encontraron efectos tóxicos tanto para la frecuencia como para la fuerza de contracción; a estas concentraciones la toxicidad se presentó desde el momento que se agregó la digoxina (Fig. 12), principalmente como picos con terminaciones dobles o triples, picos que se alejaban de la base hasta perderse del registro o picos escalonados, también se presentaron latidos aislados y de menor fuerza que antes del tratamiento, además de que la ausencia de latidos se prolongaba hasta 2 minutos (Fig. 13).

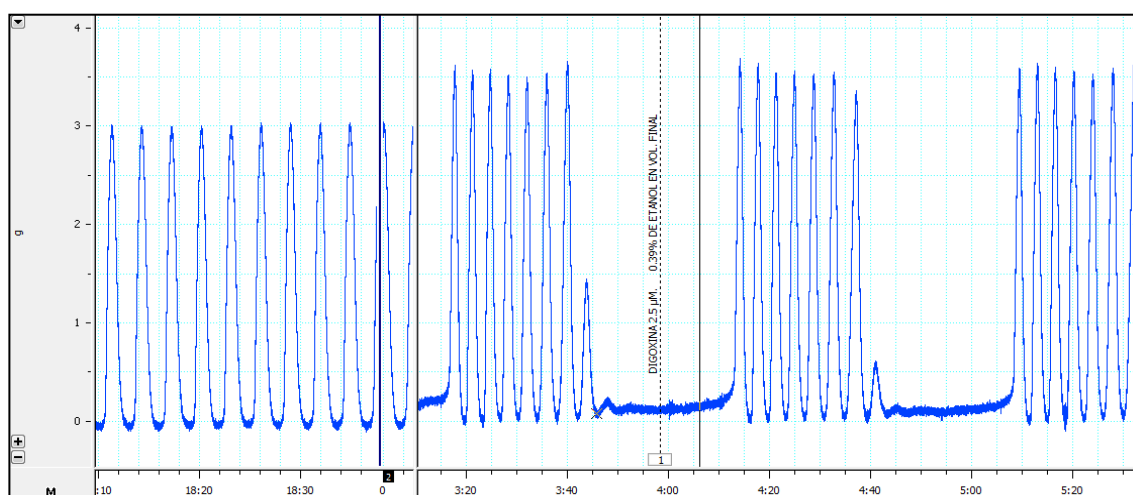


Figura 11. Bloques de latidos con fuerza de contracción uniforme ocasionados por la digoxina a $2.5 \mu\text{M}$ y 0.39 % de etanol en volumen final.

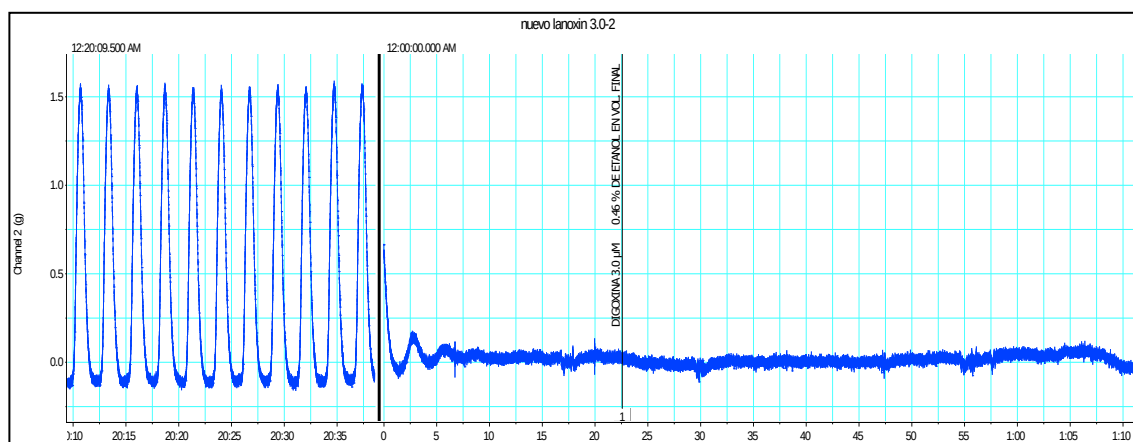


Figura 12. Ausencia de latidos ocasionados por la digoxina a 3.0 μ M y 0.46 % de etanol en volumen final.

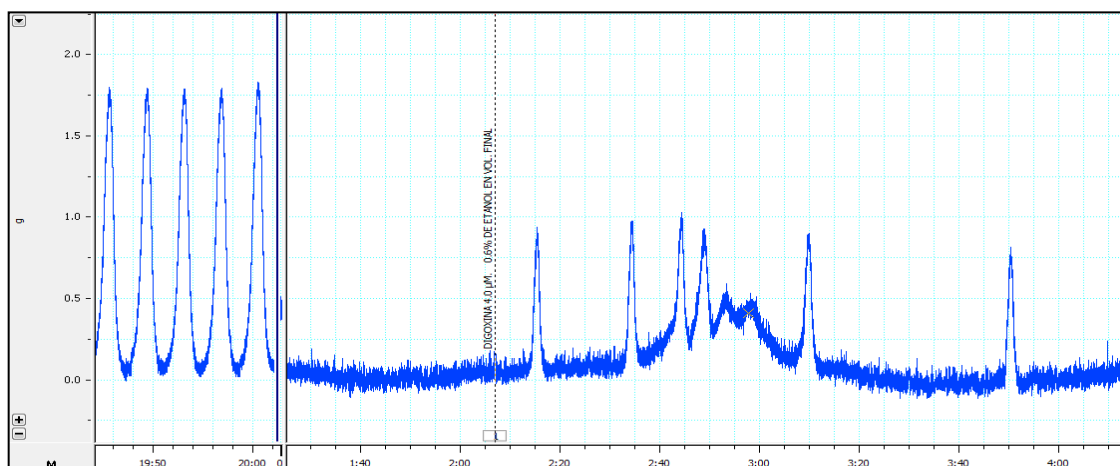


Figura 13. Latidos irregulares y de menor fuerza de contracción ocasionados por la digoxina a 4.0 μ M y 0.6 % de etanol en volumen final.

6.2. Evaluación de la actividad cardiotónica de extractos crudos de *Ophioderma panamense* sobre el corazón de *M. californianus*

Para este bioensayo se colectó un kilo de ofiúridos, de los cuales se obtuvieron 2g de extracto crudo seco. Este extracto se utilizó para la separación en columna fase reversa C18, de la cual se obtuvieron nueve

fracciones con diferentes mezclas de solventes. Después de secar cada fracción y pesar el polvo obtenido, cada una de las fracciones se disolvió en una mezcla de etanol y agua de mar hasta obtener una solución al 10% en etanol para determinar sus efectos sobre el corazón de *M. californianus*.

De las fracciones analizadas cuatro presentaron efecto inotrópico positivos y cronotrópico negativos. De estas cuatro, tres presentaron efectos tóxicos ya que provocaron latidos escalonados, incompletos y alejados de la base, además de formar una espesa espuma que llegaba a impedir la transmisión de la fuerza de contracción hacia el transductor de fuerza (Fig. 14). La fracción que causó mayor efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo sin presentar efectos tóxicos observables, fue la que se obtuvo con metanol al 100% (Fig. 15), por lo que se seleccionó para realizarle los posteriores análisis. Los datos obtenidos de los bioensayos de las fracciones se presentan en la tabla 26.

Tabla XXVI. Datos obtenidos del bioensayo de cada fracción que presentó actividad cardiotónica. Se muestran las concentraciones que fueron necesarias para obtener el efecto señalado. De la fracción 4 se muestran los valores obtenidos con el volumen total de la solución preparada. Los valores entre paréntesis muestran el efecto en la fuerza de contracción y de frecuencia cardíaca; el signo negativo significa disminución. n= 1 organismo por fracción.

Fracción	Solvente usado en obtención	Inicio de inotropía	Máximo cambio en inotropía	Máximo cambio en cronotropía	Inicio de toxicidad
1	Agua	46 µg/ml	802 µg/ml (+43%)	673 µg/ml (-35%)	802 µg/ml
2	Agua:MeOH 3:1	156 µg/ml	184 µg/ml (+64%)	156 µg/ml (-38%)	58 µg/ml
3	Agua:MeOH 2:1	18 µg/ml	22 µg/ml (+90%)	18 µg/ml (-27%)	18 µg/ml
4	MeOH	10 µg/ml	545 µg/ml (+102%)	545 µg/ml (-48%)	Conc. no encontrada

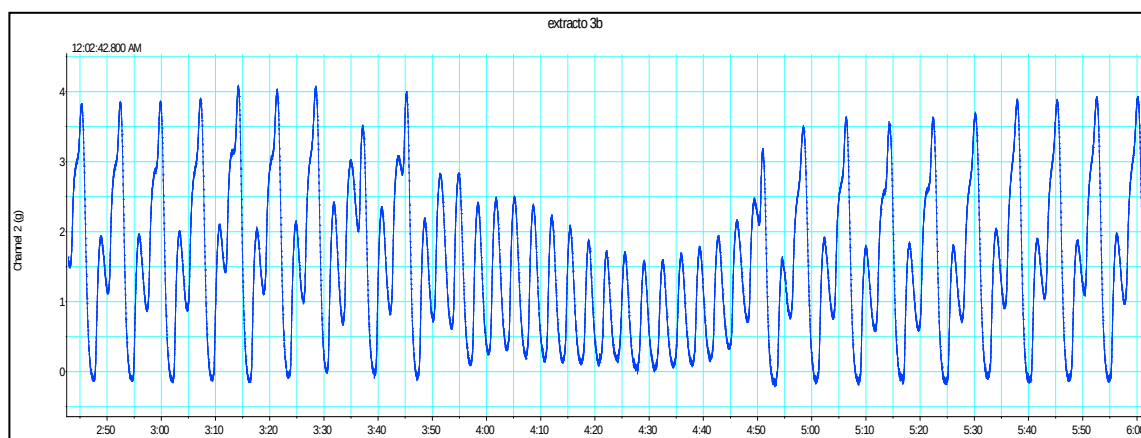


Figura 14. Latidos irregulares ocasionados por la fracción obtenida con agua: metanol 2:1. La concentración en el medio es de 18 $\mu\text{g/ml}$.

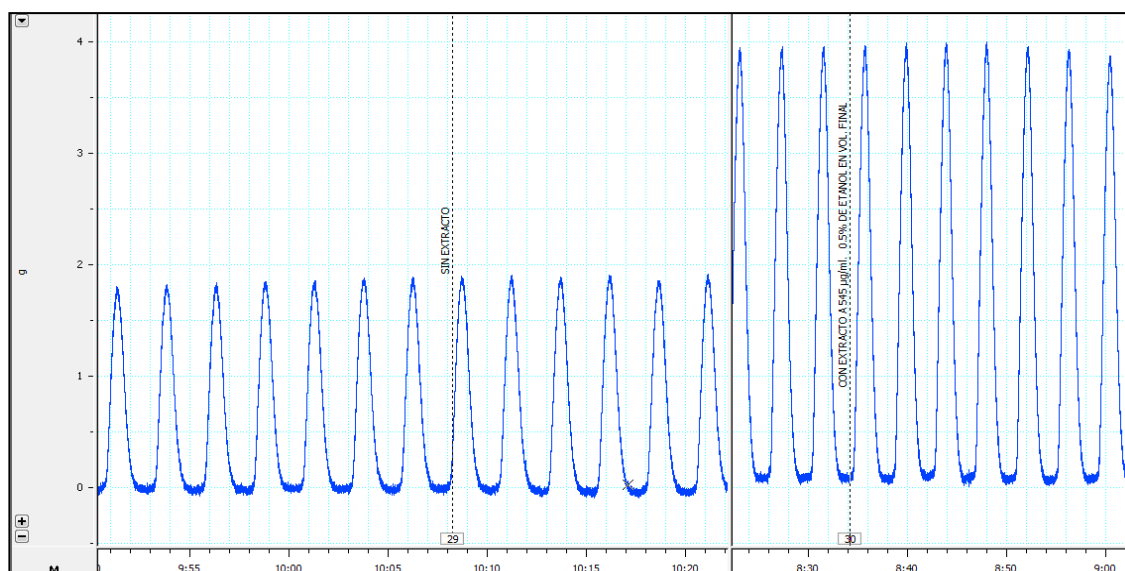


Figura 15. Comparación de los latidos del corazón de *M. californianus* sin extracto y con extracto del fracción obtenida con metanol; se observa un aumento en la fuerza de contracción del 100%. La concentración en el medio es de 545 $\mu\text{g/ml}$ y 0.47 % de etanol en el volumen final.

A la fracción obtenida con metanol se le realizó también un estudio de dosis-respuesta a diferentes concentraciones del extracto (Tabla 27) para determinar los cambios en la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca (Fig. 16 y 17).

Tabla XXVII. Porcentaje de cambio por concentración de extracto metanólico (Fracción 4, Tabla 26). Los valores se obtuvieron de la diferencia antes y después del tratamiento con el extracto metanólico.

Conc. $\mu\text{g/ml}$	Fuerza de contracción (g)		% de aumento	Conc. $\mu\text{g/ml}$	Frecuencia cardíaca (LxM)		% de disminución
	antes	después			Antes	después	
5	1.97	2.1	6.5	5	25	24	4
10	1.97	2.2	11.6	10	25	24	4
15	1.97	2.3	16.7	15	25	23	8
20	1.97	2.3	16.7	20	25	22	12
25	1.97	2.45	24.3	25	25	22	12
50	1.97	2.58	31	50	25	20	20
75	1.97	2.7	37	75	25	20	20
100	1.97	2.86	45.1	100	25	19	24
150	1.97	3	52.2	150	25	18	28
200	1.97	3.38	70.5	200	25	17	32
400	1.97	3.7	87.8	400	25	15	40
545	1.97	4	103	545	25	13	48

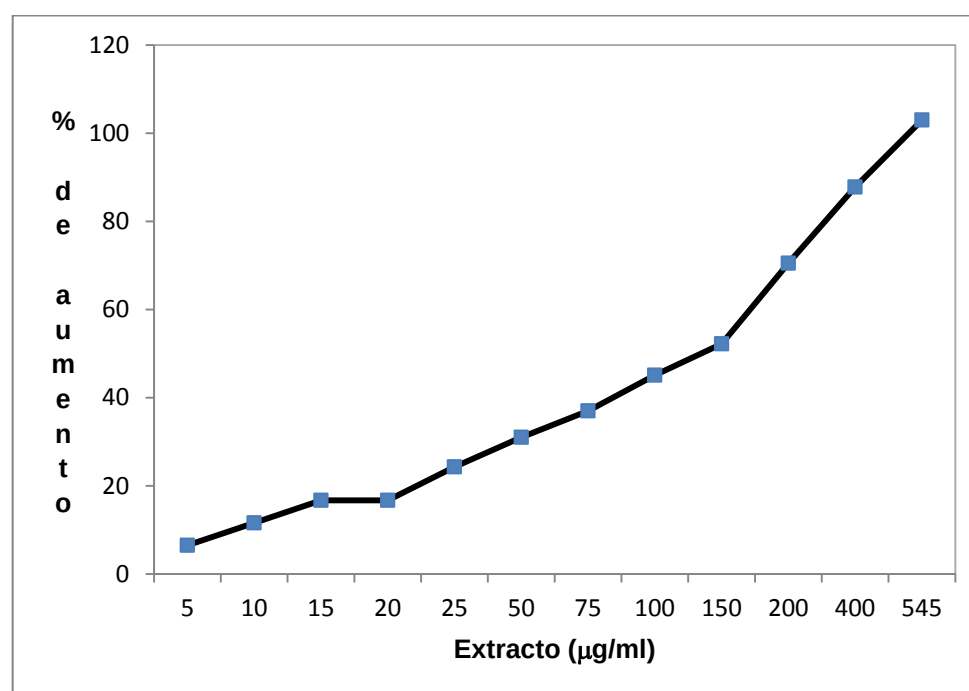


Figura 16. Aumento en la fuerza de contracción del corazón de *M. californianus* ocasionado por el extracto metanólico. La concentración máxima de etanol en el medio fue de 0.47%.

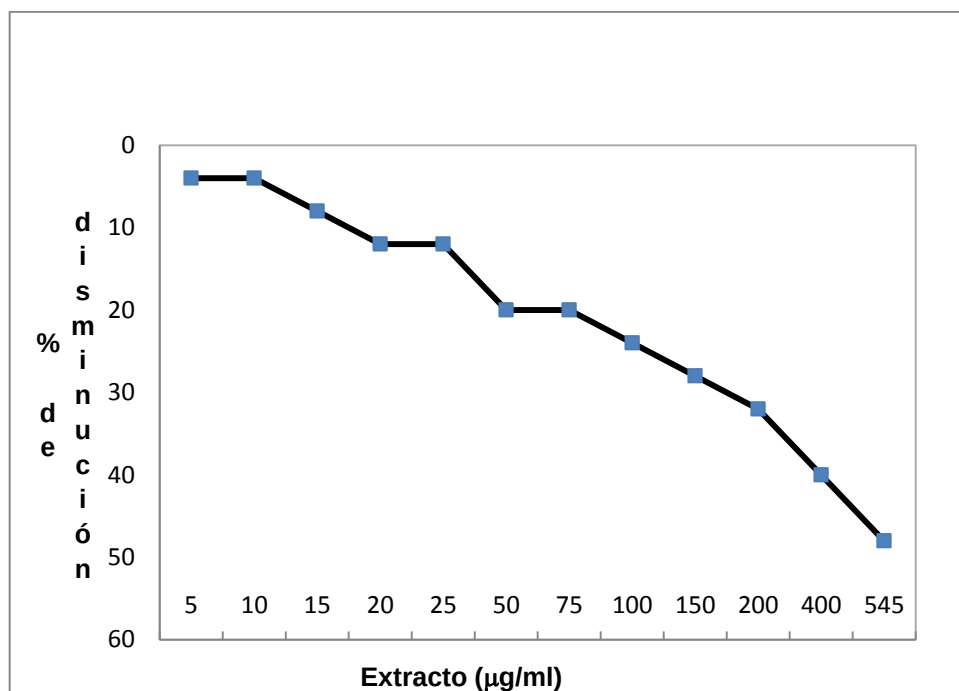


Figura 17. Disminución de la frecuencia cardíaca ocasionada por el extracto metanólico. La concentración máxima de etanol en el medio fue de 0.47%.

Para corroborar los datos de la curva de dosis respuesta del extracto metanólico, se hicieron nuevamente los bioensayos por quintuplicado a una concentración de 150µg/ml del extracto (Tabla 28); Esta fue la concentración que produjo un aumento en la fuerza de contracción del 52 %; estas repeticiones también mostraron un aumento promedio del 52 % en la fuerza de contracción y una disminución de la frecuencia cardíaca del 58% (Fig. 18).

Las cinco subfracciones obtenidas de la fracción metanólica ocasionaron efectos inotropico positivo y cronotrópico negativo; Aunque en todas se identificaron compuestos tipo esterol, solo se escogió la subfraccion de hexano para su purificación, ya que esta revelo con mayor intensidad indicando una concentración mayor del compuesto de interés

Tabla XXVIII. Efecto del extracto metanólico sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$. Cada par de valores de fuerza de contracción y frecuencia cardíaca (antes y después) representa un corazón analizado.

Conc. $\mu\text{g/ml}$	% de etanol final	Fuerza de contracción		% de aumento	Frecuencia cardíaca		% de disminución
		antes	después		antes	después	
150	0.01	1.92	2.86	49	26	10	61.5
	0.01	2.77	4.2	51.6	30	13	56.6
	0.01	2.22	3.4	53.1	26	10	61.5
	0.1	1.79	2.73	52.5	27	12	55.5
	0.1	2.13	3.3	54.9	29	12	58.6
Prom.				52.22			58.54
Desv. std				2.16			2.50
Err. std				0.96			1.12

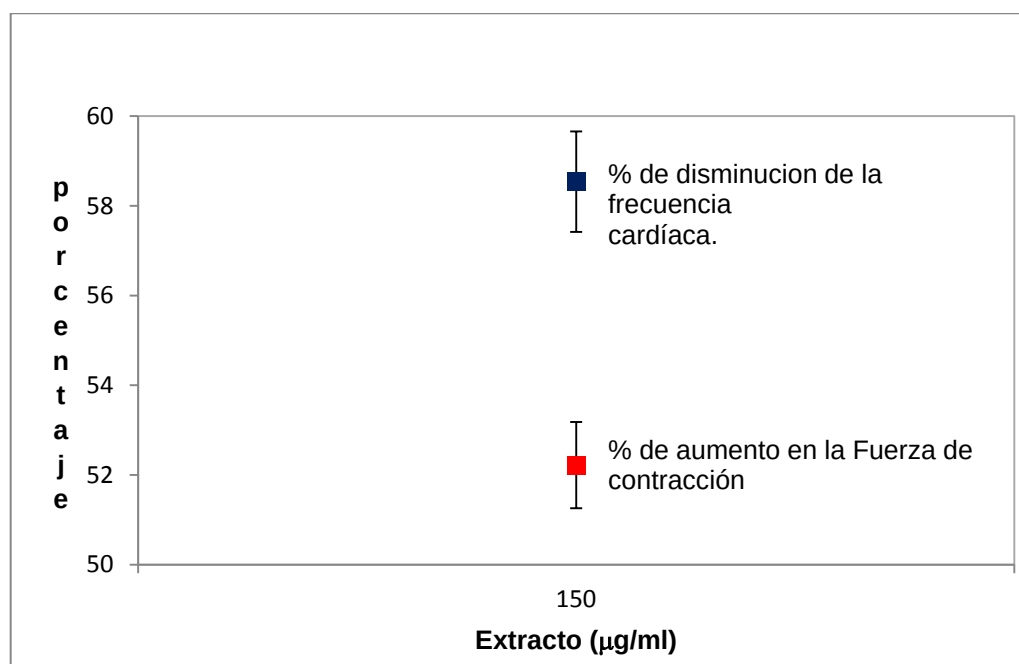


Figura 18. Promedio de 5 bioensayos a una misma concentración del extracto metanólico donde se observa el efecto sobre la fuerza de contracción y la frecuencia cardíaca.

6.3. Determinación de la estructura química

6.3.1. Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojo mostró señales características para grupos oxhidrilos con una banda de tensión O-H en 3390 cm^{-1} y para los grupos alcanos bandas de tensión a los $2852\text{-}2921\text{ cm}^{-1}$. La señal en 1739 cm^{-1} fue asignada a restos de acetato de etilo usado para disolver el extracto, mientras que la señal de intensidad media en 1651 cm^{-1} indica la presencia de dobles enlaces dentro de la molécula. Finalmente la señal en 1464 cm^{-1} puede indicar la presencia de grupos metilo dentro de la molécula (Fig. 19) (Tabla 29).

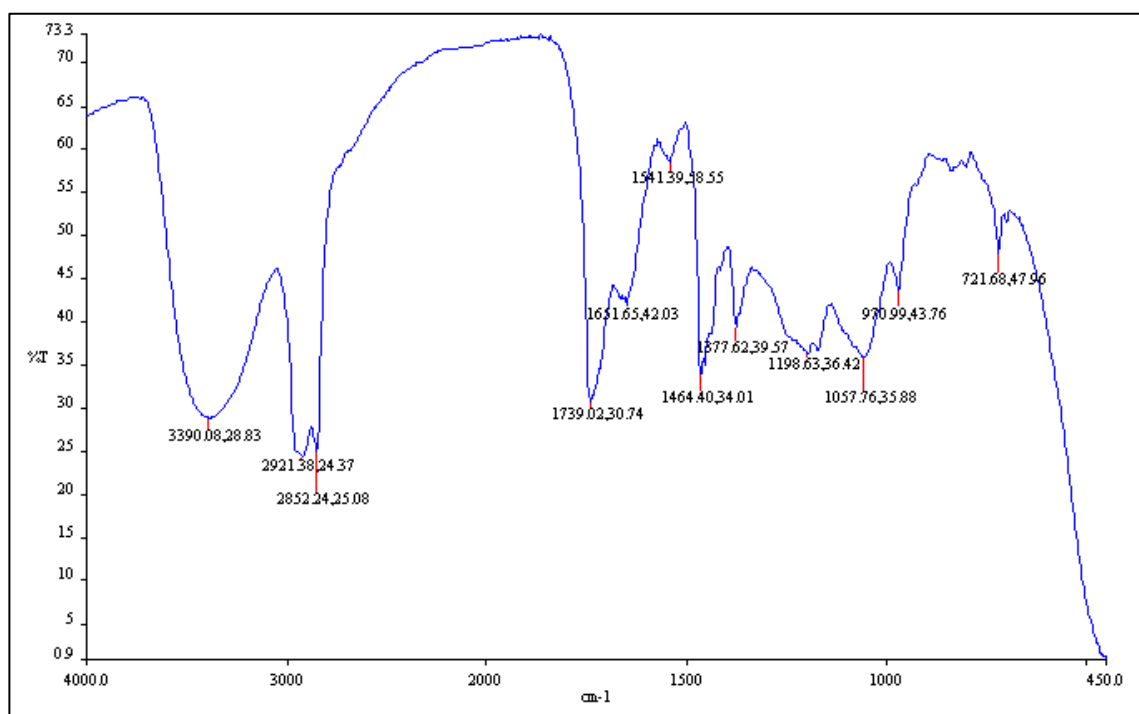


Figura 19. Espectro de Infrarrojo del compuesto esteroidal con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo.

Tabla XXIX. Señales principales del compuesto esteroidal seleccionado.

Longitud de onda (cm⁻¹)	Grupo al que pertenece
3390	OH
2852- 2921	Enlaces C-H
1651	Doble enlace (C=C)
1464	CH ₃

6.3.2. Espectrometría de masas

El espectro de masas muestra un peso molecular de 717.1; y la fragmentación del compuesto indica que esta relación masa/carga corresponde al ión molecular más un ión sodio, por lo que al restarle el peso extra del sodio (23 unidades), el compuesto queda con un peso molecular de 694, sin embargo, la molécula parece haber perdido 2 unidades de sulfato de sodio ($\text{Na}^+\text{O}_3\text{SO}^-$) y 2 metoxilos, lo que da un peso de 300 unidades de masa atómica y en la molécula que se encontró solamente se lograron identificar 396 unidades de masa atómica, lo que está de acuerdo para la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ con 7 grados de insaturación, para 4 anillos y 3 dobles ligaduras.

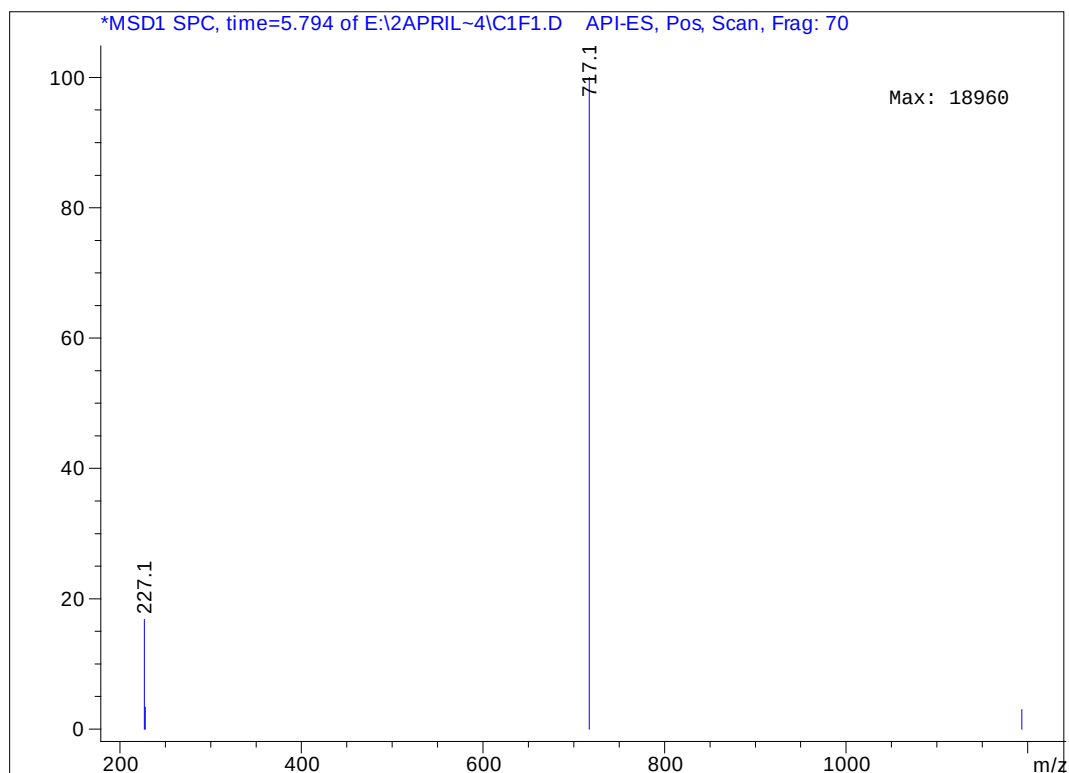


Figura 20. Espectro de masas del compuesto esteroideal seleccionado.

6.3.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear protónica (^1H RMN)

El espectro de ^1H -RMN muestra señales que son características de compuestos que presentan un núcleo esteroideal (Fig. 21 y 22), seis de estas señales pertenecen a protones de metilos a 0.68, 0.86, 0.87, 0.92, 1.01 y 1.25 ppm, se observa una señal a campo bajo en 5.35 ppm la cual corresponde a un protón de un carbono vinílico, la señal en 3.50 ppm (heptete) se asigna a un protón del carbono No. 3, el cual es característico de todo esteroil. El resto de las señales que aparecen en el espectro fueron asignadas a los protones anoméricos dentro de la molécula (tabla 30).

6.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece ($^{13}\text{CRMN}$)

En el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ también se pueden observar señales características de compuestos tipo esteroles (Fig. 23 y 24). A campo bajo se observan señales que corresponden a carbonos insaturados, tal es el caso de las señales en 140.7 y 121.7 ppm que corresponden a los carbonos 5 y 6 del núcleo esteroide. A campo alto las señales que se observan en 22.5, 18.7, 14.1 y 11.85 ppm corresponden a carbonos metílicos de la cadena lateral, mientras que las señales en 29.6 y 19.4 ppm corresponden a los carbonos metílicos adyacentes al núcleo esteroide. La señal en 71.8 ppm corresponde al carbono número 3, el cual contiene el grupo oxhidrilo que caracteriza a los esteroides. Finalmente, a campo alto se observan las señales de carbonos tipo metilenos (CH_2), metinos (CH) saturados, carbonos cuaternarios (C) saturados y C-OH saturados (Tabla 30).

6.3.5. Correlación espectroscópica de RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY

En la Figura 25 se observan correlaciones entre los protones a y b del carbono número 2, así como entre los protones 2a y 3^a, 3^a y 3b, 2b y 3^a y también entre los protones 6 y 7, así como entre el protón 9 y los protones 11, los protones 11 y 12^a y entre los protones 12^a y 12b. También se observan correlaciones espectroscópicas entre el protón 20 con los protones 21, entre el protón 24 y 25 y entre el protón 25 con los protones del metilo 26.

6.3.6. Correlación de protones y carbonos mediante espectroscopía de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC

Mediante la correlación de protones con carbonos en el experimento conocido como HSQC (Heteronuclear single quantum coherence) (Fig. 26) se pudo determinar la posición de cada protón en cada carbono y se expresan en la tabla 30.

6.3.7. Correlación de protones a carbonos mediante espectroscopía de RMN bidimensional ^1H a ^{13}C HMBC

En el experimento HMBC (heteronuclear multiple bond coherence) (Fig. 27) se logró determinar la correlación existente entre carbonos y protones de 2 a 4 enlaces de distancia como es el caso del protón 3 que correlaciona con los carbonos 1, 4 y 11, así como el protón 4 que interacciona con los carbonos 1, 2 y 3; el protón 6 que correlaciona con los carbonos 1, 2, 4, 7, y 15; el carbono 8 que interacciona con los protones 12 y 18; el protón 14 que interacciona con los carbonos 1, 4, 9 y 12; los protones del metilo 18 que interaccionan con los carbonos 9, 12, 16, 17 y 20; los protones del metilo 19 que interaccionan con los carbonos 6, 11 y 19 y finalmente los protones del metilo 21 que interacciona con los carbonos 13, 17 y 20 .

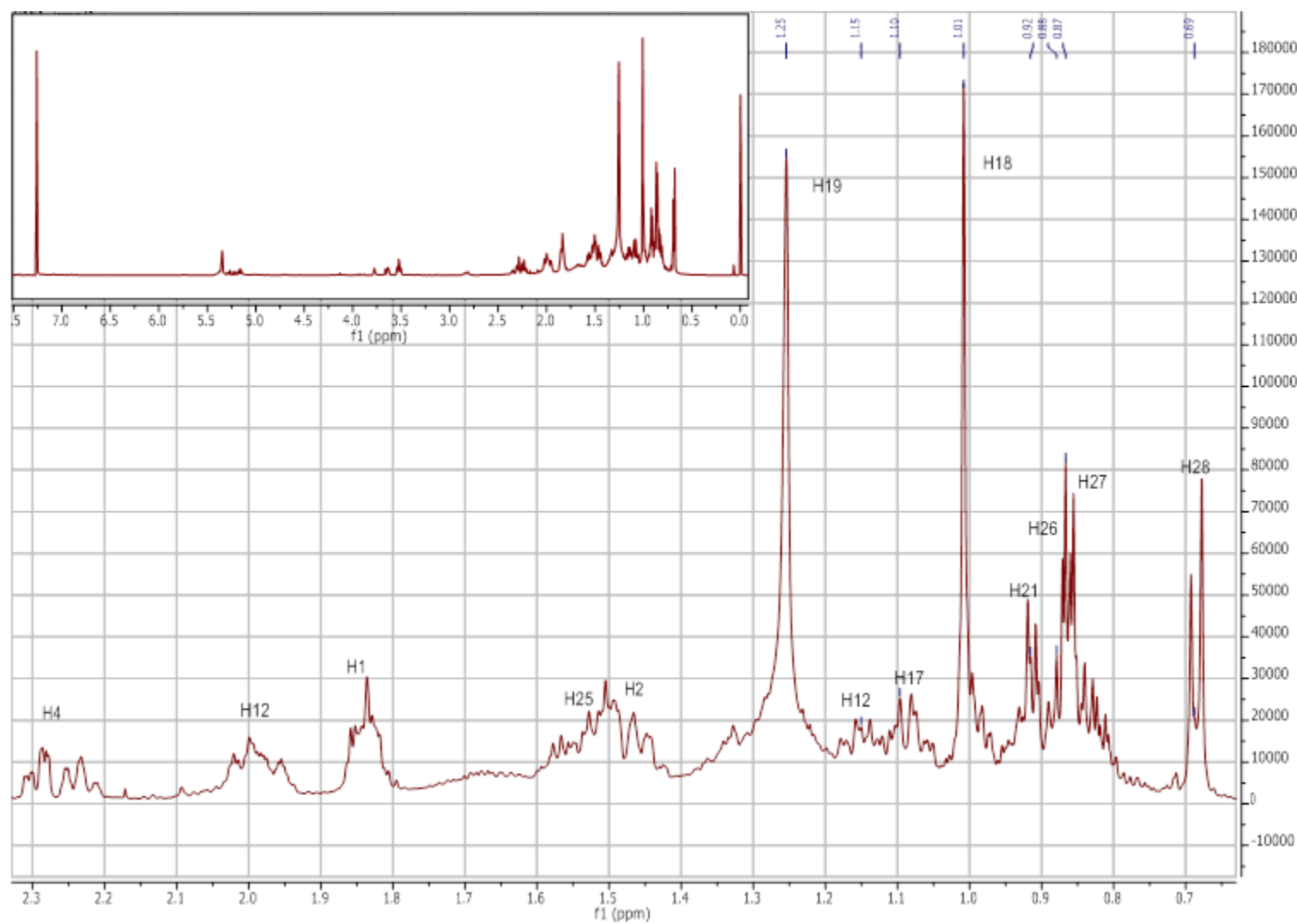


Figura 21. Espectro de ^1H -RMN donde se muestran las señales comunes que identifican un compuesto esteroidal.

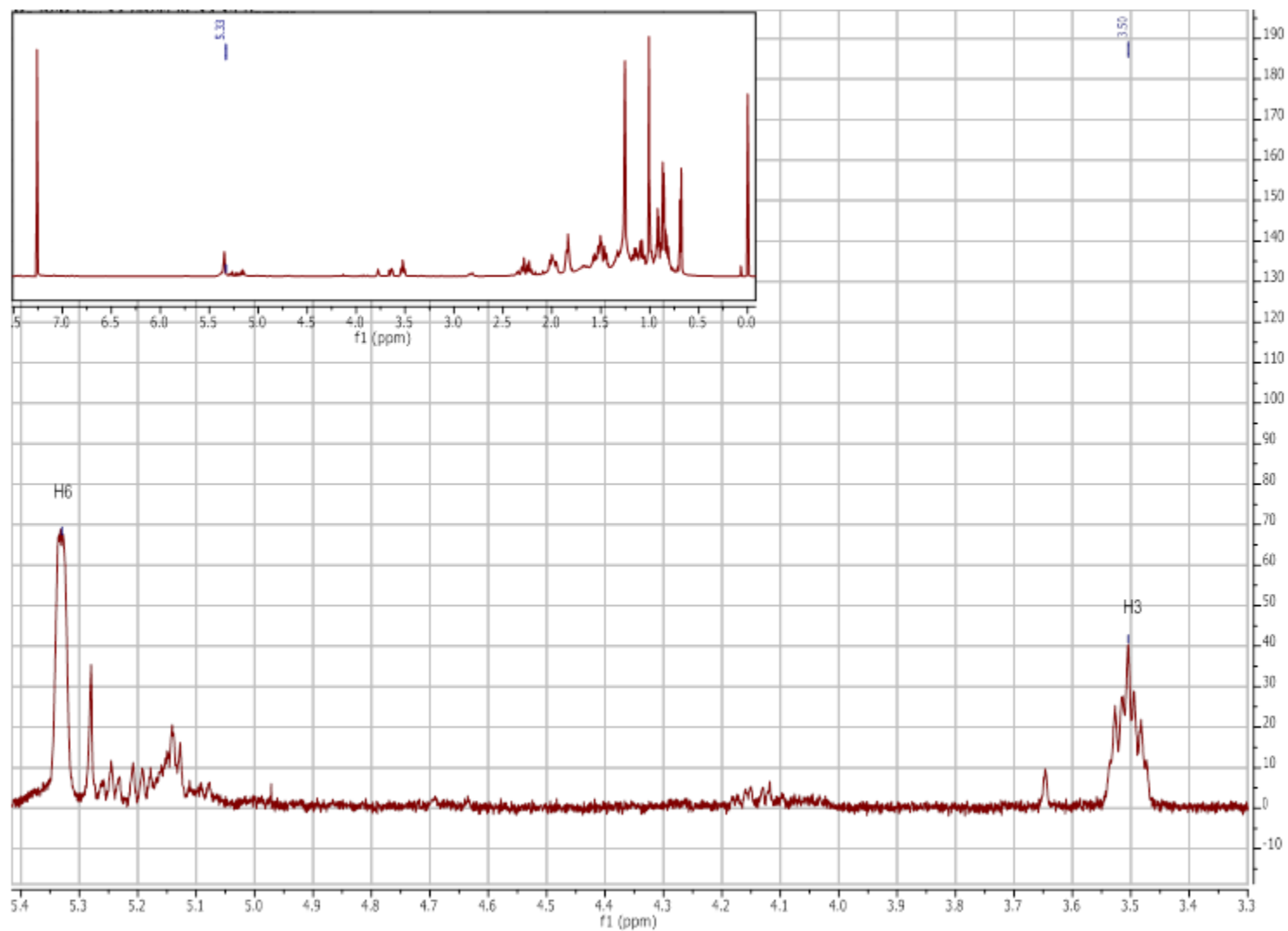


Figura 22. Espectro de ^1H -RMN amplificado donde se muestran las señales comunes que identifican un compuesto esteroide.

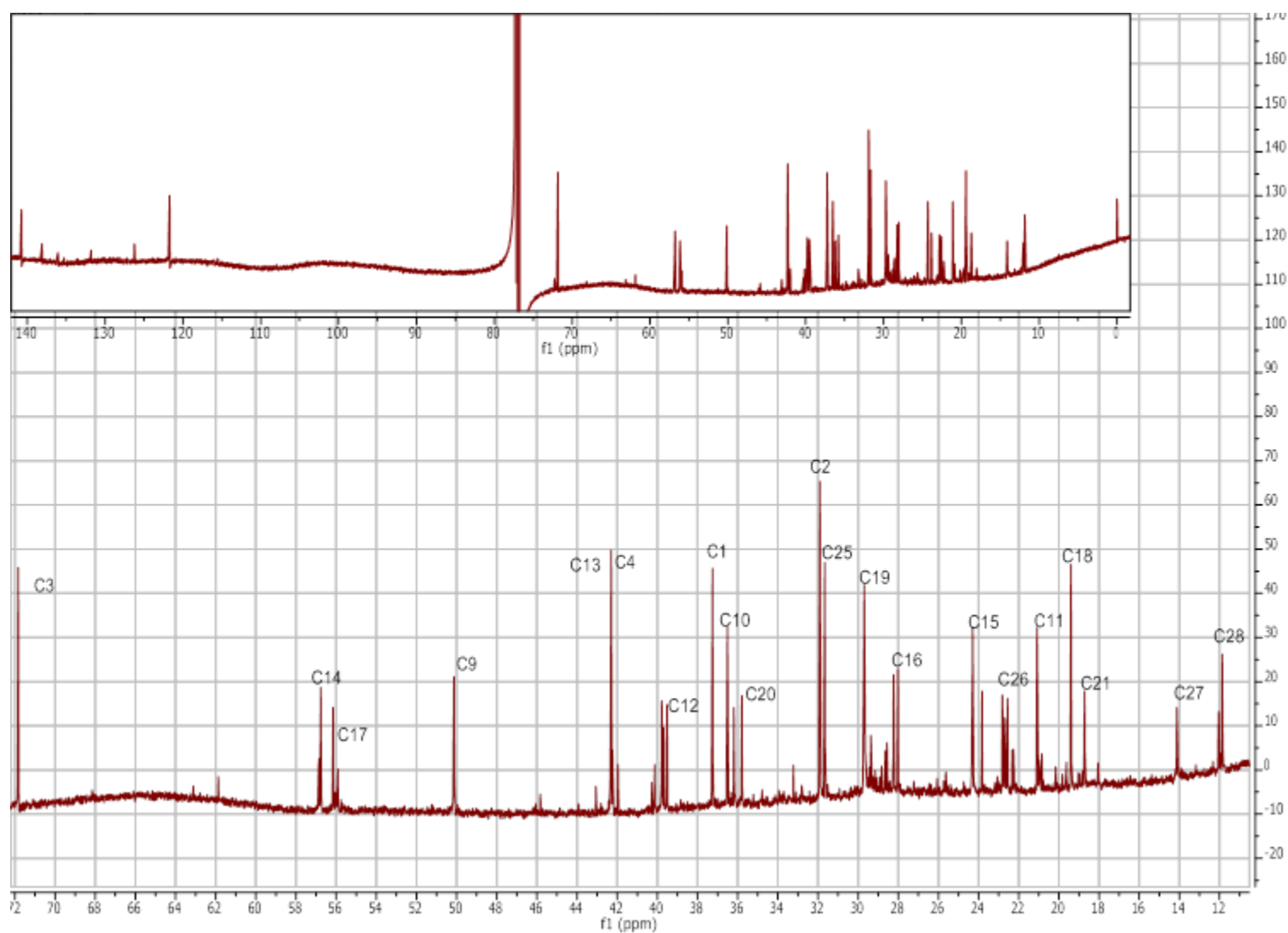


Figura 23. Espectro de ^{13}C -RMN amplificado donde se muestran las asignaciones de los carbonos del compuesto esteroide.

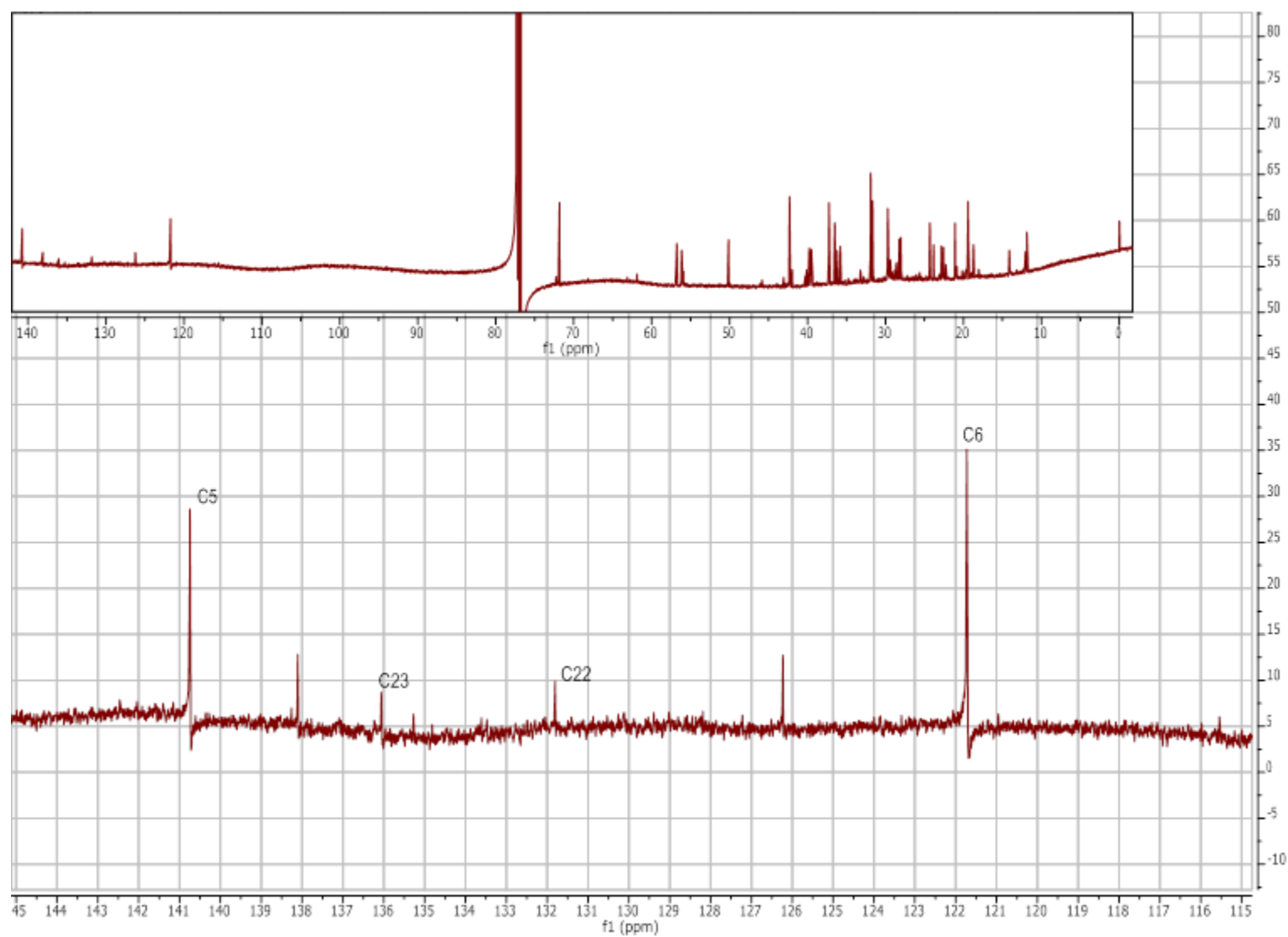


Figura 24. Continuación del espectro de ^{13}C -RMN donde se muestran las asignaciones de los carbonos del compuesto esteroideal.

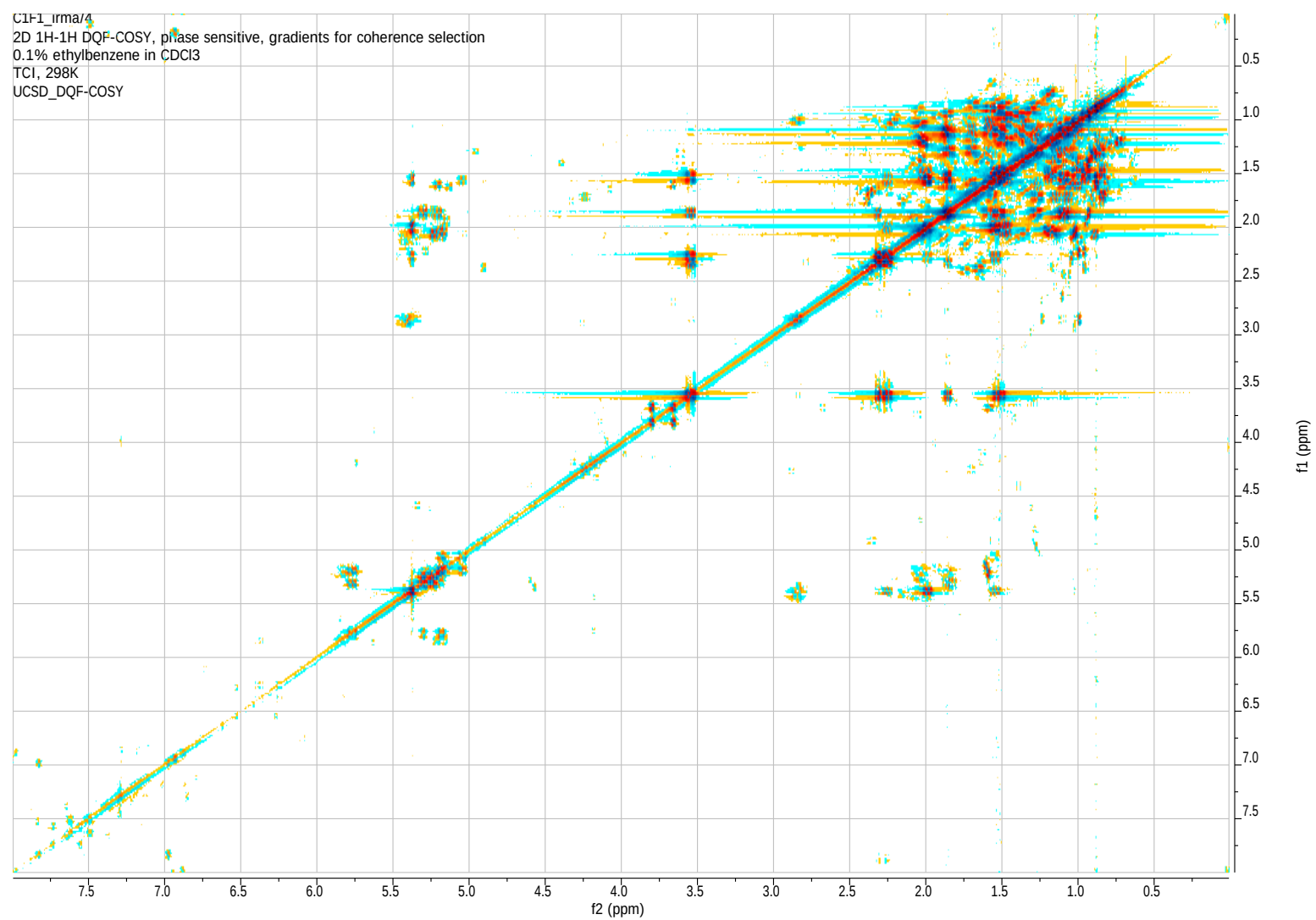


Figura 25. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^1H COSY del compuesto esteroideal.

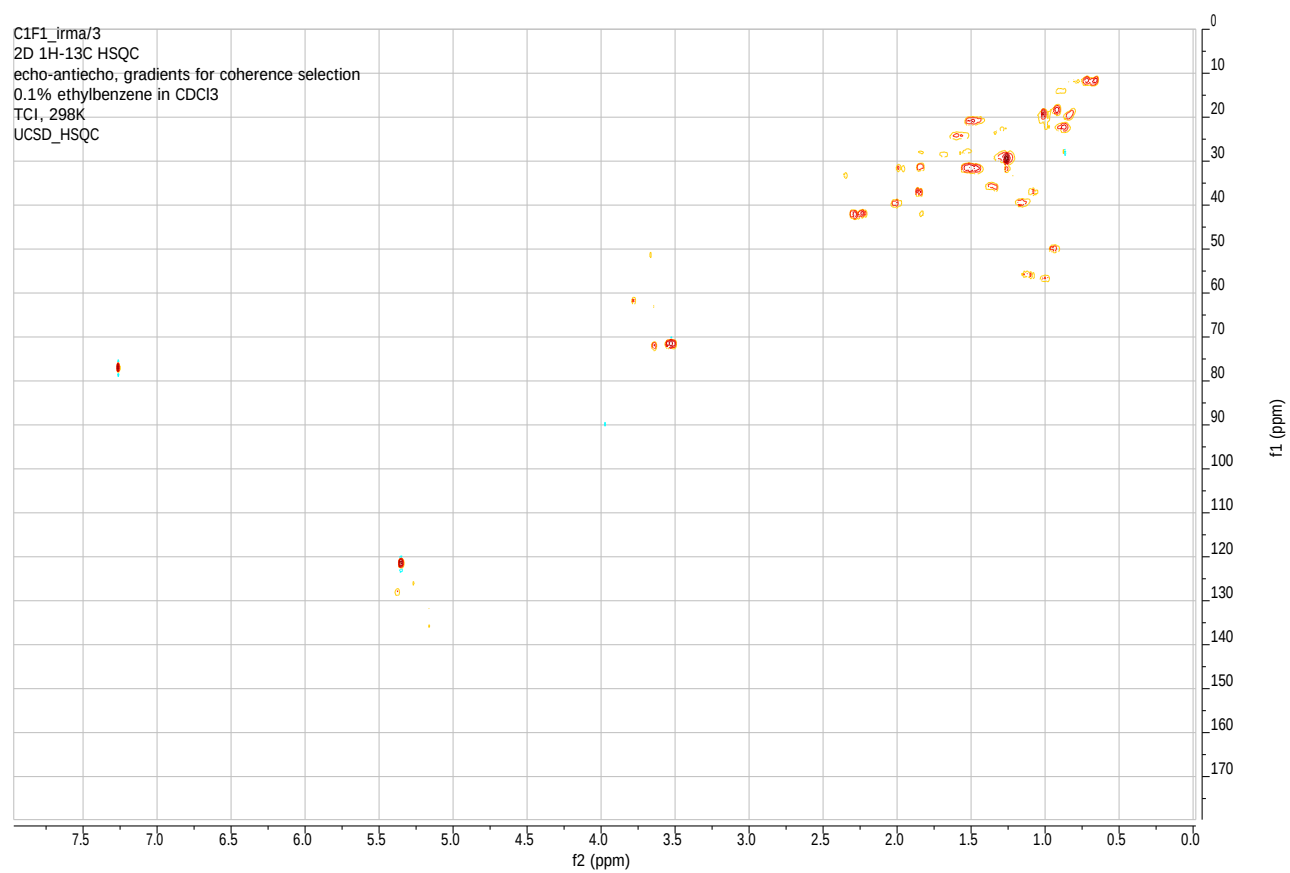


Figura 26. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) del compuesto esteroideal.

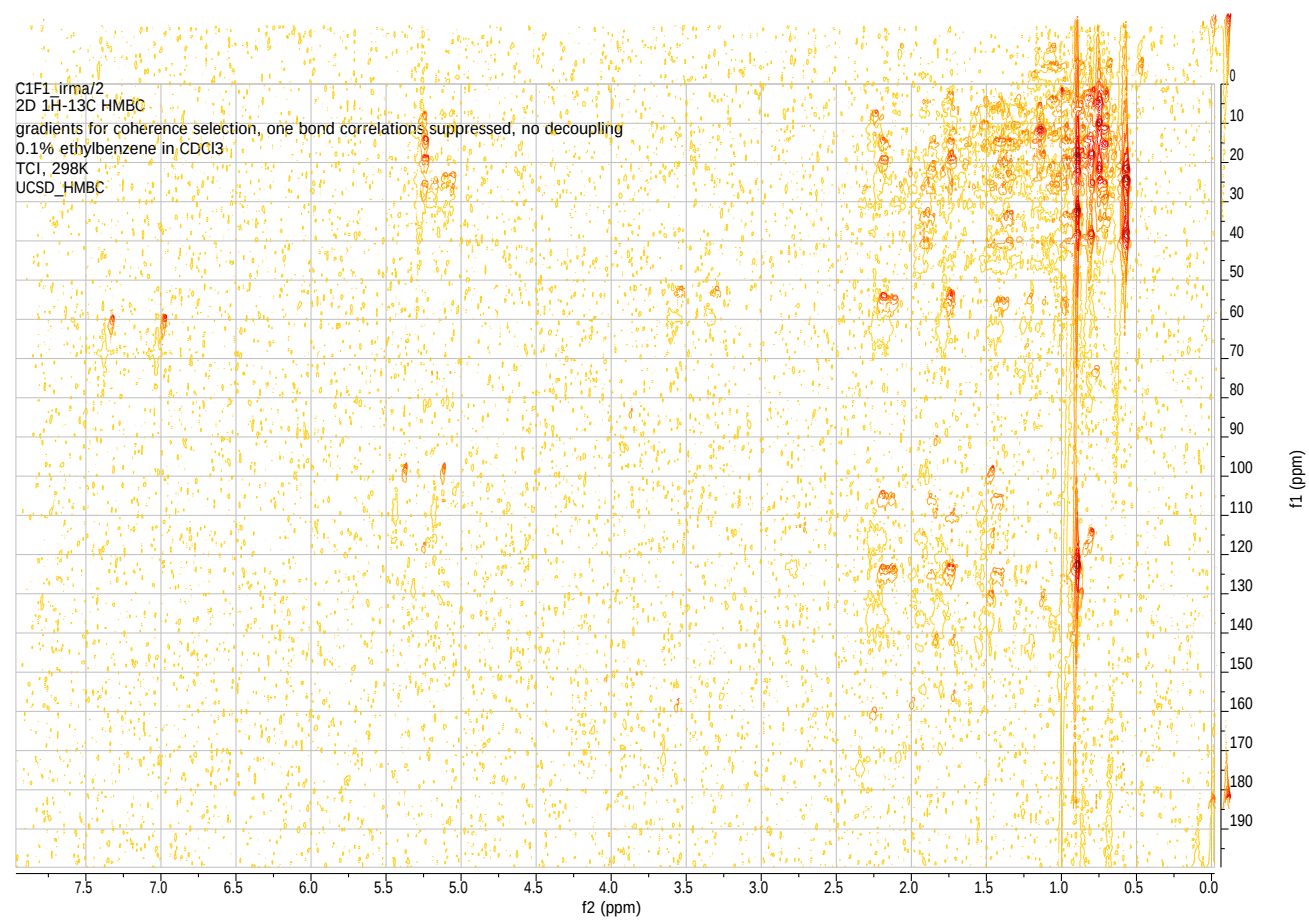


Figura 27. Espectro de Correlación espectroscópica ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence del compuesto esteroideal.

Tabla XXX. Correlaciones de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C del compuesto obtenido.

# Carbono	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm) (J)	^1H - ^{13}C COSY	^1H - ^{13}C HMBC
1a	37.2	1.86m		
1b		1.08		
2a	31.8	1.50 m	2b, 3	
2b		1.95 m	3	
3	71.8	3.50 (hep. 4.2, 4.8, 6.6 Hz)	2a, 4	1, 4, 11
4	42.3	2.28 dd (1.8, 4.8 Hz)	3	1, 2, 3
5	140	-----		
6	121.7	5.35 d (1Hz)	7	1, 2, 4, 5, 7, 15
7	126.2	5.21 d (8.4 Hz)	6	
8	138.1			12, 18
9	50.1	0.94 (m)	11	
10	36.5	-----		
11	21.08	1.48 m	9 12a	
12a	39.5	2.0 m	11, 12b	
12b		1.15 m		
13	42.2	-----		
14	56.76	0.99 m		1, 4, 9, 12
15	24.29	1.57 m		
16	28.2	1.68 m		
17	55.9	1.09 m		
18	19.04	1.01 s		9, 12, 16, 17, 20
19	29.6	1.25 s		6, 11, 19
20	35.7	1.37 m	21	
21	18.7	0.92 s	20	13, 17, 20
22	131.8	5.27 dd (6.6, 6.6 Hz)		
23	136	5.16 dd (6.6, 6.6 Hz)		
24	61.8	3.78 t (8Hz)	25	
25	31.6	1.51 m	24, 26	
26	22.5	0.86 d (2.4 Hz)	25	12, 16
27	14.1	0.87 d (2.4 Hz)		
28	11.85	0.68 d (2.4 Hz)		25, 26
OH		3.66 s		

7. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos sobre la frecuencia cardíaca en este trabajo dejan claro las variaciones que presentan estos organismos para este parámetro; diversos estudios con diferentes especies de mejillones han mostrado que éstos presentan diferentes tasas de latidos entre organismos de diferentes especies e incluso entre organismos de la misma especie. Sin embargo, como también se muestra en los resultados obtenidos, es posible establecer un ritmo constante cuando se tiene control sobre las condiciones de laboratorio.

Los experimentos realizados en mejillones de 8 cm de concha en este trabajo fueron controlados a una temperatura de 15°C y se obtuvo un promedio de 24 latidos por minuto; Estos resultados difieren de los valores obtenidos por Alarcón-Arteaga (2005) quien obtuvo un promedio de 15 latidos por minuto a 15°C en juveniles de *M. californianus* de 10 cm de longitud de concha; lo que concuerda con lo reportado por Toda (1981) quien encuentra que el número de contracciones decrece al aumentar la edad del organismo. Esta diferencia se explica en términos del efecto del tamaño de los organismos, pues al tener una mayor longitud, la edad de los organismos es mayor, y por lo tanto, su frecuencia cardíaca será menor debido al mayor tamaño de su corazón.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio se encuentra dentro del intervalo promedio de frecuencia cardíaca registrado por Braby y

Somero (2006) en tres especies del genero *Mytilus*; estos autores encontraron diferencias en el promedio de latidos por minutos en juveniles con un tamaño de 6 cm de longitud de concha; para *M. edulis* registraron una media de 21 y 26 latidos por minuto, para *M. trossolus* 26 y 35 latidos por minuto y para *M. galloprovincialis* 17 y 23 latidos por minuto a temperaturas de 14 y 21 °C respetivamente. También observaron la importancia de la temperatura sobre la frecuencia cardíaca, pues registraron un aumento en el número de latidos conforme se aumentaba la temperatura gradualmente desde 14 a 21°C; contrariamente, cuando la temperatura disminuía hasta 0°C, el número de latidos disminuía hasta llegar también a cero (Braby y Somero, 2006).

Es muy difícil realizar una estandarización de la fuerza de contracción promedio en corazones perfundidos de estos organismos, pues se ven involucrados diversos factores tanto fisiológicos como mecánicos; En un corazón perfundido es necesario colocar al corazón aislado del organismo conectado a un transductor de fuerza para que la fuerza de contracción sea enviada a éste, el corazón debe estar estirado y es aquí cuando se presenta la primera variable, pues si el corazón no se estira lo suficiente, hay un traslape de los filamentos que llevan a cabo la contracción y por lo tanto se pierde la fuerza de contracción al no haber un buen deslizamiento, además el poco movimiento ocasionado en lugar de dirigirse directamente al transductor de fuerza, se pierde en el agua circundante. Por otra parte un corazón demasiado estirado corre el riesgo de romperse al momento de ir aumentando la fuerza de contracción hasta estabilizarse, además de que este estiramiento excesivo

puede eliminar el traslape de los filamentos y no desarrollar tensión (Guyton, 1975). A pesar de las dificultades experimentales, fue posible establecer los valores normales y obtener una baja dispersión de los datos (Tabla 1), lo cual indica un enorme potencial de *Mytilus* sp. como organismo de prueba.

Aunque los organismos usados fueron de un mismo tamaño, esto no se reflejó en el tamaño y peso de los corazones lo que también conlleva a diferentes fuerzas de contracción aun con mínimas diferencias en cuanto al peso y tamaño del corazón. Todos estos factores llevan a lecturas de fuerza de contracción variables de un corazón a otro. Un ejemplo de estas variaciones las encontramos al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Alarcón- Arteaga (2005), que registró un promedio de fuerza de contracción de 0.58 g para *M. californianus*, mientras que en este trabajo se obtuvo un promedio de 2.17 g para la misma especie. Aun con estas variantes, esto no impide el uso del corazón de *M. californianus* como método de cribado, pues la metodología utilizada no requiere específicamente medir la fuerza que desarrolla el corazón, sino la diferencia de esta fuerza después de agregar un compuesto cardiotónico.

La digoxina ocasionó cambios en la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del corazón del mejillón, estos efectos se manifestaron más temprano sobre la frecuencia cardíaca disminuyéndola desde la primera concentración, a diferencia de la fuerza de contracción donde se requirió de una concentración mayor para que se notara el efecto, esto pudiera deberse a la manera en que actúa la digoxina sobre el corazón para disminuir su frecuencia.

Tomando en cuenta que la estimulación vagal conlleva a la disminución tanto de la frecuencia cardíaca como de la fuerza de contracción y que la estimulación del sistema simpático provoca un aumento de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción (Guyton, 1975), es de esperarse que al estimular los nervios vagos e inhibir el sistema simpático, también se produzca una disminución de la fuerza de contracción del corazón, por lo cual para que la digoxina provoque un aumento en la fuerza de contracción, primero tiene que compensar esa disminución ocasionada por la estimulación e inhibición del nervio vago y sistema simpático respectivamente. De esta manera el efecto inotrópico positivo de la digoxina se ve retrasada respecto al efecto cronotrópico negativo.

Aunque el método de acción de la digoxina ha sido descrita principalmente en mamíferos, es muy probable que sea el mismo para bivalvos; conociendo ya el método de acción de la digoxina para producir el efecto cronotrópico negativo y las similitudes que hay en la forma que el corazón de mamíferos y bivalvos es controlado por los nervios cardíacos (Kuwasawa y Hill, 1997), se puede entender por qué en algunos bioensayos al agregar la digoxina hubo una disminución de la fuerza de contracción como la que se observa en la figura 9, aunque después esa disminución se fue compensando al ir aumentando la concentración de digoxina.

El máximo efecto inotrópico positivo promedio se obtuvo con una concentración de digoxina de 2.5 μM , la cual aumentó la fuerza de contracción en un 27%, aunque se registraron individualmente aumentos de hasta 40 %;

Por otro lado, a la misma concentración de digoxina se obtuvo una disminución de la frecuencia de latidos del 66 %, registrándose individualmente disminuciones de hasta el 76 %. Estos valores no se alejan mucho de los obtenidos en otros bivalvos, por ejemplo en la almeja *Tivela stultorum* a concentraciones de 10 μ M de digoxina se han registrado efectos inotrópicos positivos que van desde 16 a 266% y efectos cronotrópico negativo que van desde 0 a 48% (Guerra-Rivas, 1994). En *M. californianus* Alarcón-Arteaga (2005) registró aumentos en la fuerza de contracción del 30 y 49 %, mientras que en la frecuencia cardíaca obtuvo disminuciones de 31 y 29 % a concentraciones de digoxina de 8 y 10 μ M.

A partir de la concentración 0.6 μ M de digoxina sobre *M. californianus*, se hizo notoria la acción inotrópica positiva, que fue creciendo conforme se aumentaba la dosis de digoxina hasta alcanzar un máximo de aumento del 27 % en la concentración de 2.5 μ M. Es importante señalar que a partir de 2.5 μ M el efecto inotrópico fue disminuyendo progresivamente hasta llevar al corazón a arresto cardíaco.

Con los porcentajes de cambios provocados por la digoxina se elaboró una curva de dosis-respuesta que demuestra que el corazón de *M. californianus* responde con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo a las diferentes concentraciones del digitálico. Aunque se probaron 10 concentraciones diferentes sólo se tomaron 8 valores para la curva de dosis-

respuesta ya que las concentraciones mayores a 2.5 μM resultaron ser tóxicas para el corazón del mejillón.

Con concentraciones similares de digitálico utilizadas en este trabajo, Toda (1981) encontró que 0.2 μM de ouabaína produce un aumento en la fuerza de contracción de corazones de conejo y concentraciones de 5 μM son tóxicas, produciendo inmediatamente arritmias que conllevan al arresto cardíaco. Hay que señalar que la ouabaína, compuesto perteneciente también a los digitálicos, es la sustancia con mayor eficacia inotrópica conocida con un valor relativo de 0.84, sólo superada por el calcio al que se da un valor de 1 (Pastelín-Hernández, 2002).

Es bien sabido que la digoxina tiene un margen terapéutico muy estrecho, lo que hace que sea una droga de alto riesgo. En humanos la concentración terapéutica es de 0.5 ng/ml a 2.0 ng/ml y la concentración toxica se considera a partir de 2.1-2.2 ng/ml (Conthe y Montoto, 2002); Esto último puede explicar el por qué el aumento en la fuerza de contracción de *M. californuanus* obtenido a 2.5 μM de digoxina en este trabajo no se mantiene después de pasar esa concentración, sino que disminuye drásticamente hasta llevar a un arresto cardíaco.

Otro factor que pudo estar involucrado en la toxicidad de la digoxina es el etanol que contiene este medicamento. En este trabajo se encontró que concentraciones mayores al 0.5 % de etanol son tóxicas para el corazón del mejillón, en las concentraciones de 0.2 -2.5 μM de digoxina el volumen final de

etanol era menor a 0.5 %; sin embargo las concentraciones mayores a 2.5 μ M ya presentan porcentajes de etanol superiores a 0.5% y se encuentran en el rango tóxico. Tanto la toxicidad de la digoxina por sí sola, como la toxicidad del etanol a porcentajes mayores a 0.5 % en el volumen final son factores que pudieron impedir obtener una curva de dosis-respuesta de mayor tamaño con concentraciones mayores del digitálico.

El extracto obtenido de *Ophioderma panamense* presentó cuatro fracciones con efectos inotrópicos y cronotrópicos, aunque sólo la fracción metanólica ocasionó aumentos mayores al 100% en la fuerza de contracción y una disminución de la frecuencia cardíaca de hasta el 60%; El hecho de que las cuatro fracciones tuvieran efecto inotrópico y cronotrópico pudiera deberse a que el compuesto activo estuviera presente en todas, ya que todas tenían un porcentaje de metanol; sin embargo, las primeras tres que tenían un porcentaje de agua presentaron efectos tóxicos tempranos, lo que hace suponer la presencia de algún otro compuesto tóxico soluble en agua.

Aun cuando la fracción metanólica se dividió en diferentes subfracciones, éstas también presentaron efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo, lo que pudiera sugerir la presencia de más de un compuesto con actividad cardiotónica, aunque también pudiera deberse al mismo compuesto presente en todas las subfracciones.

Respecto a la curva de dosis-respuesta que se elaboró con la fracción metanólica, se obtuvieron mayores porcentajes de aumento en la fuerza de contracción que los obtenidos con digoxina y porcentajes de disminución de la frecuencia cardíaca ligeramente menores a los de la digoxina. Además se pudo comprobar la estabilidad del extracto, la alta reproducibilidad y las bondades del método experimental para la evaluación de la actividad cardiotónica. Lo anterior se infiere debido a que en este trabajo se logró ocasionar el 50% de su máximo efecto para la acción inotrópica y cronotrópica, de manera repetitiva a una misma concentración en cinco bioensayos, donde el promedio para cada efecto fue similar al de la curva de dosis-respuesta.

El espectro de infrarrojo dio los primeros indicios de que los compuestos con actividad cardiotónica en el extracto de *O. panamensis* son de tipo esteroideal, ya que se observan las bandas que generalmente aparecen en este tipo de compuesto. Estas banda son: una banda de tensión O-H alrededor de $3400-3200\text{ cm}^{-1}$, bandas de tensión de enlace C-H saturados alrededor de $2960-2780\text{ cm}^{-1}$ y bandas de tensión de enlaces C=C olefínicos alrededor de 1670 cm^{-1} que generalmente es una banda débil que se observa poco (Martínez- Martínez, 2002).

En $^1\text{HRMN}$, generalmente en este tipo de compuestos con núcleo esteroideal, se observan las señales de protones metílicos de la cadena lateral en la región de 0-2 ppm con constantes de acoplamiento de 6-7Hz. El protón ligado al carbono 3 se observa como un heptete alrededor de 3.53 ppm cuando el hidroxilo está en posición 3β (Martínez-Martínez, 2002); en el espectro que se

obtuvo del compuesto purificado, también se observan señales que corresponde a protones metílicos en la región 0-2 ppm, además de una señal tipo heptete en 3.50 ppm que correspondería al protón del carbono 3 con un grupo OH.

En el espectro también se observa un doblete en 5.35 ppm, este tipo de señal también es común en esteroides con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, presentándose generalmente como un doblete ancho alrededor de 5.35 ppm (Martínez-Martínez, 2002).

Otro motivo para afirmar que el compuesto obtenido es un esteroide, son los singuletes que se observan a 1.25 ppm y 1.0 ppm que corresponden a los protones metílicos del C-19 y C-18 respectivamente; estas señales son características de este tipo de compuestos, teniendo un desplazamiento de 1.15 a 1.25 ppm para el C-19 y 0.95 a 1.0 ppm para el C-18 (Pereira *et al.*, 2009). Las señales que aparecen como dobletes en 0.87 y 0.86 ppm se asignaron, de acuerdo a la comparación con otros espectros de compuestos similares (Levina *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009), a protones metílicos correspondientes al C-27 y C-26 respectivamente y que interactúan con un único protón con un desplazamiento de 1.51 ppm. Además de los grupos metilo antes mencionados, es frecuente encontrar grupos metilo en C-24 y C-20 con desplazamientos de 0.70 ppm a 0.90 ppm (Martínez-Martínez, 2002; Levina *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009); en el espectro que se obtuvo en este trabajo también se aprecia un doblete en 0.68 ppm y otro en 0.92 ppm, por lo que se sugiere en este trabajo que el compuesto tiene metilos en C-24 y en C-20.

En el espectro de ^{13}C RMN también se observan las señales que caracterizan a un compuesto tipo esteroles, estas son: señales de 119 a 172 ppm que caracterizan a los carbonos C=C olefínicos, destacándose señales en 141 y 122 ppm que corresponden a los carbonos 5 y 6 del núcleo esteroide y 131 y 136 ppm que corresponden a los carbonos 22 y 23 de la cadena lateral; una señal a 72 ppm que corresponde al carbono 3 que contiene el grupo hidroxilo (Martínez–Martínez, 2002); Además, por comparación con otros compuestos, es fácil localizar otras señales características como los carbonos metílicos de la cadena lateral y dos adyacentes al núcleo localizados todos a campo alto del espectro (de 12 a 29 ppm) (Iñiguez-Martínez, 1995; Levina *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009).

Adicionalmente se revisaron bases de datos de RMN, donde se encontraron varios espectros con desplazamientos similares a los observados en nuestro compuesto, todos estos espectros pertenecen a esteroides que se han aislado tanto en organismos marinos como terrestres; al comparar los desplazamientos químicos en ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se pudo observar similitud los espectros obtenidos en este trabajo, con los espectros del fucosterol y ergosterol; es importante señalar que estos dos esteroides son muy similares entre sí (Base de datos de RMN 1 y 2).

La correlación de las señales se realizó con ayuda de los espectros en dos dimensiones ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC, con esto se pudo confirmar la estructura base del compuesto tipo esteroles y algunos de los sustituyentes que presenta, además de evidenciar similitud en la mayoría de las

correlaciones con las del ergosterol y fucosterol (Durán-Riveroll, 2009; Chaparro-Pedraza, 2010; base de datos 1).

Finalmente con todos los datos recabados, se pudo establecer y proponer la estructura química del compuesto con actividad cardiotónica aislado de *O. panamensis* enfatizando que el compuesto pudo haberse descompuesto durante el proceso y por tal motivo perdió una parte de la molécula original, la cual pudo haber estado sulfatada o bien glicosada. Lo anterior deberá probarse realizando estudios a fondo sobre la estructura con reacciones químicas de degradación de la molécula original, protegiéndola de la luz y el calor.

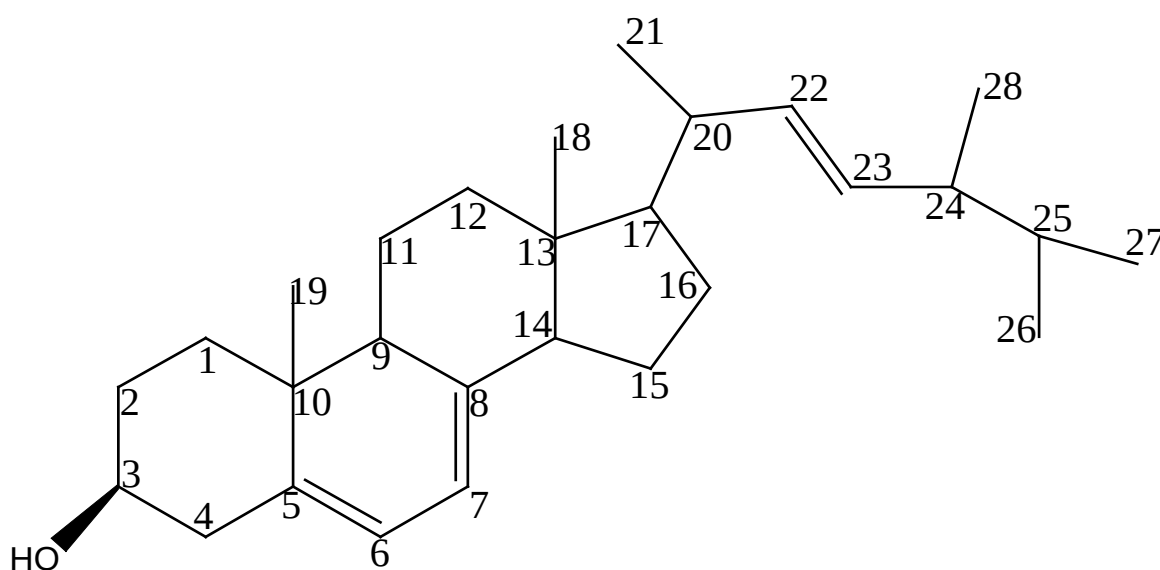


Figura 28. Estructura propuesta para el esteroil aislado del ofiúrido *Ophioderma panamense* con actividad cardiotónica.

8. CONCLUSIONES

1. El corazón del mejillón *Mytilus californianus* responde con efecto inotrópico positivo y cronotrópico negativo, ante diferentes concentraciones de digoxina.
2. La fuerza de contracción del corazón de *Mytilus californianus*, aumenta conforme se incrementa la dosis de digoxina hasta llegar a la dosis tóxica.
3. La frecuencia cardíaca del corazón de *Mytilus californianus*, disminuye conforme se incrementa la dosis de digoxina hasta llegar a la dosis tóxica.
4. A concentraciones de digoxina mayores que 1.6 μM , el efecto tóxico sobre *M. californianus* se manifiesta primero como una alteración de la frecuencia cardíaca y posteriormente, como un arresto en la contracción muscular
5. El corazón de *Mytilus californianus* es adecuado para realizar el cribado de compuestos cardiotónicos.
6. El ofiuroideo *Ophioderma panamense* sintetiza metabolitos con efectos inotrópicos positivos y cronotrópico negativos.

7. Los metabolitos con actividad cardiotónica de *O. panamense* son del tipo esteroideal.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alarcón-Arteaga, G., 2005. Evaluación del Corazón de *Mytilus californianus* como modelo biológico en la búsqueda de cardiotónicos y su aplicación para la valoración de extractos de *Anthopleura elegantissima* y *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias marinas. Ensenada, B. C.
- ApSimon, J. W., J. A. Buccini y S. Badripersaud, 1972. Marine organic chemistry: isolation of 3 β , 6 α - *dihydroxy*- 5 α - Pregn-9(11)- en 20-one from the saponins of the starfish *Asterias forbesi*: a rapid method for extracting starfish saponins. Foods and drugs from the sea. Worthen. USA.
- Bartosz G., A. Finkelshtein, T. Przygodzki, T. Bsor, N. Nesher, D. Sher y E. Zlotkin., 2008. A pharmacological solution for a conspecific conflict: ROS-mediated territorial aggression in sea anemones. Toxicon 51, 1038–1050.
- Base de datos de RMN 1: Spectral Database for Organic Compounds SDBS.
http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng
- Base de datos de RMN 2: datos de sustancias estándar en metabolómica.
http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/metabolomics_standards.html
- Brandt, R. R., S. Wright y M. M. Red Field, 1993. Atrial Natriuretic Peptide in Heart Failure. J Am Coll Cardiol. 22 (supl. A): 86A-92A.

- Benítez-Villalobos, F., 2000. Comparación de la comunidad de Equinodermos asociada a arrecifes en dos localidades de las Bahías de Huatulco, Oaxaca, México. Ciencia y Mar. Universidad del Mar.
- Butler, M. T. and Siegman, J. M., 2010. Review article. Mechanism of catch force: Tethering of thick and thin filaments by twitchin. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2010, Article ID 725207, 20 pages.
- Caso-Muñoz, M. E., A. Laguarda-Figueras, F. A. Solís-Marín, A. Ortega-Salas y A. L. Duran-González, 1993. Contribución al conocimiento de la ecología de las comunidades de Equinodermos de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- Céspedes-Valcarcel, A., A. Corral-Salvado., C. Díaz-Olivera., y Y. Morales-Fundora., 1999. Efecto del *Nerium oleander* L. En modelo de corazón aislado de cobayo. Rev Cub. Plant Med. 3(2):74-8
- Chanley, J. D., R. Leeden., J. Wax., R.F. Nigrelli and H. Sobotka., 1959. Holothurin I. The isolation properties and sugar components of holothurin. J. Am. Chem. Soc. Vol. 81, pp. 5180.
- Chaparro-Pedraza, A. P., 2010. Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.

- Cline, E. I. and M. W. Wolowyk., 1997. Cardiac Stimulatory, Cytotoxic and Cytolytic Activity of Extracts of Sea Anemones. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 35, No. 2, Pages 91-98.
- Conthe, P. y Montoto, C., 2002 Dosificación de digoxina: lo habitual y lo óptimo. *An Med Interna (Madrid)*; 19: 329-330.
- Cuellar-Roheri, M., 1991. Utilización de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) como organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B.C.
- D' Auria, M. V., Gomez, P. L., Minale, L., Riccio, R., and Zampella, A., 1995. On the composition of sulfated polyhydroxysteroids in some ophiuroids and the structure determination of six new constituents. *Journal of Natural Products*. Vol. 58, No. 2, pp. 189-196,
- Del Valle-Mondragón, L., Torres-Narváez, J.C., Zarco-Olvera, G., Tenorio-Lopez, F.A., Pastelín-Hernández, G., 2003. Estudio de la relación entre las características electromoleculares de los digitálicos y su acción farmacológica. *Arch Cardiol Mex*. Vol. 73 Número 1:11-17
- Durán-Riveroll, L. M., 2009. Estudio de la actividad frente a bacterias patógenas de cinco especies algales: pros y contras del protocolo de aislamiento guiado por bioensayo. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S.
- El-Sherif, N., Fozzard, H. A. and Hanck, D. A., 1992. Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATX II. *Circ Res* 70 285-301.

Fieser, L. F y M. Fieser., 1944. Organic Chemistry. D. C. Heath and company. U. S. A. 1091 pp.

Fieser, L. F y M. Fieser., 1959. Steroid. Reinhold; 7: 27.

Flores-Pérez, F. I y Pérez-Martínez, M., 2006. Avances en el estudio de la fisiología y patología endotelial en modelos animales. Vet. Méx., 37 (2). P 239-261.

Fusetani, N., S. Matsunga, y S. Konosu., 1981. Bioactive Marine Metabolites II. Halistanol sulfate, an anti-microbial novel steroid sulfate from the marine sponge *Halichondria* cf. *moorei* Berquist. Tetrahedron Lett. 22,1986-1988

Garateix, A., Vega, R., Salceda, E., Cebada, J., Aneiros, A. and Soto, E., 2000 BgK anemone toxin inhibits outward K currents in snail neurons. Brain Research 864 312-314.

Gorshkova, I.A., V.A. Gorshkov and V.A. Stonik.I., 1989. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺- ATPase by triterpene glycosides from holothurians. Toxicon. 27 (8):927-936.

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. Ensenada, B.C.

Guyton, C. A., 1975. Fisiología humana. Cuarta edición. Nueva Editorial Interamericana. Pag. 240.

Hauptman, P. J and Kelly, R.A., 1999. Digitalis. Circulation; 99: 1265-1270.

- Helm H, Backenfeld T, Muller B, Waaler T. Electroverneinend aufbave bei steroiden. *Helv Chim Acta* 1985; 68: 300-314. p 24-26, 68-71, 114-116, 135-137, 245, 268, 381-390.
- Hernández-Herrejón, L. A., Solis-Marin, F. A., y Laguarda-Figueras, A., 2008. Ofiuroideos (Echinodermata: Ophiuroidea) de las aguas mexicanas del golfo de México. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 56 (Suppl. 3): 83-167.
- Herrmann, M., Lorenz, H.M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W., Kalden, J.R., 1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 22: 5506-5507.
- Honma, T. and K. Shiomi., 2005. Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. Review Article, *Marine Biotechnology*. Volume 8, 1–10.
- Iñiguez-Martínez, A. M. M., 1995. Determinación de la estructura de un componente del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja california.
- Johnson, H. W. and Twarog, M. B., 1959. The basis for prolonged contractions in molluscan muscle. *The Journal of General Physiology*. 43, 941-960.
- Katzung, B. G. 1983., Cardiac Glycosidea. En: *Essentials of Pharmacology*. 3rd edition. J. A: Bevan y J. H. Thompson (Eds.) Harper and Row. USA. 916 pp.
- Kobayashi, J., Ishibashi, M., Nakamura, H.; Ohizumi, Y., 1989. Hymenosulphate, a novel sterol with Ca-releasing activity from the

- cultured marine haptophyte *Hymenomonas* sp. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 101- 103.
- Kuwasawa, K. y Hill, B. R., 1997. Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. The Journal of Experimental Biology. 200, 2123-2135.
- Laguarda-Figueras, A., Hernández-Herrejón, L. A., Solís- Marín, F. A. y Duran-González, A., 2009. Ofiuroideos del Caribe Mexicano y Golfo de Mexico.
- Levina, E. V., Kalinovskl, A. I., and Dmitrenok, P. S., 2006. Steroids compounds from the far east Starfish *Pteraster obscurus* and the ophiura *Asteronyx loveni*. Russian Journal of Bioorganic chemistry, Vol. 33, No. 3, pp. 341-346
- Lowry, O. H., Rosebrough, J.N., Farr, L.A y Randall, J.R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193 (1):265-275.
- Lufrano P., Starita, S. Y Baldin, O., 1982. Actividad Cardiotónica de las semillas de *Mandevilla pentlandiana* (A .DC .) Woodson. Acta Farmaceutica Bonaerense 1 (1): 3-11.
- McKee, C. T., H. J. Cardellina, R. Riccio, M. V. D'Auria, M. Iorizzi, L. Minale, A. R. Moran, J. R. Gulakowski, B. J. McMahon, W. R Buckheit, M. K. Snader and R. M. Boyd., 1994. HIV-Inhibitory Natural Products. 11. Comparative Studies of Sulfated Sterols from Marine Invertebrate. J.

Med. Chem. 37, 793-797

- MacGowan, DU C, Koretzky AP., 2001: High calcium and dobutamine positive inotropy in the perfused mouse heart: myofilament calcium responsiveness, energetic economy, and effects of protein kinase C. BMC Physiol; 1(1): 12.
- Maier M. S., Araya, E., and Seldes, A. M., 2000. Sulfated Polyhydroxysteroids from the Antarctic Ophiuroid *Gorgonocephalus Chilensis*. Molecules.
- Maier M. S. and Murray, A. P., 2006. Secondary Metabolites of Biological Significance from Echinoderms. En: *M. Fingerman, R. Nagabhushanam*. (Ed), Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms. Science Publishers, New Hampshire.
- Maier, M. S., 2007. Metabolitos secundarios bioactivos de organismo marinos pertenecientes al phylum Echinodermata. Industria y Química. Vol.355 p.4-8.
- Martínez- Martínez, A., 2002. Esteroles. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.
- Mendez, R., 1986. Doscientos años de digital. Arch Inst Cardiol Mex. 56: 339-348.
- Michaeldis, B., Rofalikou, E., Beis, E., 1993. The effect of serotonin (5-Hydroxytryptamine) on glycolysis in the perfused ventricle of the freshwater bivalve *Anodonta cignea*: Evidence for phosphorylation/dephosphorylation control of phosphofructokinase. J. Exp. Biol. 180, 15-25.

- Miljanich, G., 1997. Venom peptides as human pharmaceuticals. *Science and Medicine* 6-15
- Natasu, T., Walker, R. P., Thompson, J. E., Faulkner, D. J., 1983. Biologically-active esterol sulfates from the marine sponge *Toxadocia zum. Ezperientia*. 99, 759-761.
- Norton, T., Shibata, S., Kashiwagi, M., Bentley, J., 1975. Isolation and characterization of the cardiogenic polypeptide anthopleurin-a from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 65, Issue 9, Pages: 1368-1374.
- Pastelín-Hernández, G., 2002. Farmacología de los agentes inotrópicos. *Arch Cardiol Mex*. Vol. 72 Supl. 1. 156-162.
- Pereira, A., Pfeifer, T. A., Grigliatti, T. A., and Andersen, R. J., 2009. Functional cell-based screening and saturation transfer double-difference NMR have identified Haplosamate A as a Cannabionoid receptor agonist. *ACS chem. Biol.*, 4(2), 139-144.
- Perez-Plascencia, G., 1991. Efectos hematológicos del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias marinas. Ensenada, B. C.
- Prieto-González, E. A., Llópiz-Janer, N. D., 1999. Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Rev Cubana Invest Bioméd*; 18(1): 34-36.

- Quinn, R., Kashiwagi, M., Norton, T., Shibata, S., Kuchii, M., 1974. Antitumor activity and cardiac stimulatory effects of constituents of *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(11): 1798-1800.
- Ramírez-Ortega, M. C., Maldonado-Lagunas, V., Meléndez-Zajgla. J., Zarco-Olvera, G., Ávila-Casados, M. C., Suárez-Munguía, J., Pastelín-Hernández, G., 2002. Mecanismo de toxicidad celular inducida por digitálicos. Estudio con ouabaína. *Arch Cardiol Mex* Vol. 72 Supl. 1: S171-S176.
- Retuerto, F., Arbaiza, E., Quiroz-Garrido., Estrada, R., Y Zavala, J., 2007. Actividad biológica del veneno de *Anthothele chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae). *Rev. peru biol.* vol.14, no.2, p.277-282.
- Ríos- Jara, E., Galván- Villa, C. M., y Solís- Marín, F. A., 2008. Equinodermos del Parque Nacional Isla Isabel, Nayarit, México. *Revista mexicana de Biodiversidad* 79: 131-141.
- Roccatagliata, J. A., M. S. Maier, A., M. Seldes., C. Pujol y E. B. Damonte, 1996. Antiviral Sulfated Steroids from the Ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J. Nat. Prod.* 59, 887-889.
- Rosas-Peralta, M., Attie, F., 2007. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Arch Cardiol Mex*; 77: 91-93.
- Schmidt, T. A. y Kjeldsen K., 1998. Human myocardial Na,KATPase quantification regulation and relation to Ca. *Cardiovasc Res.* 37: 335-345.

- Shibata, S., Dunn, D.F., Kuchi, M., Kashiwagi, M. and Norton T.R., 1974. Cardiac stimulant action of extracts of coelenterates on rat atria. *J. Pharm. Sci.* 63: 1332–1333.
- Singh, N. F., Mc Coy, M. T., Tice, R. R., Scheneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*;175:184-91.
- Solís- Marín, F. A., Reyes- Bonilla, H., Herrero- Pérezrul, M. D., Arizpe- Covarrubias, O., Laguarda- Figueras, A., 1997. Sistemática y distribución de los Equinodermos de la Bahía de la Paz. *Ciencias Marinas*. Vol. 23, Número 002. Pp. 249-263.
- The digitalis investigation group., 1997. The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 336. Number 8. 525-533.
- Toda, N., 1981. Cardiotoxic and inotropic effects of ouabaína on atria isolated from rabbits of different ages. *Br. J. Pharmac.* 72, 263-270.
- Vásquez-Antona, C., 2007. La prevención primaria de la enfermedad cardiovascular inicia en la infancia. *Arch Cardiol Mex.* 77: 7-10.
- Wiesner K, TSAI T., 1986. Some recent progress in the synthetic and medicinal chemistry of cardioactive steroid glycosides. *Pure Appl Chem.* 58: 799-810.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Fourth edition. New Jersey. 663 pp..

Zaixzo, E. H., 2003. Sistema nervioso y receptores en la cholga: *Aulacomya atra atra* (Bivalvia: Mytilidae). Revista de Biología Marina y oceanografía. 38(2):43-56.