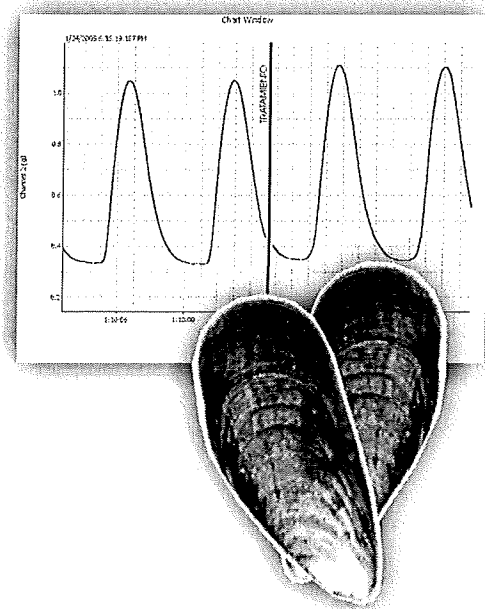


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Marinas



EVALUACION DEL CORAZON DE *Mytilus californianus* COMO MODELO BIOLÓGICO EN LA BUSQUEDA DE CARDIOTONICOS Y SU APLICACION PARA LA VALORACION DE EXTRACTOS DE *Anthopleura elegantissima* y *Stichopus parvimensis*



TESIS
que para obtener el título de

OCEANOLOGO
presenta:
GABRIELA ALARCON ARTEAGA

Ensenada, Baja California, Julio de 2005

RESUMEN

Se validó el uso del corazón de mejillón *Mytilus californianus* como modelo biológico para la búsqueda, en Farmacología Marina, de sustancias con potencial cardiotónico. Se realizaron varios experimentos para probar el efecto de la digoxina comercial a dos concentraciones, 8 y 10 μM , sobre el ventrículo de corazón suspendido en agua de mar y conectado a un fisiógrafo. Mediante este aparato se registró el latido del corazón y se obtuvieron los valores de fuerza de contracción, frecuencia cardíaca y velocidad de contracción, antes y después del tratamiento. Para ambas concentraciones se encontró un aumento significativo ($\alpha= 0.05$) en la fuerza de contracción y una disminución significativa en la frecuencia cardíaca. A nivel bioquímico se midió la inhibición de la $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ y se encontró una actividad de $79.45 \pm 15.99\%$ y del $79.36 \pm 12.71\%$ para las concentraciones de 8 y 10 μM respectivamente. Con base en los resultados obtenidos se concluyó que el corazón de *M. californianus*, puede ser usado como modelo biológico para la identificación de sustancias cardiotónicas.

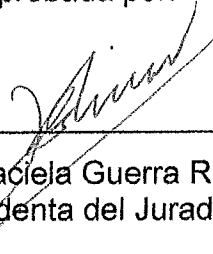
Adicionalmente se obtuvieron extractos de *Anthopleura elegantissima* y *Stichopus parvimensis*. Dichos extractos fueron probados mediante un ensayo para medir la inhibición de cada extracto sobre la $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPasa}$. A partir de estos datos se midió en el fisiógrafo el efecto de varias concentraciones de dos extractos, TD y pepino, sobre el ventrículo de *M. californianus*. TD, a una concentración de 35.83 $\mu\text{g/ml}$ mostró un aumento significativo en la fuerza de contracción pero no en la frecuencia cardíaca ($\alpha= 0.05$). El extracto de pepino a una concentración de 0.52 mg/ml mostró un aumento significativo ($\alpha= 0.05$) en la fuerza de contracción pero no en la disminución de frecuencia cardíaca del ventrículo de mejillón. Concentraciones más altas de este extracto mostraron efectos tóxicos.

EVALUACION DEL CORAZON DE *Mytilus californianus* COMO MODELO
BIOLOGICO EN LA BUSQUEDA DE CARDIOTONICOS Y SU APLICACION
PARA LA VALORACION DE EXTRACTOS DE *Anthopleura elegantissima* y
Stichopus parvimensis

TESIS
que presenta

GABRIELA ALARCON ARTEAGA

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Presidenta del Jurado



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal



M. C. Antonio Silva Loera
Sinodal

El presente trabajo fue apoyado por:

La Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica con fondos otorgados para la Reincorporación de la Dra. Graciela Guerra Rivas a la planta de Profesores de la Facultad de Ciencias Marinas a través del Programa de Becas para el Mejoramiento del Profesorado.

La Universidad Autónoma de Baja California con fondos de la Novena Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación.

A mi madre

Por ser un ejemplo y ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi padre

Porque siempre te llevo en mi corazón.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dra. Graciela Guerra Rivas, por aceptarme en este proyecto y ser una guía en todo momento. Gracias por su paciencia, tiempo y consejos para la realización de esta tesis, pero sobre todo por su amistad y apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A la M. C. Claudia M. Gómez Gutiérrez, por su apoyo constante en el laboratorio, en la colecta de organismos, y en los detalles técnicos de esta tesis. Gracias por tu amistad y por escuchar mis problemas y dudas.

A la Dr. Beatriz Cordero Esquivel y a la P. Biol. Patricia Ascencio Padilla, por el alimento para los mejillones, y por estar dispuestas a ayudar en todo momento.

Al M. C. Francisco Becerril por su ayuda en la colecta de los pepinos de mar.

A Leonardo Ruíz Montoya por ayudarme a cuidar de los mejillones y a Magali Cruz Roldán, por todo su apoyo en el laboratorio.

A la Dra. Graciela Guerra Rivas, M. C. Claudia M. Gómez Gutiérrez, M. C. Leticia Lezama Monfil y al oceanólogo Alberto Sosa Hernández por su apoyo en la colecta de mejillones.

A mi madre, por su apoyo y amor incondicional durante toda mi vida pero sobre todo para realizar esta tesis.

A toda mi familia, por ser un constante apoyo sin importar la distancia, en especial a mis primas Ale, Carmen y Rosario por ser como unas hermanas para mí.

A mi tía Consuelo Arteaga por que con tu vida eres el mejor ejemplo de paciencia, fe, esperanza y amor, gracias por todo lo que me has dado.

A la Sra. Eduviges Origel Liceaga, por ayudarme a encontrar el camino cuando más lo necesitaba; y a Carla, Adriana y Lupita, por todos los recuerdos felices de mi niñez.

A Juan Carlos, Rogelio, Caro, Iliana, Miriam y Lillie por su amistad y por todos los grandes momentos.

ÍNDICE

	Página
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
2.0 ANTECEDENTES.....	10
3.0 OBJETIVOS.....	15
4.0 METODOLOGÍA.....	16
4.1.1 Colecta y mantenimiento del organismo de prueba.....	18
4.1.2. Efecto fisiológico.....	18
4.1.2.1 Tratamiento de datos para la evaluación de parámetros fisiológicos.....	21
4.1.3 Efecto bioquímico.....	21
4.1.3.1 Preparación de homogenados.....	21
4.1.3.2 Ensayo enzimático.....	22
4.1.3.3 Determinación de Fosfatos (Marsh, 1959).....	23
4.1.3.4 Determinación de Proteínas (Lowry et al., 1951).....	24
4.1.3.5 Tratamiento de datos para la cuantificación de la Na ⁺ K ⁺ ATPasa.....	24
4.2 Cribado de sustancias cardiotónicas.....	25
4.2.1 Obtención de los extractos de anémona.....	25
4.2.2 Obtención del extracto de pepino.....	26
4.2.3 Medición del efecto de cada extracto.....	27
4.3 Análisis estadístico.....	27
5.0 RESULTADOS.....	28
5.1 Validación del corazón de mejillón como modelo biológico.....	28
5.1.1 Parámetros fisiológicos y biométricos de <i>M. californianus</i>	28
5.1.2 Efectos fisiológicos del Lanoxin, M. R. sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	28
5.1.2.1 Efecto del blanco sobre la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción del corazón de <i>M. californianus</i>	27
5.1.2.2 Efectos fisiológicos del Lanoxin, M. R. sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	28
5.1.2.3 Efectos bioquímicos de la digoxina sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	37

5.2 Cribado de sustancias cardiotónicas utilizando el corazón de <i>M. californianus</i>	37
5.2.1 Efectos bioquímicos de los extractos sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	38
5.2.2 Efectos fisiológicos de los extractos sobre el corazón de <i>M. californianus</i>	42
6.0 DISCUSIÓN.....	45
7.0 CONCLUSIONES.....	59
8.0 RECOMENDACIONES.....	60
9.0 BIBLIOGRAFÍA.....	61
10.0 ANEXOS.....	66

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Parámetros fisiológicos y biométricos de <i>M. californianus</i> ; los valores se refieren al promedio de datos obtenidos para cada corazón antes de agregar el digitálico. Se utilizaron 30 organismos del mismo lote.....	29
Tabla II. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de 0.05% de etanol.....	30
Tabla III. Fuerza de contracción antes y después de la adición de 0.05% de etanol.....	30
Tabla IV. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de Lanoxin M. R. en concentración 8 μ M.....	31
Tabla V. Fuerza de contracción antes y después de la adición de Lanoxin M.R. en concentración de 8 μ M. Los valores de fuerza después del tratamiento corresponden a un promedio de seis valores de fuerza máxima.....	33
Tabla VI. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de Lanoxin M. R. 10 μ M.	34
Tabla VII. Fuerza de contracción antes y después de la adición de Lanoxin M.R. 10 μ M. Los valores de fuerza corresponden a un promedio de los seis valores de fuerza máxima post-tratamiento.....	35
Tabla VIII. Efecto del extracto de tentáculo de anémona en acetona, TAA1, en la actividad de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa (n=2).....	38
Tabla IX. Efecto del extracto de tentáculo de anémona en acetona, TAA2, en la actividad de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa (n=2).....	39
Tabla X. Efecto del extracto de tentáculo de anémona en acetona, TAA3, en la actividad de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa (n=2)	39
Tabla XI. Efecto del extracto de cuerpo de anémona en acetona, CAA2, en la actividad de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa (n=2)	39

Tabla XII.	Efecto del extracto de pie de anémona en acetona, PAA1, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).	40
Tabla XIII.	Efecto del extracto de pie de anémona en acetona, PAA2, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).....	40
Tabla XIV.	Efecto del extracto de tentáculo de anémona en diclorometano, TD, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).....	40
Tabla XV.	Efecto del extracto de cuerpo de anémona en diclorometano, CD, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).....	41
Tabla XVI.	Efecto del extracto de pie de anémona en diclorometano, PD, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).....	41
Tabla XVII.	Efecto del extracto de pepino, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).....	41
Tabla XVIII.	Efecto del extracto TD sobre la frecuencia cardíaca de <i>M. californianus</i> (n= 6).....	43
Tabla XIX.	Efecto del extracto TD sobre la fuerza de contracción del corazón de <i>M. californianus</i> (n= 6).....	43
Tabla XX.	Efecto del extracto de pepino, 0.5208 mg/ml, en la frecuencia cardíaca del corazón de <i>M. californianus</i>	44
Tabla XXI.	Efecto del extracto de pepino, 0.5208 mg/ml, en la fuerza de contracción del corazón de <i>M. californianus</i> .	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de contracción y relajación a nivel celular en el corazón del humano. (Adaptado de Purves et al., 1998).....	4
Figura 2. Estructura de digitoxina, un glucósido cardíaco típico. (Tomado de Katzung, 1983).....	6
Figura 3. Metodología para la validación del corazón de <i>M. californianus</i> como modelo para el cribado de sustancias cardiotónicas y la obtención y cribado de sustancias de origen marino.....	17
Figura 4. Localización de las diferentes áreas de colecta.....	19
Figura 5. Diagrama del fisiógrafo. El corazón de <i>M. californianus</i> se coloca en una cámara de prueba con aireación, y mediante un gancho se une al transductor de fuerza que mide la fuerza del latido del corazón. El transductor envía la información al PowerLab 10T que a su vez manda la información a una computadora que grafica la fuerza del latido del corazón.....	20
Figura 6. Registro típico del corazón de <i>M. californianus</i> sin tratamiento. Se observan seis latidos, cada punto corresponde a un máximo o mínimo, y cada color denota un latido diferente. Al dividir la fuerza de contracción entre el tiempo de contracción se obtuvo la velocidad de desarrollo de fuerza de contracción.....	22
Figura 7. Patrón común en el latido del corazón de <i>M. californianus</i> , después de agregar Lanoxin M. R. a una concentración de 10 μ M. Se observan diferencias en la fuerza del latido pero no en la frecuencia del mismo.....	36
Figura 8. Patrón común en el latido del corazón de <i>M. californianus</i> , después de agregar Lanoxin M. R. a una concentración de	

10 μ M. Se observan bloques de latidos..... 36

Figura 9. Registro del efecto de extracto de pepino de mar sobre la fuerza de contracción de *M. californianus*. Se muestra el aumento en la línea base acompañado de un aumento en la fuerza de contracción..... 45

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la dinámica poblacional se ha caracterizado por una baja tasa de nacimientos y muertes. Actualmente, una de cada diez personas tiene 60 años o más; además se calcula que para el 2050, una de cada cinco será mayor de 60 años (United Nations, 2003). La tendencia al aumento en la longevidad conlleva nuevos problemas a nivel global; uno de ellos es la necesidad de nuevos fármacos para combatir enfermedades como hipertensión, cáncer, diabetes, problemas cardíacos y embolias. Para satisfacer esta creciente demanda de nuevos fármacos, se han aislado sustancias activas de plantas y animales terrestres. Al menos 10,000 de las más de 400,000 especies de plantas han sido analizadas química y farmacológicamente en cierto grado (Doig III et al., 1973). Hasta la década pasada, más del 50% de los fármacos comercializados se podían obtener a partir de fuentes naturales o ser sintetizados utilizando productos naturales como materia prima (National Research Council, 1999).

Aproximadamente el 80% de los animales del planeta vive en los océanos, lo que comprende alrededor de 500,000 especies. En dichos organismos se pueden encontrar biotoxinas que pudieran ser bioactivas; sin embargo, menos del 1% de estos compuestos han sido examinados para su actividad farmacológica. Al parecer, las moléculas de organismos marinos son más potentes que sus

contrapartes terrestres, por lo que se pueden requerir dosis más pequeñas al ser utilizadas como fármacos (Doig III et al., 1973). Desde mediados de la década de los años setenta, se han intensificado diversas investigaciones para el descubrimiento de fármacos de origen marino, entre las que se encuentran anticancerígenos, antibióticos, anticoagulantes, antimicóticos, antiinflamatorios y antivirales (National Research Council, 1999; Mayer y Hamann, 2004). Debido a la necesidad de nuevos fármacos y a la gran diversidad de especies y de toxinas que tienen los organismos marinos, es necesario continuar su estudio para la obtención de sustancias que puedan tener un valor medicinal.

Entre los fármacos que se requieren buscar están las sustancias que aumenten la fuerza del latido del corazón, ya que existe una gran mortandad debido a enfermedades cardíacas en todo el mundo. En México, las principales causas de mortalidad son la diabetes mellitus y las enfermedades isquémicas del corazón. Tan solo en el 2002, estas dos enfermedades, ocasionaron el 37.6% de las defunciones totales por enfermedades de causa bien definida (Secretaría de Salud, 2002). En países desarrollados, el problema es similar, se estima que en el 2001 murieron por insuficiencia cardíaca congestiva 52,828 personas en Estados Unidos y que en el 2002, 4.9 millones de estadounidenses padecían esta enfermedad además de que se diagnosticaron 550,000 nuevos casos; el costo de esta enfermedad se estima para el año 2005 de \$27.9 billones (millón de millón) de dólares en Estados Unidos (American Heart Association, 2005).

El corazón es el órgano que se encarga de hacer circular la sangre alrededor del cuerpo. En los humanos, este órgano está constituido por cuatro cámaras: dos aurículas y dos ventrículos. La parte derecha del corazón envía la sangre hacia los pulmones, donde es oxigenada. La parte izquierda es la encargada de enviar la sangre, ya oxigenada, al resto del cuerpo. El latido del corazón se puede dividir en dos momentos: la sístole, o contracción, y la diástole o relajación (Randall et al., 2002).

A nivel celular, el corazón humano está compuesto por células cardíacas o miocitos, que a su vez pueden ser divididos en miofibrillas. En las miofibrillas se encuentran filamentos delgados de actina con un complejo de proteína llamado troponina distribuido a distancias regulares. La troponina tiene un sitio especial para la unión del ión calcio. También se observan, formando parte de las miofibrillas, filamentos gruesos de miosina; estos filamentos tienen unas cabezas globulares de miosina, agrupadas de tres en tres, a todo lo largo del filamento. Durante la excitación, previo a la contracción, se da un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, el ión se une a la troponina-C, modificándola. Esta modificación permite la unión de las cabezas de miosina con la actina, lo que a su vez provoca un deslizamiento de los filamentos y por lo tanto la contracción. Cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye dentro de la célula se separan los filamentos de actina y miosina produciéndose la relajación (Ferrari y

Opie, 1992; Purves et al., 1998). En la figura 1 se muestra un esquema con la relación entre actina y miosina que producen la contracción. Aunque el mecanismo de contracción es muy eficiente, una mala alimentación, falta de actividad física o problemas congénitos pueden producir enfermedades cardíacas. Entre las medicinas más utilizadas para tratar los problemas cardíacos están los digitálicos como la digoxina y ouabaina.

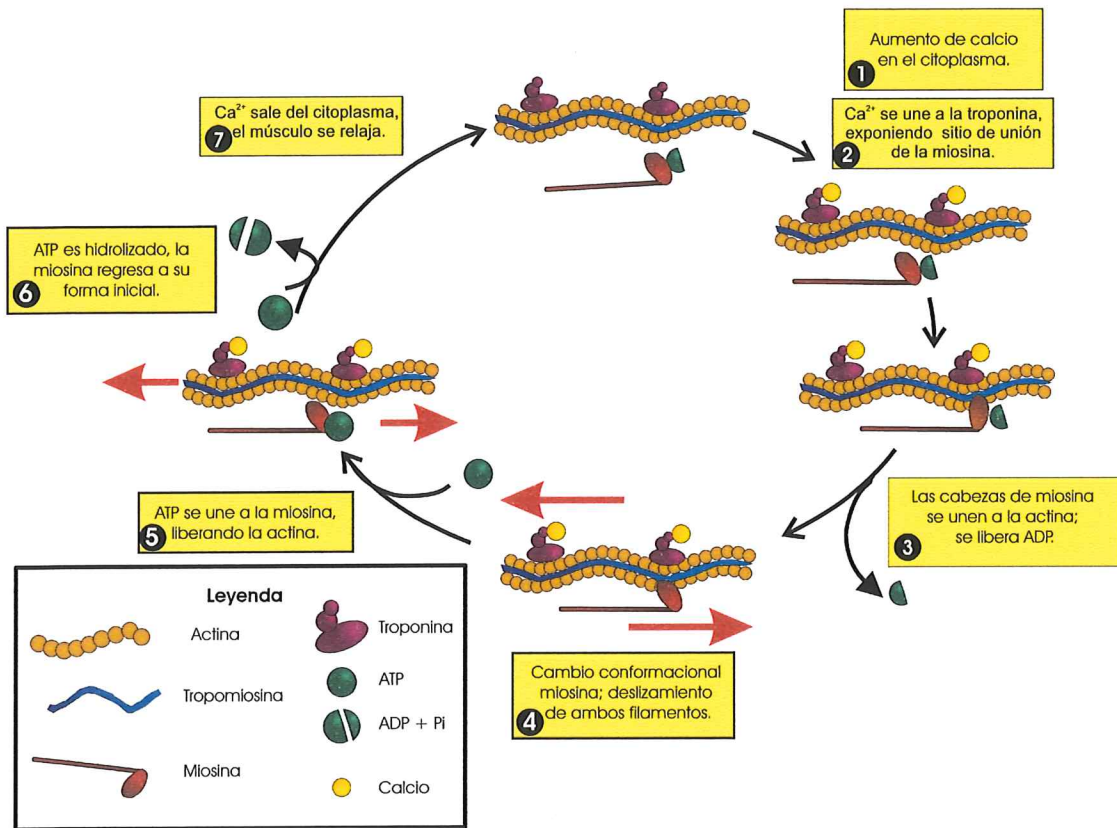


Figura 1. Mecanismo de contracción y relajación a nivel celular en el corazón del humano. (Adaptado de Purves et al., 1998).

Los digitálicos fueron estudiados por primera vez en 1785, cuando William Withering describió el uso de *Digitalis purpurea* y *D. lanata* para el tratamiento de problemas cardíacos, plantas que se habían utilizado como veneno durante miles de años a pesar de que se desconocía la molécula que causaba tal efecto (Fieser y Fieser, 1944). Actualmente se sabe que el principio activo de dicha planta es un glucósido; en general, se les llama glucósidos cardiotónicos a un grupo de compuestos de estructura química similar que tienen un efecto inotrópico positivo, es decir, incrementan la contractibilidad del corazón y un efecto cronotrópico negativo, es decir que disminuye la frecuencia de los latidos del corazón. Debido a este efecto, son utilizados para problemas cardíacos como la insuficiencia cardíaca congestiva, que es una falla en la función de bombeo del corazón por diversas causas en la que el corazón se va estirando y se contrae cada vez con menos fuerza (Katzung, 1983, Watson et al., 1984, Tortora y Grabowski, 2000).

Los glucósidos cardíacos consisten en una aglicona o genina combinada con una o más azúcares (figura 2). La aglicona tiene como núcleo a un esteroide con un anillo de lactona de cinco o seis carbonos α , β insaturado pegado en la posición C-17. La aglicona contiene la actividad farmacológica y es similar para todos los cardiotónicos, los azúcares son importantes para determinar la potencia, solubilidad, tasa de absorción, duración de la acción y las propiedades de la proteína de unirse al plasma y tejidos del compuesto (Katzung, 1983).

Existe evidencia que indica que el receptor de los glucósidos digitálicos es la Na^+ , K^+ -ATPasa (adenosín trifosfatasa de sodio y potasio, activada por magnesio y dependiente de sodio y potasio; E. C. 3.6.3.1), cuya principal función es la de actuar como una bomba para mantener alta la relación K^+/Na^+ en el fluido intracelular. Por

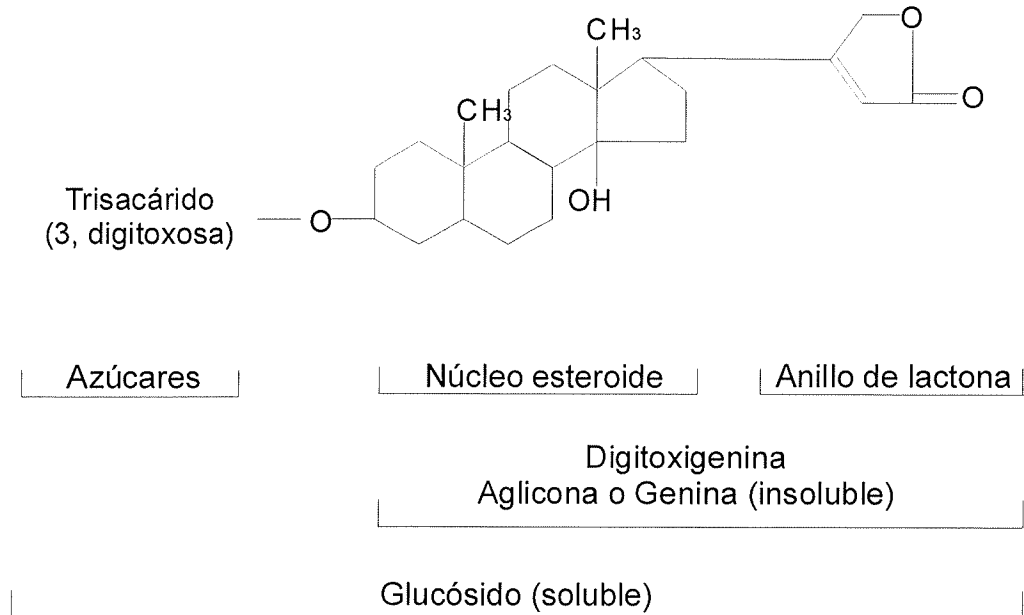


Figura 2. Estructura de digitoxina, un glucósido cardíaco típico. (Tomado de Katzung, 1983)

esta razón se le conoce también como bomba de sodio. La Na^+ , K^+ -ATPasa, que se encuentra en la membrana citoplasmática, consiste en dos subunidades de polipéptidos que tienen la acción catalítica, y una glicoproteína asociada que es esencial para la actividad. Existen cambios conformacionales en la enzima que producen la salida de los iones Na^+ y entrada de K^+ hacia la célula. La unión de los glucósidos cardíacos a la enzima inhibe estos cambios conformacionales,

cerrando los canales para el transporte de iones reduciendo la actividad de la bomba, hecho que interviene en la contractilidad del miocardio o músculo cardiaco (Watson et al., 1984),

Los glucósidos cardíacos, aunque son fármacos muy utilizados, poseen un índice terapéutico entre dos y tres, es decir, el margen de seguridad de esta droga es uno de los índices más bajos entre los agentes terapéuticos más utilizados. Debido a esto, los efectos adversos son comunes, y hasta un 30% de los pacientes hospitalizados y tratados con estos fármacos presentan toxicidad potencialmente seria. Los primeros signos de la intoxicación son anorexia, náusea y vómitos, ya que la droga afecta el centro del vómito en el cerebro. Además, puede presentar dolor abdominal, diarrea, calambres, dolor de cabeza, delirios, convulsiones, confusión, visión borrosa y lo más peligroso, arritmias cardíacas (Katzung, 1983). Es por ello que es necesario buscar un fármaco para tratar la enfermedad cardiaca congestiva que sea efectiva y con baja toxicidad, es decir, un alto índice terapéutico. En este objetivo, el cribado es una herramienta de gran importancia, ya que permite discriminar entre un gran número de sustancias para encontrar aquella que tenga la propiedad farmacológica buscada. El cribado, conocido también como selección farmacognóstica, consiste en utilizar un organismo o bien, alguna de sus partes, para evaluar el efecto ocasionado por materiales de origen biológico y su posible potencial farmacológico.

En la búsqueda de nuevos glucósidos cardiotónicos con alto índice terapéutico se deben considerar a los organismos marinos, principalmente a los invertebrados. Dentro de éstos se encuentran los pepinos de mar y las anémonas. Los pepinos de mar son organismos alargados de movimiento lento que producen toxinas viscerales líquidas de naturaleza glucosídica. Estas sustancias son capaces de causar irritación fuerte de la piel y ojos e inclusive ceguera. Al parecer, debido a diferentes sustancias orgánicas, estos organismos tienen un sabor desagradable, por lo que los peces los evitan. Los pepinos de la familia Stichopodidae son equinodermos cuya principal característica es la de carecer de órganos de Cuvier (Stonik y Elyakov, 1988). *Stichopus parvimensis* es un pepino perteneciente al phylum Echinodermata, clase Holothuroidea, orden Aspidochirotida, familia Stichopodidae. Este pepino de mar se encuentra en bahías protegidas de California y Baja California. Su cuerpo es café rojizo de más de 3 cm de diámetro y hasta 45 cm de largo. Su cuerpo contiene numerosas verrugas carnosos y el extremo anterior esta rodeado de tentáculos retráctiles (Allen, 1977).

Un organismo abundante en la zona costera de Ensenada es la anémona *Anthopleura elegantissima*, que pertenece al phylum Cnidaria, clase Anthozoa, subclase Zoantharia, orden Actinaria y familia Anthopleuridae. Es una especie común en la zona intermareal del sur de California, donde se puede observar en colonias o solitarias (Allen, 1977).

Una parte importante en el proceso de la búsqueda de nuevos fármacos es la de probar las sustancias en animales que funcionan como modelos. Esto es con el fin de saber si una sustancia funciona, cómo lo hace y cuáles son los posibles efectos tóxicos para el organismo, antes de probarlas en los seres humanos. Un modelo biológico potencial para la búsqueda de glucósidos cardíacos es el mejillón *Mytilus californianus*, que pertenece al phylum Mollusca, clase Pelecypoda, orden Filibranchia, familia Mytilidae y se distribuye desde las costas de Alaska hasta Baja California en zonas rocosas expuestas al oleaje (Allen, 1977).

2. ANTECEDENTES

Los únicos animales marinos que producen saponinas, un tipo de glucósidos, son los pepinos y las estrellas de mar, es por ello que se han realizado diversos estudios para aislar los glucósidos de estos organismos. Chanley et al. (1959) aislaron la Holoturina A, una mezcla de al menos media docena de glucósidos muy parecidos entre sí, a partir de las glándulas de Cuvier del pepino de mar *Actinopyga agassizi*. Esta holoturina fue descrita como un glucósido cardíaco o saponina esteroideal debido a la presencia de cuatro moléculas de monosacáridos además de sus propiedades hemolíticas y neurotóxicas.

Kaul et al. (1977) obtuvieron extractos metanólicos e isopropanólicos de organismos marinos y probaron su actividad cardiovascular en el corazón perfundido de conejillos de indias. En este estudio, el extracto de *Actinopyga mauritania* mostró un aumento en el efecto inotrópico del 50%, *Holothuria mexicana* tuvo un aumento 5%, mientras que *Stichopus tropicalis* tuvo un efecto inotrópico negativo del 15%.

A partir del extracto etanólico del pepino de mar *Pentamera calcigera*, del Mar de Japón, se aislaron cuatro glucósidos monosulfatados denominados calcigerósidos B, C₁, y C₂, junto con el cucumariósido G₂, que ya había sido reportado con anterioridad. También se encontraron glucósidos triterpenoidales disulfatados que fueron llamados calcigerósidos D₁, D₂ y E. Los compuestos aislados se probaron *in vitro* contra células tumorales de ratón y humano y únicamente los derivados desulfatados de los calcigerósidos B, C₁, y C₂ mostraron actividad citotóxica (IC₅₀ = 5µg/ ml) (Avilov et al., 2000a, Avilov et al., 2000b).

En Baja California, Íñiguez Martínez (1990) obtuvo el principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*, por diferentes métodos: precipitación por etanol, formación de derivados de colesterol y extracción con n-butanol. Demostró que el método de ApSimon et al. (1972) con n-butanol es el más adecuado ya que es rápido, sencillo y con mayor rendimiento con el cual se obtienen tres componentes químicos capaces de actuar sobre la membrana de células rojas (agentes hemolíticos). Usabiaga del Moral (1990) encontró que el principio activo del pepino de mar *S. parvimensis*, extraído mediante el método descrito por ApSimon inhibe la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa de la membrana de eritrocitos de conejo. Íñiguez Martínez (1995) aisló uno de los componentes y propuso la estructura para uno de los compuestos presentes en el extracto de pepino, la cual es similar a la de los glucósidos cardiotónicos. Sin embargo, pese

a la semejanza estructural de este compuesto con los glucósidos cardiotónicos usados actualmente, hasta la fecha no se han realizado experimentos sobre el efecto del principio activo del pepino de mar *S. parvimensis* en el corazón de algún modelo animal. En este estudio se evaluará el efecto del extracto sobre el corazón de mejillón para determinar si el extracto se trata de un cardiotónico.

Los estudios sobre farmacología en anémonas han sido principalmente sobre proteínas aisladas a partir de dichos organismos. Se ha encontrado una cadena polipeptídica de cerca de cincuenta y tres residuos de aminoácidos llamada Anthopleurina A. Dicha sustancia, aislada a partir de *Anthopleura xanthogrammica*, tiene efectos inotrópicos pero no cronotrópicos en el corazón de mamíferos, y al parecer su efecto es superior al de la ouabaina, careciendo además de efectos secundarios (Shibata et al., 1975). A pesar de la utilidad que este compuesto posee para la terapéutica, es necesario explorar más para la búsqueda de compuestos que provoquen una cronotropía negativa sobre el corazón, como la digoxina, ya que puede ser empleado para casos de arritmias cardíacas.

El uso seguro de las sustancias como agentes terapéuticos incluye, además de la certeza de su efecto sobre el modelo animal, el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos por los cuales actúa. La actividad fisiológica de los glucósidos depende de su habilidad para alterar la permeabilidad de las membranas biológicas, afectando el transporte pasivo de electrolitos, como

lo demostraron Gorshkov et al. (1982) para algunos compuestos de origen marino. Estos mismos autores realizaron un ensayo enzimático para estudiar el efecto de la holoturina A y B, entre otros glucósidos, en la actividad de la ATPasa ribosomal del cerebro de rata *in vitro*. Gracias a estos experimentos se encontró que los glucósidos marinos inhiben la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa y la Mg^+ ATPasa, y que la intensidad del efecto depende de la concentración del glucósido. Las holoturinas A y B, a pesar de tener un número diferente de monosacáridos, tuvieron un efecto similar. Otra de las conclusiones a la que llegaron es que la estructura total del glucósido determina la especificidad relativa y la inhibición.

Las especies marinas son de utilidad como modelos biológicos por su diversidad: de los 33 phyla modernos, sólo 11 se encuentran en habitats terrestres mientras que 28 ocurren en habitats marinos; aunado a esto, la gran capacidad de estos organismos para adaptarse a diferentes ambientes, aumenta la posibilidad de estudiar en ellos procesos análogos a los del hombre (National Research Council, 1999). Una característica que comparten los moluscos con el humano es el corazón miogénico, es decir que tiene un grupo de células que estimula el corazón y dicta la frecuencia cardíaca (Randall et al., 2002). El corazón de bivalvos consiste en un órgano de sólo tres cámaras: dos pequeñas aurículas y un ventrículo, los cuales tienen las mismas funciones que desempeñan en el del corazón de mamíferos. A nivel celular, la estructura del corazón de estos organismos es similar a la del humano en relación al mecanismo

de contracción; aunque difiere ligeramente, ya que en lugar de miosina, posee filamentos de paramiosina (Kelly y Hayes, 1969). Una especie marina ya validada como herramienta de cribado para la búsqueda de cardiotónicos marinos es la almeja pismo *Tivela stultorum*, cuyo corazón reacciona bioquímica y fisiológicamente hacia los digitálicos de la misma manera que el corazón humano; es decir, muestra inhibición de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa (Cuellar Roheri, 1991) y efecto inotrópico positivo seguido de efecto cronotrópico negativo o disminución de la frecuencia cardíaca (Guerra Rivas, 1994). Sin embargo, debido a la sobreexplotación de esta especie, es necesario buscar nuevos modelos con características biológicas similares para su uso en la evaluación de nuevos agentes cardiotónicos de origen marino. Una especie con potencial para este uso, pero que requiere ser validada, es el molusco bivalvo *Mytilus californianus*, ya que, además de tener características fisiológicas similares a las de la almeja pismo, es una especie abundante en la región, de fácil colecta y mantenimiento por lo que en este trabajo será validado como modelo animal y utilizado como organismo de prueba para los extractos obtenidos.

3. OBJETIVOS

3.1

Evaluar la viabilidad del uso del corazón de *Mytilus californianus* como herramienta de cribado para cardiotónicos de origen marino.

3.2

Evaluar el efecto de extractos de la anémona *Anthopleura elegantissima* y el pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la fuerza y frecuencia del latido del corazón del mejillón *Mytilus californianus*.

3.3

Evaluar el efecto de los extractos de anémona *Anthopleura elegantissima* y del pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa del corazón del mejillón *Mytilus californianus*.

4. METODOLOGÍA

El corazón de *M. californianus* fue validado como modelo biológico en el cribado de sustancias cardiotónicas probando el efecto de la digoxina comercial, Lanoxin, M. R. sobre la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción. Adicionalmente se probó el efecto del digitálico sobre la Na⁺ K⁺ ATPasa del corazón de este bivalvo. Una vez validado *M. californianus* como organismo de prueba, se evaluaron diferentes extractos obtenidos a partir de anémona y pepino de mar. Los extractos se obtuvieron con diferentes solventes, los cuales fueron evaporados a sequedad. El residuo sólido se recuperó en agua de mar y se probó su efecto sobre la Na⁺ K⁺ ATPasa del corazón de *M. californianus*. Los extractos que presentaron inhibición fueron probados sobre el corazón para observar el efecto en la fuerza y frecuencia del latido del corazón. En la figura 3 se muestra la estrategia general seguida en el presente trabajo. Posteriormente se describe la metodología detallada.

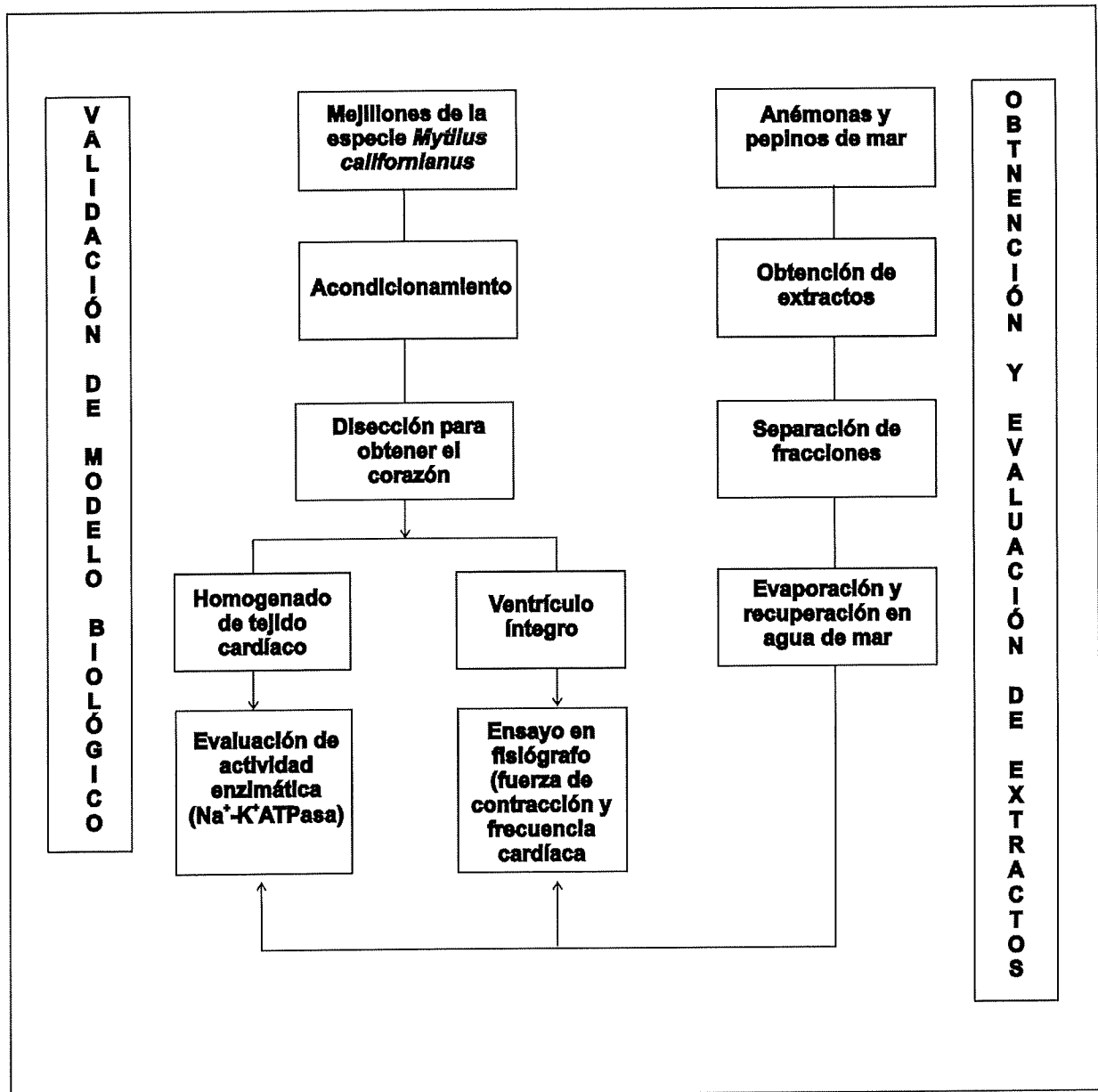


Figura 3. Metodología para la validación del corazón de *M. californianus* como modelo para el cribado de sustancias cardiostimulantes y la obtención y cribado de sustancias de origen marino.

4.1 Validación del corazón de *Mytilus californianus* como modelo biológico para el cribado de sustancias cardiotónicas.

4.1.1 Colecta y mantenimiento del organismo de prueba.

Mejillones de la especie *Mytilus californianus* fueron recolectados en Eréndira, B. C., localizada a 60 km al sur de Ensenada, B. C. a 31° 19' latitud norte y 116° 27' longitud oeste, figura 4. Es una zona rocosa con fuerte exposición al oleaje (Monje Fernández, 1983). Los organismos fueron transportados al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), donde fueron colocados en peceras con aireación, recambio de agua diario y temperatura controlada de 17° C para su acondicionamiento. El tiempo de acondicionamiento fue de dos semanas y una vez pasado este tiempo, fueron utilizados para los bioensayos. Durante todo este periodo, los organismos fueron alimentados con microalgas de la especie *Isochrysis galbana* cultivadas en el CICESE y con pasta *Tetraselmis* sp. obtenidas de Reed Mariculture.

4.1.2 Efecto fisiológico.

La evaluación del efecto del digitálico sobre el corazón de *M. californianus* se llevó a cabo mediante bioensayos pareados en los que se midió el cambio en la



Figura 4. Localización de las diferentes áreas de colecta.

fuerza y frecuencia de contracción del ventrículo después del tratamiento con el digitálico a dos concentraciones, 8 y 10 μM , siguiendo la metodología de Guerra-Rivas (1994). De la misma manera se trabajó con una solución de etanol al 0.05%, con base en la concentración de etanol previamente determinada por el mismo autor. Se realizó la disección del mejillón para extirpar el corazón, que se colocó inmediatamente en la cámara de prueba, consistente en un vaso de precipitado de 50 ml con una punta de aguja para líquido cefalorraquídeo sujetando al ventrículo por un extremo, a la vez que permitía la aireación del agua

de mar. El otro extremo del corazón era sujetado por un gancho al transductor de fuerza MLT050/A, conectado al amplificador del PowerLab 10T de ADInstruments. El registro de la fuerza de contracción se realizó en la computadora mediante el programa Chart 5.0, de ADInstruments (figura 5). El volumen de agua de mar fue constante para todos los ensayos. La adición del Lanoxin, M. R. se realizó una vez alcanzada la constancia en la fuerza y frecuencia de contracción. La temperatura a la que se realizaron estos ensayos fue a 17 °C.

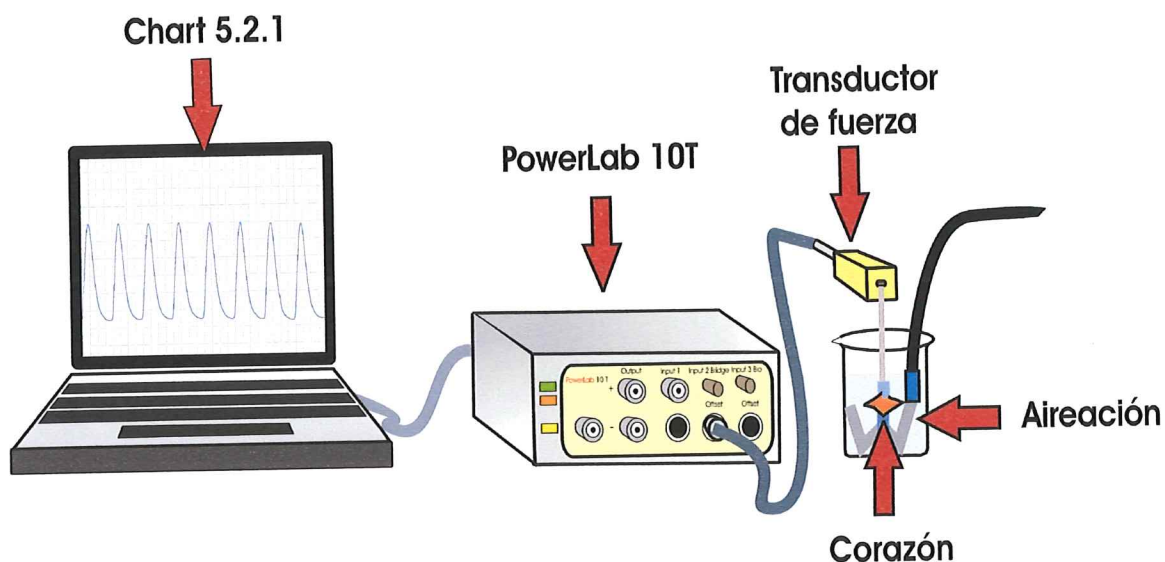


Figura 5. Diagrama del fisiógrafo. El corazón de *M. californianus* se coloca en una cámara de prueba con aireación, y mediante un gancho se une al transductor de fuerza que mide la fuerza del latido del corazón. El transductor envía la información al PowerLab 10T que a su vez manda la información a una computadora que grafica la fuerza del latido del corazón

4.1. 2.1 Tratamiento de datos para la evaluación de parámetros fisiológicos.

Para cada registro (con o sin tratamiento) se obtuvo la fuerza de contracción (F) promedio en un bloque de seis latidos. Se definió fuerza de contracción como la diferencia entre el máximo y mínimo valor registrado de cada latido expresada en gramos fuerza. Además se obtuvo la frecuencia cardíaca, definida como el número de latidos por minuto. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de cambio provocado por el tratamiento para la fuerza y frecuencia. En la figura 6 se observa un registro obtenido y el tratamiento realizado para la obtención de los datos. Para complementar el conocimiento de la fisiología del corazón de *M. californianus* se calculó la velocidad de desarrollo de fuerza de contracción. Esta velocidad se obtuvo al dividir la fuerza de contracción entre el tiempo necesario para alcanzar el máximo de dicha fuerza.

4.1.3 Efecto bioquímico.

4.1.3.1 Preparación de homogenados.

El corazón de mejillón fue molido en un homogenizador manual con solución amortiguadora de HEPES- Sacarosa (0.5- 0.25 mM), pH 7, a una proporción de 75 mg/ml. Este proceso fue realizado en hielo y el homogenado se utilizó inmediatamente (Cuellar Roheri, 1991).

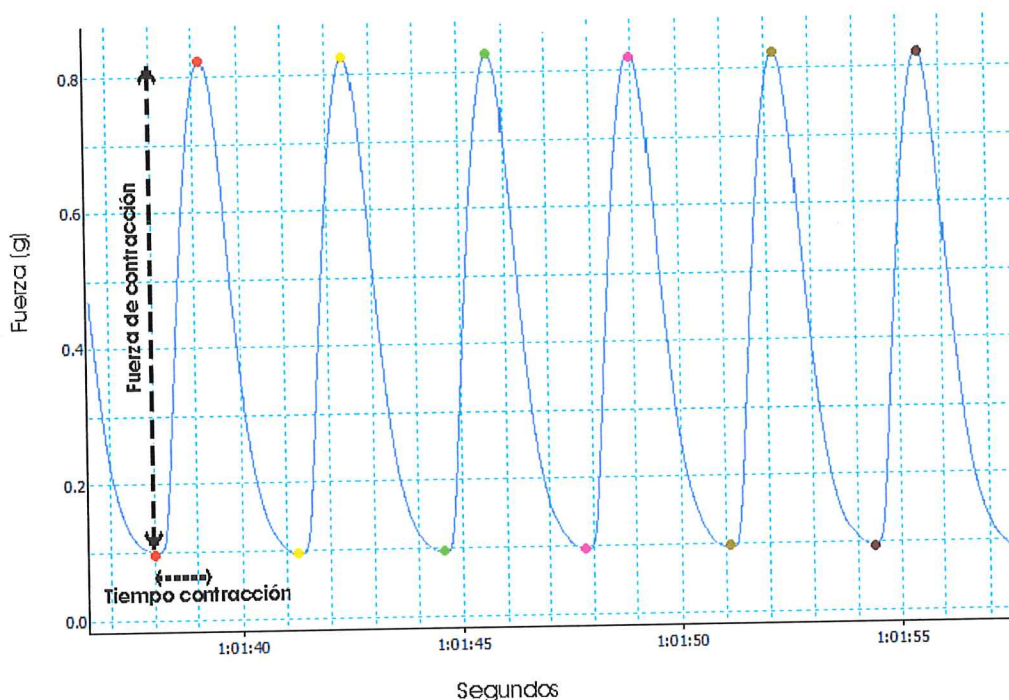


Figura 6. Registro típico del corazón de *M. californianus* sin tratamiento. Se observan seis latidos, cada punto corresponde a un máximo o mínimo, y cada color denota un latido diferente. Al dividir la fuerza de contracción entre el tiempo de contracción se obtuvo la velocidad de desarrollo de fuerza de contracción.

4.1.3.2 Ensayo enzimático.

Se tomaron 0.2 ml del homogenado, preparado según la sección anterior (4.1.3.1) y se le agregó HEPES 50mM, pH 8, $MgSO_4$ 6mM, y la digoxina con la concentración a probar 5 o 10 μM . Después de 10 minutos se agregó Na_2ATP 0.8 mM, se agitó durante 15 segundos y se dejó reposar 10 minutos. Finalmente se agregó KCl 10mM. Se realizó paralelamente, para cada prueba un control sin

Na_2ATP para medir el fósforo inorgánico (Pi) endógeno. El volumen final fue en todos los casos de 1.2 ml. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 25°C . Pasado este tiempo la reacción se detuvo agregando 1 ml de ácido tricloroacético al 5%. Se centrifugó durante 15 minutos a 3500 RPM. El sobrenadante fue utilizado para el análisis de fosfatos, mientras que el precipitado fue utilizado para el análisis de proteínas (Cuellar Roheri, 1991).

4.1.3.3 Determinación de Fosfatos (Marsh, 1959).

A una muestra de 1 ml de sobrenadante se le agregó: 3 ml de butanol, 0.2 ml de solución ácida de molibdato (5 g de molibdato de amonio disueltos en 22 ml de ácido sulfúrico y aforado a 100 ml) y 0.2 ml de solución de citrato de sodio 0.68 M pH 7, agitando con vortex después de cada adición. Paralelamente, se realizó una curva de calibración con $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 0 a 2 $\mu\text{moles/ml}$.

Se leyó la transmitancia de la fase butanólica a 400 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21 de Milton Roy Company) y se determinó la concentración de fosfatos con la curva de calibración.

4.1.3.4 Determinación de Proteínas (Lowry et al., 1951).

El paquete de proteínas precipitadas en el ensayo enzimático fue resuspendido en 2 ml de NaOH 1N. Se tomó 1 ml de esta solución y se le agregó 5 ml de reactivo alcalino (1 ml de CuSO_4 al 0.5% en tartrato sódico potásico al 1% y 50 ml de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N), se dejó reposar 10 minutos y se le agregó 0.5 ml de reactivo Folin 2N diluido en agua 1:1. Se agitó con vortex después de cada adición. Se dejó reposar 30 minutos, una vez transcurrido ese tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Heliosα de Thermo Electron Corporation). La concentración de proteínas se obtuvo con una curva de calibración para albúmina de 0-500 $\mu\text{g/ml}$.

4.1.3.5 Tratamiento de datos para la cuantificación de la actividad de la Na^+K^+ -ATPasa.

La actividad de la Na^+K^+ ATPasa fue definida como la cantidad de Pi, en μmoles , producido por 1 mg de proteína en una hora. Para obtener los valores de actividad en cada prueba, se dividió el valor de Pi encontrado entre el valor de proteína presente en el tejido utilizado. A todos los tubos se les restó el control correspondiente, tratado de la misma manera, el cual indica la cantidad de Pi endógeno presente en cada tejido. Los resultados se transformaron a porcentaje de actividad, siendo el 100 % la actividad de la ATPasa sin tratamiento.

4.2 Cribado de sustancias cardiotónicas.

4.2.1 Obtención de los extractos de anémona.

Se recolectaron anémonas de la especie *A. elegantissima* en la Playa de Popotla, localizada en el Municipio de Rosarito, B. C. a los 32° 17' latitud norte y 117° 2' longitud oeste, figura 4, y se llevaron al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la FCM. Los organismos fueron colocados en tanques con agua de mar a flujo continuo y aireación constante durante dos semanas, bajo un fotoperíodo de 12 horas. Durante este período se alimentaron cada tercer día con trozos pequeños de pescado. Una vez terminado el período de acondicionamiento, los organismos fueron pesados y se realizó una disección para obtener los tentáculos, cuerpo basal y disco podal de cada anémona. Los tres tipos de tejidos se secaron en una estufa a 60° C y se guardaron para su uso posterior.

Los extractos de anémona se obtuvieron mediante un sistema de reflujo. La extracción de las muestras de anémona se realizó con dos solventes diferentes, acetona y diclorometano. Para cada solvente y tipo de tejido, se colocaron seis gramos de muestra con 200 ml de solvente en el matraz. Se calentó el solvente buscando tener una ebullición suave y controlada. Se

realizaron tres extracciones de la misma muestra. Una vez obtenidos los extractos se evaporaron en la campana hasta eliminar en su totalidad el solvente. Debido a que se observaron dos o más fases en un mismo extracto, éstas fueron separadas y se trataron como fracciones diferentes. Para cada fracción se realizaron pruebas de solubilidad en agua de mar con el fin de determinar la concentración a la cuál el extracto se disolvía sin la necesidad de utilizar solventes. A partir de dicha concentración se realizaron las diluciones que se utilizaron en el experimento.

4.2.2 Obtención del extracto de pepino.

Los especímenes de *Stichopus parvimensis* fueron recolectados mediante buceo autónomo en Arbolitos, Ensenada, B. C. Localizada entre los 31° 43' y 31° 45' latitud norte y 116° 45' y 116° 40' longitud oeste, figura 4 (Secretaría de Marina, 1974). Esta es un área semiprotegida con oleaje estacional, caracterizada por sus cantiles y playas de cantos rodados. Los organismos fueron pesados, enjuagados y se colocaron en agua destilada en una proporción aproximada de 1:1 peso: volumen, donde se dejaron aproximadamente tres horas. El extracto acuoso obtenido se filtró y ajustó el pH a 4, se le agregaron 50 g de NaCl por cada litro y se le agregó n-butanol en una proporción de 1:1 volumen: volumen. Esta mezcla se colocó en un embudo de separación y una vez separadas las fases, se almacenó la fase butanólica (ApSimon et al., 1972). A la fase acuosa se

le agregó nuevamente n-butanol para realizar una segunda extracción. La fase butanólica fue rotaevaporada en un Rotaevaporador Yamato RE-51. El extracto obtenido se evaporó a sequedad en la campana de extracción con la ayuda de una plancha de calentamiento y una secadora de aire caliente.

4.2.3 Medición del efecto de cada extracto.

Se evaluó el efecto sobre la $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ a diferentes concentraciones de cada uno de los extractos obtenidos de acuerdo al método descrito en la sección 4.1.3. Para los extractos que mostraron actividad se probó el efecto fisiológico de acuerdo a la sección 4.1.2.

4.3 Análisis estadístico.

A cada grupo de datos se le aplicaron pruebas para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas (Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente). Se realizaron pruebas t para determinar la existencia de diferencias entre antes y después del tratamiento respectivo. Se realizaron pruebas *a posteriori*, Kruskal-Wallis, para conocer si había diferencias entre los efectos ocasionados por las diferentes concentraciones utilizadas (Zar, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Validación del corazón de mejillón como modelo biológico.

5.1.1 Parámetros fisiológicos y biométricos de *M. californianus*.

Los valores de frecuencia cardíaca, fuerza de contracción y velocidad de desarrollo de fuerza de contracción del corazón se muestran en la tabla I. Los datos corresponden a organismos de un mismo lote utilizado para la validación del modelo y previo a la adición de digitálico. En esta misma tabla se presentan los datos de longitud de la concha, así como las dimensiones y peso del corazón, todos ellos valores promedio.

5.1.2 Efectos fisiológicos del Lanoxin, M. R. sobre el corazón de *M. californianus*.

5.1.2.1 Efecto del blanco sobre la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción del corazón de *M. californianus*.

Se realizaron pruebas pareadas antes y después del tratamiento con etanol y, con un 95 % de confianza se encontró que este solvente no tiene efectos sobre la

Tabla I. Parámetros fisiológicos y biométricos de *M. californianus*; los valores se refieren al promedio de datos obtenidos para cada corazón antes de agregar el digitálico. Se utilizaron 30 organismos del mismo lote.

Parámetro	Promedio \pm Error estándar
Frecuencia cardíaca	15.92 \pm 0.55 latidos min ⁻¹
Fuerza de contracción	0.58 \pm 0.03 g
Velocidad de desarrollo de fuerza de contracción	0.37 \pm 0.02 g seg ⁻¹
Longitud concha	10.35 \pm 0.10 (cm)
Longitud corazón	8.53 \pm 0.34 (mm)
Ancho corazón	3.83 \pm 0.12 (mm)
Peso corazón	0.06 \pm 0.03 (g)

frecuencia cardíaca y fuerza de contracción. Además, no se observaron cambios en el patrón del latido del corazón, los valores de frecuencia y fuerza de contracción se muestran en las tablas II y III.

5.1.2.2 Efectos fisiológicos del Lanoxin, M. R. sobre el corazón de *M. californianus*.

En las tablas IV y V se muestra el efecto del digitálico a una concentración de 8 μ M sobre la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción respectivamente.

Tabla II. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de 0.05% de etanol. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: peso corazón (p) 0.08 ± 0.01 g, longitud corazón (lc) 11 ± 0.89 mm, ancho corazón (ac) 5 ± 0.63 mm, largo valva (lv) $10.53 \text{ cm} \pm 0.36$).

Corazón	Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	29.53	29.47	-0.19
2	28.17	28.09	-0.29
3	28.97	28.95	-0.07
4	32.79	32.81	0.07
5	29.14	29.02	-0.41
6	23.02	23.02	-0.01
Promedio	28.61	28.56	-0.15
Desv. Est.	3.17	3.17	0.18

Tabla III. Fuerza de contracción antes y después de la adición de 0.05% de etanol. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.0727 ± 0.0085 g, (lc) 11 ± 0.8944 mm, (ac) 5 ± 0.6324 mm, (lv) $10.53 \text{ cm} \pm 0.3559$).

Corazón	Fuerza de contracción (g)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	0.45	0.46	1.13
2	0.76	0.76	0.04
3	0.42	0.42	0.81
4	0.90	0.90	-0.28
5	0.40	0.40	0.4
6	1.07	1.06	-0.47
Promedio	0.67	0.67	0.27
Desv. Est.	0.28	0.28	0.62

Aunque se observó una disminución en el latido del corazón y un aumento en la fuerza de contracción, el patrón de latido no fue constante. Ambos efectos son significativos con un 95% de confianza. En algunos casos se observó, por algunos momentos una disminución en la fuerza de contracción y después un aumento en

la misma; en otros, se observó una ausencia de latido, y después el corazón volvía a latir.

Tabla IV. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de Lanoxin M. R. en concentración 8 μ M. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.06 ± 0.01 g, (lc) 9.62 ± 1.85 mm, (ac) 3.85 ± 0.55 mm, (lv) 10.88 ± 0.32 cm).

Corazón	Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	24.41	16.18	-33.73
2	20.17	14.50	-28.13
3	21.75	17.06	-21.56
4	20.90	15.02	-28.12
5	21.36	15.17	-28.96
6	35.63	23.02	-35.38
7	19.77	14.53	-26.5
8	17.38	7.76	-55.34
9	18.34	12.32	-32.86
10	18.63	13.56	-27.2
11	17.18	11.88	-30.89
12	23.94	16.18	-32.42
13	17.75	12.73	-28.29
14	16.39	9.96	-39.24
15	19.81	13.31	-32.82
16	17.96	12.81	-28.67
17	18.94	13.45	-28.99
18	20.15	12.76	-36.64
19	18.74	12.18	-35.01
20	19.91	14.24	-28.46
Promedio	20.45	13.93	-31.96
Desv. Est.	4.14	3.03	6.86

El Lanoxin M.R., a una concentración 10 μ M, ocasionó cambios significativos tanto en la frecuencia como en la fuerza del latido de corazón con un 95% de confianza, los resultados se muestran en las tablas VI y VII. El trazo observado posterior a la adición del compuesto mostró poca regularidad tanto en

la frecuencia cardíaca como en la fuerza de contracción. A pesar de la gran irregularidad se pudieron distinguir en este tratamiento, principalmente, dos tipos de patrones. El primer patrón fue el de un latido con gran fuerza seguido de uno con menor fuerza (figura 7). Otro patrón observado fue el de una serie de bloques de latidos con

diferente fuerza entre sí. En este patrón, los bloques eran seguidos por períodos sin latido que variaron entre los 20 y 70 segundos (figura 8). El número de latidos en cada bloque fue variable, obteniéndose bloques desde dos hasta quince latidos.

Tabla V. Fuerza de contracción antes y después de la adición de Lanoxin M.R. en concentración de 8 μ M. Los valores de fuerza después del tratamiento corresponden a un promedio de seis valores de fuerza máxima. (El ensayo realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.06 ± 0.01 g, (lc) 9.61 ± 1.85 mm, (ac) 3.85 ± 0.55 mm, (lv) 10.88 ± 0.32 cm).

Corazón	Fuerza de contracción (g)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	0.54	0.74	37.95
2	0.95	1.18	24.45
3	0.54	0.74	37.96
4	0.69	0.67	-3.39
5	0.78	0.91	15.53
6	0.91	1.18	28.98
7	0.75	0.98	30.68
8	0.74	0.97	30.35
9	0.50	0.88	76.23
10	0.69	1.27	83.1
11	0.75	0.90	19.54
12	0.79	0.87	10.52
13	0.77	0.90	17.00
14	0.29	0.47	63.54
15	0.75	0.81	7.56
16	0.62	0.64	3.91
17	0.49	0.87	75.03
18	0.30	0.34	15.94
19	0.55	0.68	23.23
20	0.58	0.69	18.63
Promedio	0.65	0.84	30.84
Desv. Est.	0.18	0.23	24.91

Tabla VI. Frecuencia cardíaca antes y después de la adición de Lanoxin M. R. 10 μ M. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.06 ± 0.01 g, (lc) 9.86 ± 1.51 mm, (ac) 3.93 ± 0.73 mm, (lv) 10.72 ± 0.32 cm).

Corazón	Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	37.51	27.28	-27.26
2	35.90	26.37	-26.56
3	42.15	18.53	-56.04
4	30.03	24.30	-19.09
5	38.82	26.26	-32.35
6	30.97	12.53	-59.56
7	20.03	17.74	-11.43
8	31.60	18.19	-42.45
9	17.86	13.52	-24.3
10	16.68	10.13	-39.31
11	18.16	19.01	4.63
12	18.26	8.56	-53.11
13	19.34	20.45	5.72
14	24.82	15.39	-37.98
15	18.67	14.57	-22.01
16	14.00	12.22	-12.74
17	17.02	10.75	-36.85
18	18.65	11.64	-37.59
19	19.48	14.08	-27.69
20	33.39	25.19	-24.55
Promedio	25.17	17.33	-29.03
Desv. Est.	8.88	5.96	17.58

Tabla VII. Fuerza de contracción antes y después de la adición de Lanoxin M.R. 10 μ M. Los valores de fuerza corresponden a un promedio de los seis valores de fuerza máxima post-tratamiento. El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.0584 ± 0.0099 g, (lc) 9.8571 ± 1.5118 mm, (ac) 3.9285 ± 0.7300 mm, (lv) 10.7214 ± 0.3118 cm.

Corazón	Fuerza de contracción (g)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	0.99	1.46	48.17
2	0.54	0.64	17.96
3	0.37	0.72	95.23
4	0.55	1.47	164.57
5	0.92	1.33	44.12
6	0.47	0.67	43.55
7	0.81	1.26	56.512
8	0.95	1.16	23
9	0.94	1.32	40.59
10	0.53	0.77	43.9
11	0.32	0.34	7.54
12	0.36	0.50	38.45
13	0.81	0.87	8.01
14	0.67	1.11	61.33
15	0.80	1.34	67.98
16	0.59	0.71	20.28
17	0.61	0.96	56.47
18	1.03	1.10	6.76
19	0.51	0.56	9.92
20	0.39	0.94.	137.65
Promedio	0.66	0.96	49.60
Desv. Est.	0.23	0.34	41.93

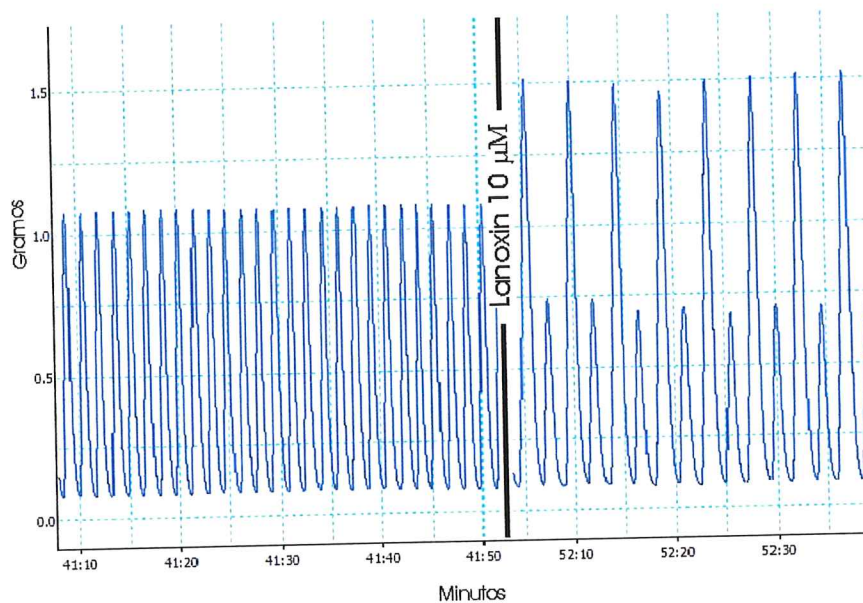


Figura 7. Patrón común en el latido del corazón de *M. californianus*, después de agregar Lanoxin M. R. a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Se observan diferencias en la fuerza del latido pero no en la frecuencia del mismo.

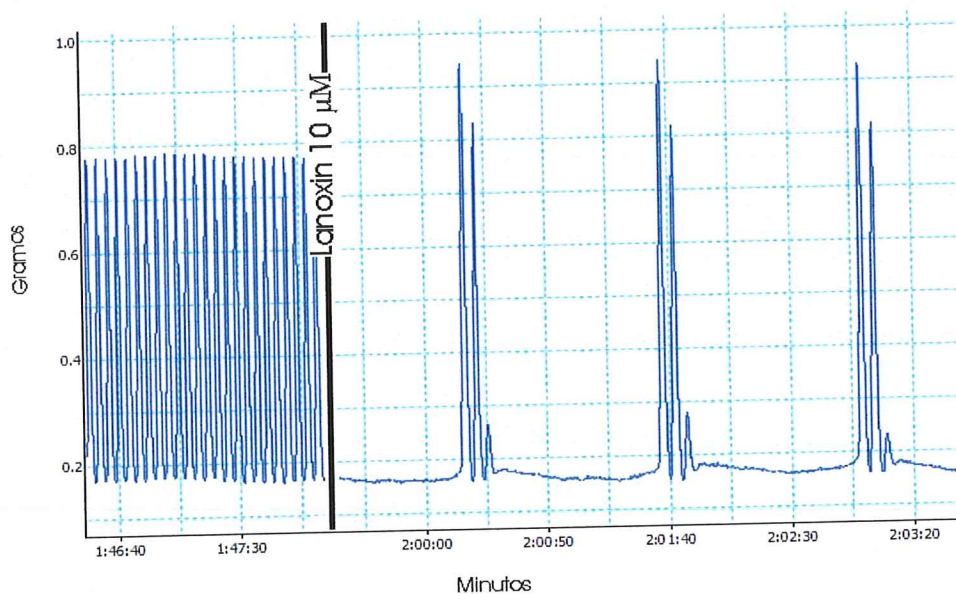


Figura 8. Patrón común en el latido del corazón de *M. californianus*, después de agregar Lanoxin M. R. a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Se observan bloques de latidos.

Se realizó una ANOVA no paramétrica y se encontraron diferencias entre los grupos tratados con el blanco y el digitálico en la frecuencia y fuerza de contracción, se realizó el análisis de Kruskal-Wallis *a posteriori*, para ubicar la diferencia entre que grupos. Se encontraron diferencias significativas entre el blanco y cada una de las concentraciones de Lanoxin, M.R., pero no se encontraron diferencias significativas entre el efecto ocasionado entre las dos concentraciones probadas del digitálico.

5.1.2.3 Efectos bioquímicos de la digoxina sobre el corazón de *M. californianus*.

Las concentraciones de digoxina de 5 y 10 μM produjeron una actividad sobre $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ del $79.45 \pm 15.98 \%$ ($n= 14$) y del $79.36 \pm 12.71 \%$ ($n= 14$) respectivamente, calculado con base a la actividad de la enzima sin digitálico. El análisis estadístico, mediante pruebas pareadas, mostró que existen diferencias significativas para ambos tratamientos con respecto al blanco ($\alpha = 0.05$).

5.2 Cribado de sustancias cardiotónicas utilizando el corazón de *M. californianus*.

Se obtuvieron un total de 11 extractos diferentes provenientes de anémona

y pepino. Para los extractos de anémona se utilizó un código para identificarlos. La primera letra indica el tipo de tejido: tentáculo (T), cuerpo (C) o disco podal (P); la segunda, corresponde al organismo: en este caso anémona (A); la tercera al solvente utilizado: acetona (A) o diclorometano (D); por último, el número indica la fracción. En el caso de los extractos obtenidos con diclorometano, se obtuvo una sola fracción por lo que el número fue omitido.

5.2.1 Efectos bioquímicos de los extractos sobre el corazón de *M. californianus*.

Con cada uno de los extractos se realizó el ensayo enzimático para probar su efecto sobre la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa a tres concentraciones diferentes. Los valores de inhibición se muestran en las tablas VIII a XVII.

Tabla VIII. Efecto del extracto de tentáculo de anémona en acetona, TAA1, en la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa (n=2).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Actividad $\mu\text{mol Pi/mg}$ Proteína hr	% Actividad
0	0.92 ± 0.29	100
99.0625	1.46 ± 0.34	158.49
198.125	1.4588 ± 0.52	157.85
396.25	1.1898 ± 0.17	128.75

Tabla IX. Efecto del extracto de tentáculo de anémoma en acetona, TAA2, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración µg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0 (n=2)	1.26 ± 0.08	100
59.7916	1.62 ± 0.02	128.34
119.5833	1.32 ± 0.33	104.72
239.1666	1.20 ± 0.11	95.00

Tabla X. Efecto del extracto de tentáculo de anémoma en acetona, TAA3, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración µg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0	1.21 ± 0.12	100
53.65	1.01 ± 0.04	83.30
107.29	1.03 ± 0.12	85.08
214.58	1.17 ± 0.05	96.48

Tabla XI. Efecto del extracto de cuerpo de anémoma en acetona, CAA2, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración µg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0	1.15 ± 0.22	100
15.84	0.97 ± 0.28	84.67
31.69	0.86 ± 0.01	74.89
63.37	0.956 ± 0.21	83.09

Tabla XII. Efecto del extracto de pie de anémoma en acetona, PAA1, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Actividad $\mu\text{mol Pi/mg}$ Proteína hr	% Actividad
0	1.88 ± 0.28	100
210.52	0.86 ± 0.02	45.42
421.04	0.90 ± 0.06	47.58
842.08	0.92 ± 0.15	48.82

Tabla XIII. Efecto del extracto de pie de anémoma en acetona, PAA2, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Actividad $\mu\text{mol Pi/mg}$ Proteína hr	% Actividad
0	1.20 ± 0.13	100
2.08	0.84 ± 0.07	70.07
4.17	1.04 ± 0.06	86.61
8.33	1.07 ± 0.15	89.67
16.66	0.97 ± 0.12	80.95
33.33	0.90 ± 0.05	74.70

Tabla XIV. Efecto del extracto de tentáculo de anémoma en diclorometano, TD, en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (n=2).

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Actividad $\mu\text{mol Pi/mg}$ Proteína hr	% Actividad
0	4.15 ± 0.20	100.00
17.92	3.67 ± 0.02	88.43
35.83	3.19 ± 0.05	76.88
71.67	3.04 ± 0.25	73.26

Tabla XV. Efecto del extracto de cuerpo de anémoma en diclorometano, CD, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración µg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0	1.2564 ± 0.09	100
12.08	1.0126 ± 0.06	80.59
24.17	1.3671 ± 0.03	108.81
48.33	1.5334 ± 0.60	122.04

Tabla XVI. Efecto del extracto de pie de anémoma en diclorometano, PD, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración µg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0	1.31 ± 0.12	100
19.79	0.95 ± 0.16	72.27
39.58	1.35 ± 0.16	102.96
79.17	0.86 ± 0.05	65.75

Tabla XVII. Efecto del extracto de pepino, en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (n=2).

Concentración mg/ml	Actividad µmol Pi/mg Proteína hr	% Actividad
0	1.14 ± 0.021	100
0.52	1.11 ± 0.15	97.63
1.04	1.26 ± 0.33	111.12
2.08	1.08 ± 0.11	94.97
4.17	1.11 ± 0.05	97.42

5.2.2 Efectos fisiológicos de los extractos sobre el corazón de *M. californianus*.

Con base en los resultados mostrados en las tablas VIII a XVII, se seleccionó el extracto TD para evaluar el efecto sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca. Se probaron las tres concentraciones mencionadas en la tabla XIV; se observó que la concentración más baja, 17.92 $\mu\text{m/ml}$, no ocasionó cambios significativos en la frecuencia ni en la fuerza de contracción ($\alpha = 0.05$), mientras que las concentraciones media y alta sí produjeron una disminución en la frecuencia cardíaca y un aumento en la fuerza de contracción. Aunque los efectos fueron significativos para TD a concentración media, 35.83 $\mu\text{g/ml}$, no lo fueron para la solución de TD alta, 71.67 $\mu\text{g/ml}$. En este experimento, aunque se observó un aumento en la fuerza de contracción de cinco corazones, el sexto mostró un comportamiento anómalo, debido a la ausencia de latido durante cuarenta y cinco inmediatamente después de que se agregó la solución del extracto. El corazón reanudó el latido, pero con una fuerza de contracción muy baja. El efecto en la frecuencia de latido y la fuerza de contracción se muestran en las tablas XVIII y XIX.

Tabla XVIII. Efecto del extracto TD sobre la frecuencia cardíaca de *M. californianus* (n= 6).

	Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)		
Concentración	17.92 µg/ml	35.83 µg/ml	71.67 µg/ml
Antes	18.30 ± 1.68	16.43 ± 4.39	13.30 ± 1.44
Después	18.50 ± 2.38	15.99 ± 3.64	11.87 ± 1.99
% Cambio	0.87 ± 5.66	-1.2 ± 13.00	-16.46 ± 16.46

Tabla XIX. Efecto del extracto TD sobre la fuerza de contracción del corazón de *M. californianus* (n= 6).

	Fuerza de contracción (g)		
Concentración	17.92 µg/ml	35.83 µg/ml	71.67 µg/ml
Antes	0.54 ± 0.15	0.72 ± 0.12	0.56 ± 0.21
Después	0.57 ± 0.18	0.84 ± 0.14	0.645 ± 0.26
% Cambio	5.09 ± 8.61	17.34 ± 10.09	11.22 ± 30.99

Para las concentraciones más altas de extracto de pepino se observó un trazo irregular y la desaparición de latido en cortos periodos de tiempo. Por lo anterior sólo se presenta el efecto que tuvo la concentración más baja (0.52 mg/ml) sobre la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción del corazón de *M. californianus*, tablas XX y XXI. Como se observa, el extracto de pepino aumentó significativamente la fuerza de contracción, no así la frecuencia cardíaca ($\alpha = 0.05$). Una de las características principales en este experimento fue el aumento continuo en la línea base del latido, con un aumento paralelo y proporcional de los valores de máxima fuerza de contracción (figura 9).

Tabla XX. Efecto del extracto de pepino, 0.5208 mg/ml, en la frecuencia cardíaca del corazón de *M. californianus*. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.04 ± 0.01 g, (lc) 7.67 ± 0.82 mm, (ac) 3.83 ± 0.41 mm, (lv) 9.87 ± 0.27 cm).

Corazón	Frecuencia cardíaca (Latidos por minuto)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	17.98	19.00	5.71
2	17.31	17.46	0.86
3	18.74	19.87	6.00
4	18.02	16.10	-10.68
5	12.43	10.65	-14.27
6	14.98	16.37	9.25
Promedio	16.58	16.57	-0.52
Desv. Est.	2.41	3.25	9.71

Tabla XXI. Efecto del extracto de pepino, 0.52 mg/ml, en la fuerza de contracción del corazón de *M. californianus*. (El ensayo fue realizado con corazones de un mismo lote y con las siguientes características biométricas promedio: (p) 0.04 ± 0.01 g, (lc) 7.67 ± 0.82 mm, (ac) 3.83 ± 0.41 mm, (lv) 9.87 ± 0.27 cm).

Corazón	Fuerza de contracción (g)		
	Antes tratamiento	Después tratamiento	% Cambio
1	0.79	0.95	19.86
2	0.35	0.43	22.83
3	0.29	0.35	19.13
4	0.70	0.78	10.87
5	0.69	0.80	15.62
6	0.36	0.44	21.78
Promedio	0.53	0.62	18.35
Desv. Est.	0.22	0.25	4.43

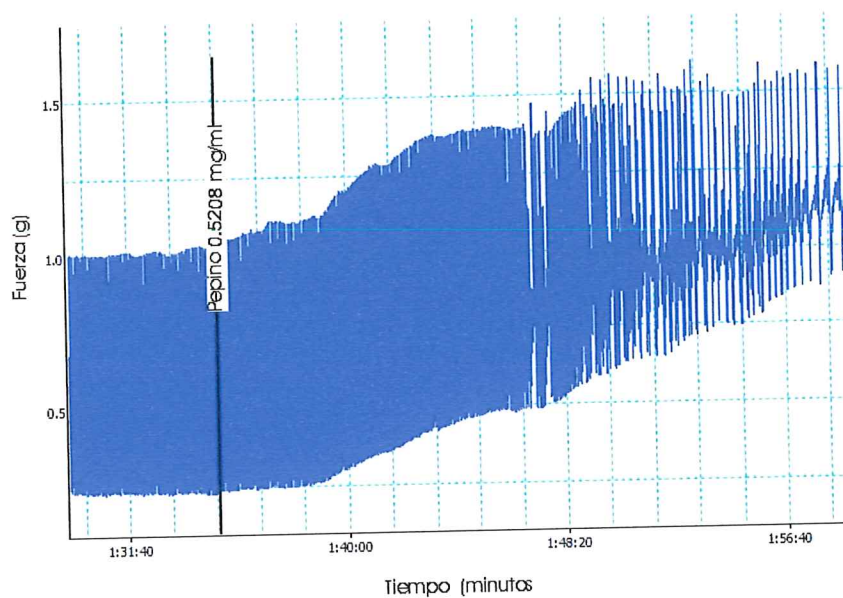


Figura 9. Registro del efecto de extracto de pepino de mar sobre la fuerza de contracción de *M. californianus*. Se muestra el aumento en la línea base acompañado de un aumento en la fuerza de contracción.

6. DISCUSIÓN

Al comparar la frecuencia cardíaca de *M. californianus* obtenida en este estudio con los valores reportados en la bibliografía para otras especies de bivalvos, se observó una gran variabilidad. Por ejemplo, para *Mercenaria mercenaria*, Devlin (1993) encontró una frecuencia de 3 a 7 latidos por minuto, mientras que Trueman y Lowe (1970) reportaron para *Isognomum alatus* una frecuencia de 15 - 36 latidos por minuto. Estos autores encontraron además, que el aumento de temperatura produce un aumento en la frecuencia cardíaca. Por otra parte, Guerra-Rivas (1994) encontró que la frecuencia cardíaca de *Tivela stultorum* es de 9 a 13 latidos por minuto a 18° C; mientras que Booth y Mangum (1978) reportaron para *Modiolus demissus*, valores de frecuencia de 12 a 16 latidos por minuto, aunque reportaron valores tan bajos como siete latidos por minuto para el mismo molusco. Como se observa, en resultados bibliográficos, existe una gran variabilidad en la frecuencia cardíaca entre diferentes especies de moluscos. Sin embargo, estos valores coinciden con lo descrito por Prosser (1973), quien reportó un intervalo en la frecuencia de las almejas que va de 0.2 a 22 latidos por minuto, intervalo en el cual cae la frecuencia cardíaca de *M. californianus*, evaluado en este trabajo.

Aunque hay mucha información referente a la frecuencia cardíaca de moluscos, existen pocos trabajos que reporten la fuerza de contracción del corazón suspendido en medio fisiológico de los bivalvos. Uno de estos trabajos es el de Guerra-Rivas (1994), quien encontró una fuerza de contracción del ventrículo de la almeja *Tivela stultorum* de 2.67 ± 0.24 g (media \pm s. e.). Para *M. californianus* se encontró una fuerza de contracción de 0.58 ± 0.03 g, que es 4.6 veces menor a la reportada para *T. stultorum*. Esta diferencia en la fuerza puede ser debida a la diferencia en el tamaño del ventrículo que existe entre ambos corazones, ya que el corazón de la almeja es 5.3 veces mayor que el del mejillón estudiado.

Al igual que en Guerra-Rivas (1994), en el presente trabajo se observó una variabilidad entre organismos, en la fuerza de contracción. Para *T. stultorum* los valores variaron entre 0.25 y 5 g mientras que en *M. californianus* la mínima fuerza de contracción fue de 0.30 g y la máxima de 0.82 g. La variación de la fuerza de contracción observada en este estudio puede ser debido a tres causas principales: a) las características biológicas de los individuos, b) el grado de tensión del ventrículo en la cámara de prueba y c) el tamaño en el ventrículo.

Los organismos utilizados en este estudio para el análisis de la fuerza de contracción pertenecen a un mismo lote de colecta, y cada individuo fue medido y cuidadosamente seleccionado por talla; sin embargo, pueden existir diferencias

en la respuesta entre organismos debido a su peso, edad y condiciones generales de los mismos. Por otra parte, la selección por talla, aún con la más alta rigurosidad, no garantiza semejanzas en las características del corazón.

Para explicar las variaciones en la tensión del ventrículo al ser colocado en la cámara de prueba se debe tomar en cuenta el modelo de deslizamiento de fibras para la contracción del corazón de bivalvos propuesto por Kelly y Hayes (1969). En este trabajo se utilizaron preparaciones de ventrículo de tipo isométrico, es decir, un sistema en el que las fibras que lo componen desarrollan una tensión a una longitud constante. En este tipo de preparaciones el grado de estiramiento será un factor determinante para el tamaño de la contracción; en un músculo demasiado estirado no existe el contacto entre los filamentos encargados de la contracción y por otra parte, en un músculo poco estirado, puede existir mucho traslape y un colapso de los filamentos por lo que no se da el deslizamiento de los mismos (Prosser, 1973). De lo anterior se desprende que otra de las posibles causas de la variación en la fuerza de contracción es la tensión que se ejerce sobre el ventrículo al momento de ser colocado en la cámara de prueba.

El tercer factor que puede afectar la fuerza de contracción es el tamaño del ventrículo, específicamente el ancho del mismo. Aparentemente, no existe mucha variación en cuanto a este parámetro (tabla I), pero el error estándar representa

un 3.1 % de variación. Esto sugiere que de un individuo a otro existen diferencias en la longitud de las miofibrillas, lo que provoca diferencias en la fuerza de contracción; ya que una mayor longitud en la miofibrilla puede producir una mayor fuerza de contracción que una menor longitud en la fibra.

A pesar de las diferencias en los valores de fuerza de contracción encontradas entre *M. californianus* y las reportadas por Guerra-Rivas (1994) para *T. stultorum*, es posible comparar la forma del trazo del latido de corazón de ambos bivalvos. En *T. stultorum* y, como se puede observar en la figura 6, en *M. californianus* la fuerza de contracción entre un latido y otro es igual, es decir, no existen diferencias en la fuerza de contracción entre los latidos de un mismo registro. Una diferencia entre los trazos de estas especies es la presencia, en los registros de *T. stultorum*, de la onda de llenado ventricular y que aparece poco antes de la contracción. En los registros de *M. californianus* no aparece este trazo, probablemente debido a que el tamaño del corazón y la fuerza de contracción son más pequeños, factores que pueden provocar que el momento de llenado ventricular sea débil y no se logre diferenciar de la contracción. A pesar de no observarse, este momento de la sístole debe estar presente, ya que posterior a la relajación del ventrículo se encuentra el llenado del mismo (Purves et al., 1998).

Para explicar el mecanismo de contracción de *M. californianus* se tiene que ver todo el corazón en conjunto; es decir, tomar en cuenta las diferentes

estructuras, enzimas y canales iónicos que participan en la contracción del miocardio. Para que las miofibrillas, actina y miosina, se contraigan, ocurre una serie de procesos de membrana, los cuales incluyen un intercambio de iones entre la célula y el medio. Uno de los iones más importantes para la contracción del corazón es el calcio, ya que la entrada de este ion al citoplasma y su interacción con la miosina permite la contracción de las miofibrillas; por el contrario, la disminución del mismo permite la relajación (Ferrari y Opie, 1992). Más aún, en el corazón de *Mytilus* se ha encontrado que la falta de calcio en el medio fisiológico provoca una disminución en la fuerza de contracción e inclusive la ausencia de latido en corazones aislados; mientras que otros iones como el sodio o potasio, no tienen este mismo efecto (Irisawa et al., 1967; Deaton y Greenberg, 1980; Curtis et al., 1999). Por otra parte, Jones (1983) describió los potenciales de acción para diferentes bivalvos en su relación con los canales de calcio y sodio; en el caso de un potencial de acción rápido, dependiente de calcio, observó una rápida despolarización seguida de una rápida hiperpolarización. Se sabe que existe una relación entre el potencial de acción y los cambios en la fuerza de contracción, ya que son éstos los que propician la contracción y relajación del músculo, y por lo tanto se pueden comparar. En todos los experimentos realizados en el presente estudio, el trazo obtenido en un corazón no tratado correspondió al desarrollo de potenciales de acción rápida, en donde la velocidad de llenado de ventrículo fue corta y seguida de un rápido vaciado, como se observa en la figura 6. De todo lo anterior se desprende que el corazón de *M.*

californianus es dependiente del calcio para su latido, de tal forma que las variaciones en la concentración de calcio se verán reflejadas en el trazo del latido. Es decir, un flujo constante y adecuado de calcio permite un buen funcionamiento del proceso de contracción-relajación en el miocardio, lo que se traduce en un patrón regular con latidos que presentan la misma fuerza de contracción y un valor de frecuencia constante a lo largo del tiempo.

Se sabe que los digitálicos aumentan la contractilidad en forma dependiente de la dosis, es decir que tienen un efecto inotrópico positivo. Este efecto se puede observar en preparaciones aisladas de músculos cardíacos en condiciones isométricas cuando al agregar un digitálico, existe un aumento en la fuerza máxima desarrollada y además se aumenta la velocidad de desarrollo de la fuerza y disminuye el tiempo de tensión máxima (Hoffman y Bigger, 1988). En el presente trabajo se observó el efecto que tiene la digoxina comercial sobre la fuerza máxima de contracción del ventrículo de *M. californianus*, que es la principal característica del efecto inotrópico positivo. El segundo efecto principal de los digitálicos sobre el corazón humano es el de disminuir la frecuencia ventricular que se considera un efecto cronotrópico negativo. De todo lo anterior se concluye que un buen modelo biológico será aquel organismo cuyo corazón o parte de él, presente un efecto cronotrópico negativo e inotrópico positivo al agregar un digitálico.

El efecto observado de la digoxina sobre el ventrículo de *M. californianus* concuerda con el efecto que tiene este glucósido sobre el corazón de organismos utilizados como modelos biológicos para este fin, ya que hubo un aumento significativo en la fuerza de contracción y en la frecuencia cardíaca. Sin embargo, el efecto no fue constante a lo largo del tiempo observándose momentos con menor fuerza que otros. Además, se obtuvo un trazo con algunas irregularidades al agregar el digitálico. Como se muestra en la figura 7, en donde se presenta el registro para uno de los mejillones, el corazón late con una frecuencia y fuerza constantes antes del tratamiento. Sin embargo, al agregar el Lanoxin, M. R., se produjeron diferencias en la fuerza de contracción entre uno y otro latido. Otro de los efectos del Lanoxin, M. R., fue la ausencia de latidos en algunos momentos. En la figura 8 se muestra este fenómeno tras agregar el digitálico ya que se observan bloques de latidos, seguidos por una ausencia de los mismos. Estas irregularidades en el trazo contrastan con lo reportado por Guerra-Rivas (1994), quien encontró un trazo constante con efecto cronotrópico negativo e inotrópico positivo en corazón de *T. stultorum* tratado con Lanoxin, M. R. a una concentración 10 μ M.

Lo anterior permite suponer que las irregularidades de trazo observadas fueron ocasionadas únicamente por la adición del digitálico, ya que la disponibilidad del calcio fue la adecuada a lo largo de todo el experimento, en el cual no se realizaron recambios del agua de mar. Además, en los invertebrados

marinos la concentración osmótica de los fluidos está en equilibrio con la del medio (Prosser, 1973). Si se considera despreciable la utilización de iones por el corazón en suspensión de agua de mar, entonces la composición iónica del medio no se ve afectada por este órgano. Por otra parte, el trazo del corazón de *M. californianus* fue constante previo a la aplicación del tratamiento, por lo que se puede decir que el medio en el cual se encontraba el corazón permitió el funcionamiento adecuado del corazón. Todo lo anterior refuerza la hipótesis de que los cambios en el patrón de latido se deben exclusivamente a la adición del digitálico, o como se hablará más adelante, del extracto probado.

Los cambios en la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción observados en el corazón en suspensión pueden ser relacionados con la inhibición ocasionada sobre la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa por la digoxina a concentraciones de 5 y 10 μM . Se sabe que la inhibición de esta enzima en el corazón aumenta la concentración intracelular del calcio a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, provocando un aumento en la fuerza de contracción (James et al., 1999). Por lo tanto, los cambios en el patrón del latido al agregar el digitálico pueden atribuirse a la relación de la enzima con el calcio, y sugieren que el corazón bajo el efecto del cardiotónico no es capaz de mantener altas las concentraciones de calcio durante todas las contracciones, produciendo latidos con una fuerza grande e inmediatamente después un latido con fuerza menor.

El patrón en bloque se puede explicar de la misma manera que el patrón descrito previamente. Como se muestra en la figura 8, dentro del mismo bloque se presentaron diferencias en la fuerza de latido de corazón. Por lo tanto, la inconsistencia en el latido, es decir, las diferencias en la fuerza de contracción entre latidos y por momentos la falta del mismo, puede ser una incapacidad del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de introducir calcio al citoplasma para iniciar la contracción.

Los cambios en la fuerza de contracción producidos en el corazón de *M. californianus* concuerdan con los resultados reportados para otras especies consideradas modelos biológicos. Guerra-Rivas reportó un cambio en la fuerza de contracción promedio para *T. stultorum* de 68 %. Por otra parte, Adams et al. (1982) encontraron en preparación de miocardio de rata un aumento del 34 % en la fuerza de contracción al agregar ouabaina a una concentración de 10 μM . En *M. californianus* se encontró un aumento en la fuerza de contracción promedio de 49 % al agregar Lanoxin, M. R. a una concentración de 10 μM .

Con los hallazgos realizados en el presente trabajo se puede concluir que existen similitudes entre el efecto de los digitálicos sobre el corazón de *M. californianus* y el efecto que tienen los digitálicos sobre otras especies ya validadas como modelo. Por otra parte, las semejanzas existentes entre el corazón humano y el ventrículo de *M. californianus*, permiten dilucidar los

mecanismos de acción de un cardiotónico potencial en el corazón del humano a partir de un bivalvo. La abundancia de la especie en nuestras costas significa una garantía en la disponibilidad del recurso, lo que se traduce en una provisión continua del organismo de prueba en estudios de cribado de sustancias cardiotónicas. Aunado a lo anterior, la sencillez del sistema de prueba y la facilidad y bajo costo de mantenimiento de *M. californianus* hacen de esta especie un buen modelo para la búsqueda de sustancias con potencial cardiotónico a partir de extractos de origen marino.

Los ensayos enzimáticos realizados con los extractos (tablas VIII a XVII) permitieron observar en TD una tendencia a inhibir la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa al aumentar la concentración del extracto; es por ello que fue probado su efecto sobre la frecuencia y fuerza de contracción del corazón de *M. californianus*. A una concentración alta, 71.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto, se observó, únicamente en un corazón, un trazo que se puede considerar anormal. La principal característica de este registro es la ausencia de latido durante cuarenta y cinco minutos, después de adicionar el extracto y, posteriormente, se observa un latido con menor fuerza de contracción que la registrada antes del tratamiento. Debido a los parámetros obtenidos a partir de este corazón no se observó una disminución significativa en la fuerza del latido de corazón; sin embargo, al omitir los valores de este corazón, sí existe una diferencia significativa en la fuerza de latido además de una diferencia significativa entre las concentraciones media y alta de TD.

Adicionalmente, al agregar TD a los corazones de *M. californianus*, se observó, en algunos corazones, un patrón en bloques similar al registrado en los corazones con digoxina. Estas irregularidades en el trazo registrado pueden ser debidas, una vez más, a una incapacidad del corazón de transportar eficientemente el calcio hacia dentro y fuera de la célula y de esta manera, llevar a cabo la contracción del miocardio. En cuanto a la frecuencia, no se encontró una diferencia significativa entre la frecuencia antes y después de la adición del extracto. Si el corazón fuera capaz de mantener un ritmo más constante, es decir, sin la ausencia de latido por algunos momentos, es posible observar un efecto cronotrópico negativo, ya que este es un resultado más de la inhibición de la Na^+ K^+ ATPasa. Con los datos se puede decir que el extracto de TD tiene un potencial como posible cardiotónico, ya que aumenta la fuerza de contracción de *M. californianus*.

Otro extracto probado fue el de pepino de mar *Stichopus parvimensis*, en este caso no se observó una clara inhibición en la Na^+ K^+ ATPasa, aunque ya ha sido reportado (Usabiaga del Moral, 1990). Adicionalmente, se sabe que los holotúridos en general, tienen glucósidos capaces de inhibir la Na^+ K^+ ATPasa y la Mg^+ ATPasa (Gorshkov et al. 1982). Debido a esta información bibliográfica se decidió probar el efecto de este extracto sobre el corazón de *M. californianus* y se encontró que produjo cambios en la fuerza de contracción y en el trazo del latido.

A la concentración más baja de extracto de pepino de mar, 0.52 mg/ml, se observó un patrón de trazo más regular y con menos efectos tóxicos que en los registros de las concentraciones más altas, por lo cual sí fue posible analizarlo. Como se muestra en la figura 9, se encontraron diferencias en la línea base ya que ésta cambia de posición con respecto al eje de la fuerza a la vez que aumenta la fuerza de contracción del corazón. El aumento en la línea de base parece indicar que el corazón no se relaja completamente después de cada contracción y por ello, es incapaz de regresar a la fuerza original durante la diástole. Este efecto puede ser debido a que la concentración de calcio en el citoplasma durante la relajación no disminuye completamente, provocando que algunos de estos iones queden unidos a la troponina y que el complejo actina-paramiosina se contraiga aún durante la diástole.

Otro de los hechos que refuerza el potencial cardiotónico del extracto de pepino es que en el corazón humano, a concentraciones mucho mayores de digitálico que las necesarias para demostrar el efecto inotrópico positivo, se produce un aumento en la tensión de reposo y contractura parcial asociada generalmente con la disminución de la velocidad de acortamiento y tensión isométrica máxima (Hoffman y Bigger, 1988). Como se observa en la figura 9, existe un aumento en la línea base del trazo del latido de corazón, a la vez que aumenta la fuerza de contracción. A concentraciones mayores a 0.52 mg/ml de

extracto de *S. parvimensis* se observó el aumento de la línea base y el latido es más pequeño en comparación con el trazo que se observa en la figura 9. Debido a los resultados obtenidos en la fuerza de contracción y al efecto observado en el corazón de *M. californianus*, se puede decir que el extracto de *S. parvimensis* tiene un potencial como cardiotónico.

7. CONCLUSIONES

- La frecuencia cardíaca del ventrículo de *M. californianus* en agua de mar a 17 °C fue de 16 latidos por minuto.
- La digoxina a una concentración de 8 y 10 µM ocasionó en el ventrículo de *M. californianus* efecto inotrópico positivo y efecto cronotrópico negativo, con un patrón de latido variable a la concentración más alta.
- La digoxina a una concentración de 8 µM y 10 µM ocasiona inhibición de la Na⁺ K⁺-ATPasa presente en el ventrículo de *M. californianus*.
- El ventrículo de *M. californianus* puede ser usado en el cribado de sustancias cardiotónicas de origen marino.
- El extracto de tentáculo de *Anthopleura elegantissima* en diclorometano ocasiona un efecto inotrópico positivo sobre el corazón de *M. californianus*.
- El extracto de *Stichopus parvimensis* ocasiona un efecto inotrópico positivo ocasiona un efecto inotrópico positivo sobre el corazón de *M. californianus*.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar más pruebas del efecto de TD sobre el corazón de *M. californianus*, ampliando el intervalo de concentración de la concentración 222 en adelante.
- Realizar pruebas del extracto de pepino con concentraciones menores que 0.5208 mg/ml.
- Verificar el efecto inotrópico positivo utilizando concentraciones más altas de 35.8333 µg/ml.
- Probar el efecto cardiotónico de fracciones purificadas de TD y pepino de mar.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, R. A. y M. J. Greenberg. 1969. A comparative study of cardioactive agents from bivalve tissue. *Comparative Biochemistry Physiology*. Vol. 31: 835-850.
- Allen, R. K. 1977. *Common Intertidal Invertebrates of Southern California*. Peek Publication. USA. 316 pp.
- American Heart Association, 2005. *Heart Disease and Stroke Statistics – 2005 Update*. Dallas, Texas: American Heart Association.
- ApSimon, J. W., J. A. Buccini y S. Badripersaud. 1972. Marine organic chemistry: isolation of 3β , 6α - dihidroxy- 5α -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.
- Avilov, S. A., A. S. Antonov, O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, R. Riguera, L. A. Lenis y C. Jiménez. 2000a. Triterpene glycosides from the Far-Eastern Sea cucumber *Pentamera calcigera*. I. monosulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivates. *Journal of Natural Products*. Vol 63 (No 1): 65-71.
- Avilov, S. A., A. S. Antonov, O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, R. Riguera, L. A. Lenis y C. Jiménez. 2000b. Triterpene glycosides from

- the Far-Eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. II. disulfated glycosides. *Journal of Natural Products*. Vol 63 (No 10): 1349-1355.
- Booth, C. E. y C. P. Mangum. 1978. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus demissus*. *Physiological Zoology*. Vol 51: 17-32.
- Cuellar Roheri, M. 1991. Utilización de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) como un organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B.C.
- Chanley, J. D., R. Ledeen, J. Wax, R. F. Nigrelli y H. Sobotka. 1959. Holoturín. I. The isolation, properties and sugar components of holothurin A. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 81: 5180- 5183.
- Curtis, T. M., M. H. Depledge y R. Williamson. 1999. Voltage-activated currents in cardiac myocytes of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. Vol. 124: 231-241.
- Deaton, L. E. y M. J. Greenberg. 1980. The ionic dependence on the cardiac action potential in bivalve molluscs: systematic distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. Vol. 67: 155-161.
- Devlin, C. L. 1993. An analysis of control of the ventricle of the mollusc *Mercenaria mercenaria*. I. The ionic basis of autorhythmicity. *Journal of Experimental Biology*. 179: 47-61.

- Doig, III, M. T., D. F. Martin y G. M. Padilla. 1973. Marine Bioactive Agents: Chemical and Cellular Correlates. En: Marine Pharmacognosy. Action of Marine Biotoxins at the Cellular Level. D. F. Martin y G. M. Padilla (Eds.). Academic Press. U.K. 317 pp.
- Ferrari, R. y L. H. Opie. 1992. Atlas of the Myocardium. Raven Press. U.S.A. 188 pp.
- Fieser, L. F y M. Fieser. 1944. Organic Chemistry. D. C. Heath and Company. USA. 1091 pp.
- Gorshkov, B. A., I. A. Gorshkova, V. A. Stonik y G. B. Elyakov. 1982. Effect of marine glycosides on adenosinetriphosphatase activity. Toxicon. Vol 20 (No. 3): 655-658.
- 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.
- Hoffman, B. F. y J. T. Bigger. 1988. Digital y Glucósidos Cardíacos Afines. En: Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. 7ma ed. A. Goodman Gilman, L. S. Goodman, T. W. Rall y F. Murad. Ed. Panamericana. Argentina.
- Íñiguez Martínez, A. M. 1990. Aislamiento del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B. C.

- Íñiguez Martínez, A. M. 1995. Determinación de la estructura de un componente del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B. C.
- Irisawa, H., S. Norikazu y M. Otani. 1967. Effect of Na⁺ and Ca⁺ on the excitation of the *Mytilus* (Bivalve) heart muscle. *Comparative Biochemistry Physiology*. Vol. 23: 199-212.
- James, P. F., I. L. Grupp, G. Grupp, A. L. Woo, G. R. Askew, M. L. Croyle, R. A. Walsh y J. B. Lingrel. 1999. Identification of a specific role for the Na,K-ATPase α 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Molecular Cell*. Vol. 3: 555–563
- Jones, H. D. 1983. The circulatory systems of gastropods and bivalves. En: Wilbur, K. M., Saleuddin, A. S. M. (Eds.) *Physiology of the Mollusca* Vol. 5. Part 2. Academic Press, U. S. A.
- Katzung, B. G. 1983. Cardiac Glycosides. En: *Essentials of Pharmacology*. 3rd edition. J. A: Bevan y J. H. Thompson (Eds.) Harper & Row. USA. 916 pp.
- Kaul, P. N., S. K. Kulkarni, A. J. Weinheimer, F. J. Schmitz y T. K. B. Karns. 1977. Pharmacologically active substances from de sea, II. Various cardiovascular activities found in the extracts of marine organisms. *Lloydia*. Vol 40, no 3: 253-268.

- Kelly, R. E. y R. L. Hayes. 1969. The ultrastructure of smooth cardiac muscle in the clam, *Venus mercenaria*. Journal of Morphology. Vol 127 (2): 163-175.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193(1): 265-275.
- Mayer , A. M. S. y M. T. Hamann. 2004. Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarian, antiplatalet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of Action. Marine Biotechnology. No. 6: 37-52.
- Monje Fernández, R. J. 1983. Experimentos sobre fijación de juveniles del mejillón *Mytilus californianus* en colectores artificiales y estudios de crecimiento para dos especies de mejillón (*M. californianus* y *M. edulis*) en cultivo experimental en la costa de Eréndira, Baja California, México. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. UABC. Ensenada, B. C.
- National Research Council. 1999. From Monsoons to Microbes, Understanding the Ocean's Role in Human Health. National Academy Press. USA. 132 pp.

- Perez-Plascencia, B. 1991. Efectos hematológicos del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, B. C.
- Prosser, C. L. 1973. Comparative animal physiology. 3ra ed. W. B. Saunder Company. USA. 966 pp
- Purves, W. K., G. H. Orians, H. C. Heller y D. Sadava. 1998. Life, the Science of Biology. 5th edition. Sinauer Associates, Inc. W. H. Freeman and Company. U.S.A. 1243 pp.
- Randall, D., W. Burggren, K. French. 2002. Eckert Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations. W. H. Freeman and Company. USA. 736 pp.
- Secretaría de Marina. 1974. Estudios Geográficos de la Región de Ensenada, B. C. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. 120 pp.
- Secretaría de Salud. 2002. Boletín de Información Estadística. Daños a la salud. Volumen II. No. 20 y 22. México, D. F.
- Sensch, O., W. Vierling, W. Brandt y Melchior Reiter. 2000. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. British Journal of Pharmacology. Vol 131: 1089-1096.

- Stonik, V. A., G. B. Elyakov. Structure and biologic activities of sponge and sea cucumber toxins. En: Handbook of Natural Toxins Vol. 3 Marine Toxins and Venoms. A. T. Tu (Ed.) . Marcel Decker, Inc. USA.
- Tanaka, M., M. Haniu, K. T. Yasunobu y T. R. Norton. 1977. Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin A. Biochemistry. Vol. 16 (No. 2): 204-208.
- Tortora, G. J. y S. R. Grabowski. 2000. Principios de Anatomía y Fisiología. 9na edición. Oxford University Press. USA. 999 pp.
- Trueman, E. R. y G. A. Lowe. 1970. The effect of temperature and littoral exposure on the hear rate of a bivalve mollusc. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Vol 38: 555-564.
- United Nations. 2003. The Ageing of the World's Population. Division for Social Policy and Development.
- Usabiaga del Moral, A. 1990. Efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B. C.
- Watson, T. R., H. T. Andrew Cheung y R. E. Thomas. 1984. Structure-Activity studies in cardiac glycosides. En: Natural Products and Drug Development, Alfred Benzon Symposium 20. P. Krogsgaard-Larsen, S. Brogger Christensen, H. Kofod, Copenhagen.
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. Fourth edition. New Jersey. 663 pp..