

Tesis defendida por

Marla Itzel Macias Contreras

Y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Graciela Guerra Rivas

Co-director del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Co-director del Comité

Dra. Ana Denise Re Araujo

Miembro del Comité

Dr. Ernesto García Mendoza

Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera

Coordinador

Programa de Posgrado en Ciencias
de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara

**Director de la
Dirección de Estudios de
Posgrado**

Febrero del 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR

DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA



Programa de posgrado en ciencias de la vida

con orientación en biotecnología marina

Ventrículo de *Mytilus californianus*: un modelo para la acción cardioactiva

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Marla Itzel Macias Contreras

Ensenada, Baja California, México 2014

Resumen de la tesis de Marla Itzel Macias Contreras, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Ventrículo de *Mytilus californianus*: un modelo para la acción cardioactiva

Resumen aprobado por:

Dra. Graciela Guerra Rivas

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Resumen aprobado por:

Entre las enfermedades del corazón más conocidas se encuentran la insuficiencia cardíaca y la fibrilación auricular, para las cuales los fármacos más utilizados son los glucósidos cardiotónicos o digitálicos. Estas sustancias provocan efectos tóxicos severos sobre el corazón, surgiendo la necesidad de buscar nuevos compuestos que tengan el mismo efecto terapéutico pero menos efectos tóxicos. El corazón del molusco bivalvo *Mytilus californianus* ha sido propuesto como un modelo biológico para la detección de esta clase de compuestos; sin embargo, debido a que se requiere de una mayor exploración que permita profundizar sobre la respuesta y la mecánica cardíaca de estos organismos, en este trabajo se analiza el desarrollo de la contracción del ventrículo en perfusión del mejillón *Mytilus californianus* evaluando la influencia de la temperatura y el efecto de digitálicos. El ventrículo en perfusión en agua de mar, se sujetó mediante ganchos a un transductor de fuerza. Se midió, la frecuencia y la fuerza de contracción, así como la velocidad promedio del desarrollo de la contracción ventricular durante la sístole y la velocidad promedio durante el desarrollo de la diástole o relajación ventricular a 17, 21, 22 y 23 °C. Estas variables se incrementaron al aumentar la temperatura. Para las concentraciones exploradas de digoxina, desde 0.1 μM hasta 10 μM a una temperatura de $21\pm 1^\circ\text{C}$, no se detectaron cambios significativos sobre la fuerza y frecuencia de contracción. Para la ouabaína, no se detectaron efectos sobre la frecuencia a 5, 10, 100 y 200 μM . Por otra parte, la fuerza de contracción se incrementó en un 11 y 24% a 100 y 200 μM , respectivamente. Esta respuesta a concentraciones relativamente altas del digitálico ouabaína, muestra para este caso, una sensibilidad baja hacia los glucósidos cardiotónicos probados.

Palabras clave: **Modelo biológico, digoxina, *Mytilus californianus*.**

Abstract of the thesis presented by Marla Itzel Macias Contreras as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Ventricle of *Mytilus californianus*: a model for action cardioactive

Abstract approved by:

Dra. Graciela Guerra Rivas

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

Abstract

The best known heart diseases are heart failure and atrial fibrillation. The most commonly used drugs for these diseases are cardiac glycosides or digitalics which are substances that cause severe toxic effects on the heart. As a consequence there is the need to find new compounds that have the same therapeutic effect but fewer toxic effects. The heart of the bivalve mollusk *Mytilus californianus* has been proposed as a biological model for the detection of cardiotoxic compounds. However, this model still requires further exploration and deepening on the mechanical response of the heart of these organisms is mandatory. In this work, the contraction of perfused ventricle of the *Mytilus californianus* mussel is analyzed to explore the influence of temperature and the effect of digitalics. The ventricle was perfused in seawater and clamped to a force transducer. Recordings were taken at temperatures 17, 21, 22 and 23 ° C; also, digoxin and ouabain effect was tested at 21 ° C. Rate and force of contraction as well as the speed of ventricular contraction during systole and diastole showed increments with increasing temperature. For the digoxin concentrations tested (0.1 µM to 10 µM) no significant changes were observed on the force and frequency of contraction. For ouabain, no effect on frequency was observed at any of tested concentrations (5, 10, 100 and 200 µM). On the other hand, the force of contraction increased by 11 and 24% at concentrations of 100 and 200 µM, respectively. This response reached only at relatively high concentrations of ouabain, reveals that the heart of *M. californianus*, has a low sensitivity to cardiac glycosides.

Keywords: **Biological model, digoxin, *Mytilus californianus*.**

Dedicatoria:

A mi familia

Agradecimientos:

- A mis padres Olivia y Noe, así como a mis hermanos, Socorro y Noe, por su apoyo incondicional y paciencia.
- A mi asesora Graciela Guerra Rivas, por todo su apoyo y consejos.
- A mi comité: Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro, Ana Denise Re Araujo, Ernesto García Mendoza, por el tiempo dedicado y apoyo brindado.
- Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad que me brindó para realizar mis estudios de maestría.
- A la Universidad Autónoma de Baja California por facilitarme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de mi proyecto de tesis.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado con una beca durante mis estudios de maestría.
- A mis compañeros de maestría por hacer la estancia entretenida.
- A mis compañeros de laboratorio, David, Gastón, Carlos, Héctor, Iván y Nadia, quienes hicieron que todos los días de trabajo fueran divertidos.

Contenido

	Página
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1 Glucósidos cardiotónicos.....	3
1.2 Detección de la actividad cardiaca.....	5
2. Antecedentes.....	8
2.2 Modelo contráctil.....	8
2.2 <i>Mytilus californianus</i>	10
2.3 Sistema cardio-vascular en moluscos bivalvos.....	12
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivos.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Colecta y mantenimiento.....	17
5.2 Medición de la mecánica contráctil.....	17
5.2.1 Temperatura.....	19
5.2.2 Digitálicos.....	19
5.3 Reactivos.....	20

5.4 Análisis estadístico.....	20
6. Resultados.....	21
6.1 Temperatura y tiempo de respuesta del ventrículo en perfusión.....	21
6.2 Temperatura, fuerza y frecuencia de contracción ventricular.....	22
6.3 Velocidad durante el desarrollo de la contracción ventricular.....	23
6.4 Velocidad durante el desarrollo de la relajación ventricular.....	24
6.5 Efecto del excipiente.....	25
6.6 Efecto de la digoxina sobre la fuerza y frecuencia de contracción.....	28
6.7 Efecto de la ouabaína sobre la fuerza y frecuencia de contracción.....	30
7. Discusión.....	33
7.1 Temperatura.....	34
7.2 Digitálicos.....	37
8. Conclusiones.....	42
9. Recomendaciones.....	43
Referencias bibliográficas.....	44

Lista de figuras

Figura	Página
1. Estructura de la digoxina, un glucósido cardiotónico típico.....	4
2. Ventrículo aislado de la especie <i>Mytilus californianus</i> (CONRAD 1837) sobre la cámara de prueba.....	18
3. Registro de la mecánica de contracción ventricular de la especie <i>Mytilus californianus</i>	19
4. Tiempo de respuesta contráctil de la preparación ventricular de los mejillones de la especie <i>Mytilus californianus</i> a diferentes temperaturas.....	21
5. Frecuencias de contracción de la preparación ventricular de los mejillones de la especie <i>Mytilus californianus</i> a distintas temperaturas.	22
6. Fuerza de contracción de la preparación ventricular de los mejillones de la especie <i>Mytilus californianus</i> a distintas temperaturas.	23
7. Velocidad durante el desarrollo de la contracción ventricular en el mejillón <i>Mytilus californianus</i> a distintas temperaturas.	24
8. Velocidad durante el desarrollo de la diástole ventricular del mejillón	

<i>Mytilus californianus</i> a distintas temperaturas.....	25
9. Latidos irregulares ocasionados por una concentración de etanol del 0.7% dentro del sistema	26
10. Latidos por bloques ocasionado por un concentración del 0.3% de etanol dentro del sistema.....	27
11. Frecuencias de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a diferentes concentraciones de etanol en el medio de perfusión.....	27
12. Fuerza de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a distintas concentraciones de etanol en el medio de perfusión.	28
13. Fuerza de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a diferentes concentraciones de digoxina en el medio de perfusión.....	29
14. Frecuencia de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a diferentes concentraciones de digoxina en el medio de perfusión.....	30
15. Frecuencia de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a diferentes concentraciones de ouabaína en el medio de perfusión.....	31
16. Incremento de la fuerza de contracción sobre el ventrículo de <i>Mytilus californianus</i> por una concentración de 200 μ M de ouabaína en el medio de perfusión.....	32
17. Fuerza de contracción ventricular del mejillón <i>Mytilus californianus</i> a distintas concentración de ouabaína en el medio de perfusión.....	32

1. **Introducción**

Los productos naturales han sido y siguen siendo una fuente importante de medicamentos utilizados para el tratamiento de enfermedades humanas, ya que ofrecen una gran potencia biológica y una gran diversidad estructural (Gordaliza, 2012). Prueba de ello es el hecho de que más de la mitad de los fármacos actualmente disponibles son compuestos naturales o están relacionados con ellos (Dias *et al.*, 2012; Gordaliza, 2012). Los organismos del ambiente marino son considerados como una fuente potencial de sustancias bioactivas y de estructuras únicas, debido a que las condiciones de su entorno altamente cambiantes y extremas, ha ocasionado en ellos la síntesis de metabolitos únicos (Garateix, 2005). Estos compuestos, producidos en condiciones ambientales muy distintas a las terrestres, pueden llegar a constituir la base de nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades.

En la actualidad, la búsqueda de nuevas sustancias con aplicación médica se ha vuelto indispensable debido a que aún prevalecen necesidades en el tratamiento de numerosas enfermedades. Algunos antibióticos han comenzado a ser insuficientes debido al desarrollo de resistencia por parte de los organismos patógenos y en otros casos los márgenes de seguridad de algunos medicamentos ofrecen desventajas para los pacientes, representadas por efectos tóxicos que pueden llegar a la muerte (Baños-Diez y Albaladejo, 2002). Este es el caso de los glucósidos cardiotónicos, compuestos utilizados para el tratamiento de algunas afecciones del corazón.

Debido a la acelerada dinámica poblacional que se ha dado en los últimos años, el desarrollo socioeconómico y el acceso a los servicios médicos, se ha logrado alcanzar un aumento en la esperanza de vida, una disminución de la natalidad y una reducción de la mortalidad por enfermedades infecciosas. Esto contribuye a que la población en edad adulta constituya el grupo de mayor proporción (Velázquez-Monroy, 2007; Secretaría de Salud, 2011). En México, los adultos mayores aumentaron de 4.1 millones en 1996 a 7.1 millones en el año 2000 y se incrementará de manera progresiva, estimándose que para el año 2050 existirán 32.4 millones de adultos mayores (Secretaría de Salud, 2011).

Este envejecimiento de la población, acompañado por un cambio de dieta (incremento en el número de calorías, grasa y sal), el tabaquismo, la falta de ejercicio y obesidad (Velázquez-Monroy, 2007), eleva la probabilidad de padecer enfermedades crónico – degenerativas, como es el caso de las enfermedades del corazón y las enfermedades cerebrovasculares, las cuales en la actualidad predominan en la población adulta (Secretaría de Salud, 2011).

De acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo occidental, presentándose cada 4 segundos un infarto agudo de miocardio y cada 5 segundos un evento vascular cerebral (Rosas-Peralta y Attie, 2007; Organización Mundial de la Salud, 2013). Se calcula que en el 2008 murieron 17.3 millones de personas y que para el 2030 morirán cerca de 23.3 millones de personas por esta causa (Organización Mundial de la Salud, 2013). En México, este grupo de enfermedades constituye un problema de salud representando la primera causa de muerte al igual que en otros países del mundo, presentándose anualmente cerca de 70 000 defunciones por este motivo (Secretaría de Salud, 2011).

Los padecimientos del corazón que se han colocado como una de las primeras causas de mortalidad en la actualidad son la insuficiencia cardíaca (IC) y la fibrilación auricular (FA), entre las que existe una relación biunívoca, donde la insuficiencia cardíaca genera FA y la FA genera falla cardíaca (Arias *et al.*, 2000). La insuficiencia cardíaca se ha definido como un estado fisiopatológico complejo que es el resultado de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que limita la habilidad ventricular de llenado o la eyección sanguínea. La principal causa establecida de este padecimiento es la enfermedad arterial coronaria causante de isquemia y necrosis miocárdica (Arias *et al.*, 2000). La fibrilación auricular es una de las arritmias cardíacas más comunes en la actualidad. Una de las hipótesis más consistentes sobre la causa de este padecimiento es que existe una distribución no homogénea de los períodos refractarios en los que el tejido atrial no genera una conducción eléctrica (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006). Entre los fármacos de mayor uso para tratar a pacientes con estos padecimientos están los glucósidos cardiotónicos o digitálicos, los β -bloqueadores y los antagonistas del calcio, siendo la digoxina, glucósido cardiotónico, la primera opción de tratamiento en la FA asociada a insuficiencia cardíaca (Pastelín-Hernández, 2002).

1.1 Glucósidos cardiotónicos

Los glucósidos cardiotónicos son compuestos que se obtienen hace ya más de 200 años de diversas plantas, y que potencian la fuerza de contracción del corazón, acción conocida como inotropía positiva (Peret-Riera, 1971; Malgor y Valsecia, 2000). Entre los glucósidos cardiotónicos se encuentran los digitálicos (digoxina y digitoxina) y los estrofantos (estrofantina y ouabaína), obtenidos de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* y de *Strophantus gratus* y *Strophantus kombe* respectivamente (Korolkovas y Burckhalter, 1983). Entre los compuestos más utilizados se encuentran la digoxina, para el tratamiento de afecciones cardíacas debido a su rápida biodisponibilidad al ser administrada por vía oral y a su relativa larga vida de entre 14 y 60 horas; y la ouabaína, utilizada especialmente para investigación (Perlin, 1988; Wu, *et al.*, 1989). Estos compuestos están constituidos químicamente por una aglicona o genina unida a dos o más azúcares (Fig. 1). La aglicona está constituida por una porción esteroidal y un anillo de γ -lactona que es α , β -insaturada o una δ -lactona α , β -insaturada y es la que contiene la actividad farmacológica, mientras que los azúcares determinan la solubilidad, tasa de absorción, duración de la acción y las propiedades de unirse al plasma y tejidos del compuesto (Large y Hughe, 1988).

El aumento en la fuerza de contracción producida por los glucósidos se debe principalmente a un aumento citosólico de Ca^{+2} durante la sístole, que aumenta la velocidad y el grado de acortamiento del músculo. Este aumento de Ca^{+2} es el resultado indirecto de la inhibición de la bomba de $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ en la membrana, el cual es uno de los principales mecanismo de acción de estos fármacos. La inhibición de la bomba conduce a un aumento de la concentración citosólica de Na^{+} y una disminución del gradiente de éste a través de la membrana, lo que favorece el flujo de Ca^{+2} hacia al interior de la célula mediante un mecanismo de intercambio $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$. El resultado final es un aumento de Ca^{+} en el retículo sarcoplasmático del miocito, lo que aumenta la cantidad liberada de este ion durante el potencial de acción, con el consiguiente aumento en la contractibilidad. Además de esto, a nivel electrofisiológico, los glucósidos incrementan la actividad vagal e inhiben la conducción en el nódulo aurículo-ventricular al prolongar su período refractario (Perlin, 1998; Teresa-Galván y Anguita-Sánchez, 2006). Por lo anterior, los efectos principales de estos fármacos son fundamentalmente: el aumento de la energía de contracción (efecto inotrópico positivo), la disminución de

la capacidad del miocardio para producir su propio impulso (efecto cronotrópico negativo) y la disminución de la conductibilidad, por aumento en el periodo refractario (efecto dromotrópico negativo) (Peret-Riera, 1971).

Figura 1. Estructura de la digoxina, un glucósido cardiotónico típico. Tomado de “Ion pumps as targets for therapeutic intervention: Old and new paradigms” de Perlin, D. S. 1988. Electronic Journal of Biotechnology. 1(2): 57.

Los glucósidos cardiotónicos son ampliamente utilizados, pero poseen un margen terapéutico reducido; es decir, presentan un intervalo pequeño de concentración a la cual existe la probabilidad de que consigan la eficacia terapéutica con mínima toxicidad (Baños-Diez y Albaladejo, 2002). El margen terapéutico o intervalo terapéutico es un valor estadístico, una guía que indica las concentraciones a las que la mayoría de los pacientes mostrarán una respuesta adecuada al fármaco, sin indicar con precisión la concentración ideal que requiere un paciente. Por esta razón, en el caso de medicamentos con un estrecho intervalo terapéutico, es posible que los pacientes más sensibles muestren efectos tóxicos a dosis terapéuticas de pacientes menos sensibles, como es el caso de los glucósidos cardiotónicos. La toxicidad de estos compuestos ocasiona daños sobre el corazón, el sistema nervioso y el sistema gastrointestinal, apareciendo como primeras manifestaciones de sobredosis síntomas como inapetencia, náuseas,

vómitos y diarrea. Con grado más avanzado de toxicidad puede ocurrir taquicardia y fibrilación ventricular (Peret-Riera, 1971; Oliveri, 1999). Esta toxicidad presentada por los glucósidos cardiotónicos es resultado del aumento excesivo de Ca^{+2} intracelular, sobrepasando los límites de almacenamiento del retículo sarcoplásmico, lo que provoca una despolarización transitoria tardía seguida por una contracción (Perlin, 1998). Debido a este estrecho margen terapéutico, es importante la búsqueda de nuevas fuentes de productos cardioactivos que tengan el mismo efecto terapéutico que los digitálicos pero con propiedades tóxicas menores.

1.2 Detección de actividad cardiaca

Una de las técnicas que ha sido ampliamente utilizada en el proceso de hallazgo de nuevos fármacos es el "screening" o cribado biológico, el cual permite establecer la actividad biológica de diversas fuentes al ser evaluada en bioensayos o sistemas de prueba (Tammela, 2004; Bhakuni y Rawat, 2005). En el campo de la biotecnología, esta técnica recibe el nombre de "bioprospección" y para poder utilizarse, requiere de un sistema biológico de prueba que sea sensible al material examinado y que presente una respuesta biológica susceptible de ser cuantificada, permitiendo así una visión del efecto del ingrediente activo.

La selección de organismos modelo para el estudio de enfermedades humanas, suele realizarse a través de similitudes fisiológicas, anatómicas o genéticas, compartidas con los seres humanos. Además de éstos, factores como la disponibilidad, facilidad de manipulación y costos, son considerados para su selección. Los mamíferos han sido los principales organismos manejados en el laboratorio, siendo los roedores el orden más comúnmente utilizado para la experimentación. Tanto para la detección como para la evaluación del efecto de compuestos con actividad sobre la contracción cardiaca, los roedores han sido de igual manera, los animales de mayor uso. Se han reportado investigaciones realizadas en músculo cardiaco aislado tanto de conejillos de indias, ratas y ratones (Heirzig y Mohr, 1984; Kang y Weiss, 2002) como de mamíferos de mayor tamaño como los conejos, gatos, perros y borregos (Rayner y Weatherall, 1957; Vassalle *et al.*, 1963; Ruch, *et al.*, 2003).

En respuesta a la creciente preocupación sobre la utilización de vertebrados en la experimentación, se ha incrementado el interés por el uso de invertebrados como

modelos para el análisis de procesos y padecimientos (Wilson-Sanders, 2011). Durante las últimas décadas, el tejido de invertebrados marinos, como los corazones de bivalvos, han sido utilizados extensamente para bioensayos así como para experimentos fisiológicos y farmacológicos (Kuwasawa y Hill, 1997), en los que se ha llegado a examinar la acción de numerosas sustancias cardioactivas, como la acetilcolina y la serotonina (Smith, 1987; Kodirov, 2011). Para *Mytilus californianus* y *Tivela stultorum* de esta región, se ha reportado que el ventrículo perfundido responde de manera similar al corazón de los mamíferos cuando se expone a la acción de los digitálicos (Guerra-Rivas, 1994; Lumbreras-Martínez, 2012). En estos trabajos se mostró que ambos sistemas en perfusión presentan un incremento en la fuerza de contracción (inotropía positiva) y disminución en la frecuencia cardiaca (cronotropía negativa) ante la digoxina, reportándolos como modelos biológicos adecuados para la detección de compuestos farmacológicamente similares. Sin embargo, las investigaciones realizadas sobre el mismo en relación a la acción de los compuestos digitálicos han sido pocas y se han visto enfocadas sobre la fuerza de contracción, requiriéndose aún de una mayor exploración que permita profundizar sobre su respuesta contráctil y conocer a mayor detalle su potencial en la identificación de compuestos análogos a la digoxina. Aunado a esto, se requiere además conocer el efecto de factores físicos sobre este sistema, que ayuden a prevenir, detectar y eliminar las posibles fuentes de alteraciones sobre la contractibilidad ventricular al ser utilizado como modelo biológico. Con el propósito de profundizar y detallar la función mecánica en estos organismo, en este estudio se analiza el desarrollo de la contracción del ventrículo en perfusión del mejillón *Mytilus californianus*. Así mismo, se evalúa la influencia de la temperatura y el efecto de digitálicos.

2. Antecedentes

2.1. Modelo contráctil

Una gran cantidad de estudios sobre diferentes mamíferos se han llevado a cabo para analizar y conocer a detalle los efectos causados por los digitálicos sobre la contracción del tejido cardíaco. Los corazones íntegros o segmentos de este órgano en perfusión se han utilizado para detectar y medir estos efectos en procesos fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos. La técnica bajo la cual se usa el corazón o tejido se caracteriza por registrar y medir la contracción espontánea del órgano, el cual ha sido colocado en una cámara sumergida en una solución fisiológica diseñada para cubrir los requerimientos de iones. En el caso de uso del corazón íntegro, debido a que el órgano se encuentra intacto y contiene todos los canales iónicos, receptores, transportadores, intercambiadores y/o enzimas que podrían ser el objetivo de acción del compuesto a evaluar, lo hace una gran herramienta para detectar los efectos a diferentes niveles (Groos, 1994; Guo *et al.*, 2009).

Las diferentes investigaciones sobre la contracción cardíaca bajo el efecto de digitálicos han dejado ver diferencias en el nivel de contracción sobre tejidos de

diferentes organismos, revelando distintos grados de sensibilidad hacia los digitálicos. Está bien establecida la capacidad de los glucósidos de inhibir la bomba de Na^+/K^+ en la membrana, dando como resultado un incremento en la concentración de Ca^{2+} celular, el cual es responsable de su acción inotrópica positiva, y a altas concentraciones, también de su toxicidad (Wasserstrom y Aistrup, 2005).

La bomba de Na^+/K^+ es un complejo proteínico transmembranario cuya función principal es mantener los altos gradientes de sodio y potasio a través de la membrana celular. Esta bomba es el principal determinante de la concentración de Na^+ citoplasmático, teniendo también un papel importante en la regulación del volumen celular, del pH citoplasmático y de los niveles de calcio a través de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ respectivamente (Therien y Blostein, 2000).

La bomba Na^+/K^+ está constituida por dos subunidades, alfa (α) y beta (β), que forman un tetrámero integrado en la membrana. Esta bomba pertenece al grupo de las ATPasas de tipo P, utilizando la hidrólisis de ATP para llevar a cabo el transporte de iones a través de la membrana celular. La subunidad alfa (α) es la entidad catalítica, conteniendo los sitios de unión de los iones sodio y potasio, del ATP y de los glucósidos cardiotónicos. La subunidad beta (β) no parece encontrarse involucrada en la actividad, especulándose que su función radica principalmente en el ensamblaje y anclaje del complejo proteínico a la membrana celular (Jiménez y Merchant, 2003). Para esta bomba se ha detectado que existen tres diferentes tipos de subunidades alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) presentes en el corazón de los mamíferos, los cuales a su vez muestran diferentes grados de sensibilidad a los glucósidos cardiotónicos además de encontrarse distribuidas en distinta forma en el corazón de las diferentes especies (Jiménez y Merchant, 2003; Wasserstrom y Aistrup, 2005). En el corazón de la rata, por ejemplo, se ha encontrado que se expresa principalmente la subunidad $\alpha 1$ de baja sensibilidad (>75%), con la presencia en baja proporción de la subunidad $\alpha 2$ de mayor sensibilidad. Las ratas adultas son organismos particularmente resistentes a la acción de los glucósidos cardiotónicos, en los que se ha observado presentarse el 50% del máximo efecto de inotropía positiva a una concentración de 23 μM al ser expuesto al digitálico ouabaína (Fricke *et al.*, 1975; Lucchesi y Sweadner, 1991). Para el corazón del perro se ha detectado la presencia de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 3$, de baja y alta afinidad respectivamente, mientras que para la oveja y el cobayo, organismos sensibles a

los glucósidos, predomina la subunidad $\alpha 1$ (Sweadner *et al.*, 1994). En el cobayo se ha reportado que se alcanza un incremento en la contracción de aproximadamente el 30% a una concentración de 1.2 μM de ouabaína (Ku, 1974; Herzig y Mohr 1984). En el corazón humano se reporta la presencia de las tres subunidades alfa, todas con una alta sensibilidad a la inhibición por los glucósidos cardiotónicos, presentándose efectos inotrópicos a concentraciones nano-molares (Wang *et al.*, 2001; Wasserstrom y Aistrup, 2005). Esta sensibilidad presentada por las diferentes especies es considerada esencialmente el resultado de las diferencias de distribución y de expresión de las subunidades alfa.

Al igual que para los mamíferos, se ha diseñado una técnica de perfusión para el ventrículo de moluscos bivalvos. Esta técnica, diseñada por Guerra-Rivas para el estudio de agentes cardiotónicos en *Tivela stultorum* fue aplicada por Lumbreras-Martínez (2012) en el mejillón *M. californianus* en la evaluación de los efectos de compuestos cardioactivos. Básicamente, consiste en el aislamiento del ventrículo y su colocación en un medio de perfusión que lo abastece de los iones necesarios para su funcionamiento, llevándose a cabo el registro y medición de los cambios en la contractibilidad por la exposición a dichos compuestos. Esta metodología se distingue por ser más sencilla y rápida de utilizar que la reportada para mamíferos, dado que la solución en la que se encuentra inmerso el ventrículo es agua de mar y la instrumentación para realizar los registros es de menor complejidad. Mediante esta técnica de perfusión ventricular, para moluscos bivalvos se han reportado valores de inotropía positiva tanto a concentraciones altas (8 μM) como a concentraciones bajas (2.5 μM) de digoxina (Guerra-Rivas, 1994; Alarcón-Arteaga, 2005; Lumbreras-Martínez, 2012).

2.2. *Mytilus californianus*.

Los mejillones son un componente ecológico importante dentro de los ecosistemas costeros en todo el mundo. Los organismos pertenecientes al género *Mytilus* se encuentran entre los moluscos marinos más comunes encontrados en las costas de las regiones templadas en los hemisferios norte y sur (Dias *et al.* 2011). Este género es uno de los grupos más diversos y distribuidos de la familia Mytilidae, dentro del cual se encuentran 5 especies: *Mytilus californianus*, *Mytilus coruscus* (Gould 1861), *Mytilus edulis* (Linné 1758), *Mytilus galloprovincialis* y

Mytilus trossulus (Gould 1850) (Cáceres-Martínez *et al.*, 2003). Estos organismos suelen ocupar preferentemente la zona intermareal, distribución delimitada que se encuentra controlada principalmente por factores biológicos de predación y competencia más que a una inhabilidad de sobrevivencia en las condiciones encontradas en la zona submareal (Gosling, 1992).

El molusco bivalvo *Mytilus californianus* se encuentra extensamente distribuido desde la costa oeste de Alaska en Norte América hasta el norte de México (Schmidt, 1999; Smith *et al.*, 2006). Dentro de las costas occidentales de Baja California, este bivalvo es un componente característico que ocupa fundamentalmente ambientes rocosos expuestos en la zona intermareal, pudiéndose encontrar en algunos casos hasta a 12 metros de profundidad en el área sublitoral (Gosling, 1992). Estos organismos llegan a formar grandes camas o parches compuestos por mejillones creciendo unos sobre otros, parches que tienden a acumular sedimento y heces, así como restos de cáscaras (Norling y Kautsky, 2008; Dias *et al.* 2011). Dentro de las matrices o camas formadas por estos organismos, se ha observado que tanto la luz como la temperatura disminuyen, generándose lo que se consideraría un micro-habitat en el que se pueden encontrar temperaturas de entre 5 ° hasta 13 °C por debajo de los valores hallados en superficie (Gosling, 1992). Estas acumulaciones generan un refugio y proveen de protección al estrés ambiental a otras especies que presentan una tolerancia restringida a estos parámetros (Norling y Kautsky, 2008; Dias *et al.* 2011). Estas grandes camas, por lo tanto, forman parte importante de la ecología costera, contribuyendo a la biodiversidad, dentro de las cuales se han llegado a reportar alrededor de hasta 300 especie asociadas a estas agrupaciones en una sola localidad y de hasta 750 en una región (Smith *et al.*, 2006). Estas acumulaciones además de refugio, han sido objetivo importante para la acuicultura dada la gran abundancia en las costas de las diferentes especies de *Mytilus* y su alta demanda para el consumo humano (Norling y Kautsky, 2008; Dias *et al.* 2011).

Los límites de distribución del género *Mytilus* sobre la costa son constantes durante largos periodos, siendo la temperatura uno de los factores más importantes que determinan estos límites en la zona intermareal. Se sabe que la especie *M. edulis* logra resistir temperaturas considerablemente frías, determinándose bajo experimentación en laboratorio que la temperatura letal media para organismos con una talla mayor que 3 cm se encuentra por debajo de los -16 °C. La especie *M.*

californianus tolera variaciones menores de temperatura, siendo incapaz de soportar condiciones congelantes como lo suele lograr *M. edulis*, razón por la cual no se encuentra dominando la zona intermareal en la parte norte de Alaska. Los valores máximos de temperatura que soportan los organismos de este género varían de acuerdo a la región, observándose que en Inglaterra *M. edulis* tolera temperaturas alrededor de los 29 °C, mientras que esta especie en otras costas europeas no experimenta temperaturas mayores a los 25 °C (Gosling, 1992).

En las costas del norte de Baja California, *M. californianus* habita bajo el sistema de corrientes de California, dominada por las aguas árticas y subtropicales, cuya proporción de mezcla se encuentra en función tanto de variaciones espaciales como temporales. Esta zona se caracteriza por presentar eventos de surgencia durante todo el año, manteniendo valores de temperatura relativamente estables con variaciones bajas, de alrededor de 3 °C. El afloramiento intenso de estas aguas es característico para la época de primavera, periodo en el que se presentan los valores mínimos de temperatura en la zona costera, encontrado alrededor de los 14 °C, mientras que durante el mes de septiembre se reportan los valores máximos de temperatura para estas aguas, de alrededor de 17 °C (Gómez y Jerónimo, 2009; Durazo *et al.*, 2010).

2.3. Sistema cardio-vascular en moluscos bivalvos.

En todos los moluscos bivalvos, el sistema circulatorio es considerado un sistema abierto, dividido principalmente en el sistema venoso y arterial; este último conformado por la aorta anterior y posterior. El corazón se encuentra formado por dos aurículas y un ventrículo, el cual, además de su función contráctil, también se encuentra involucrado dentro de la excreción. El ventrículo es una cámara compleja con forma de saco, atravesada por numerosas fibras musculares responsable en mayor grado de la contracción del corazón. A éste se encuentran unidas, por cada lado, una aurícula, generando una cámara con tres compartimentos separados, donde una banda de tejido miocárdico en la parte ventral de pericardio conecta las dos aurículas entre sí. Entre las aurículas y el ventrículo se encuentra una válvula (válvula A-V) que mantiene el flujo de sangre en un solo sentido desde las aurículas al ventrículo (Shumway, 1991).

El llenado del corazón de los bivalvos es explicado por el mecanismo conocido como “volumen constante” o “volumen de compensación” el cual indica que la contracción del ventrículo disminuye la presión hidrostática en la cavidad pericárdica, forzando a las paredes de las aurículas a expandirse. El flujo en un solo sentido en los extremos de las aurículas garantiza como resultado la expansión ventricular (Shumway, 1991).

En bivalvos, el sistema nervioso se encuentra comprendido por tres pares de ganglios: cerebral, pedal y visceral. El corazón recibe un par de nervios cardiacos desde el ganglio visceral, el cual se encuentra a su vez unido al ganglio cerebral a través de nervios cerebro-visceral. Estos nervios entran bilateralmente en ambas aurículas, penetrando filamentos al ventrículo a través de las válvulas aurícula-ventriculares, extendiéndose la inervación sobre todo el corazón. Estas fibras nerviosas contienen tanto fibras inhibitorias como excitatorias, donde neurotransmisores como la serotonina se han visto controlando las funciones cardiacas (Shumway, 1991; Michaelidis *et al.*, 1993; Kuwasawa y Hill, 1997; Zaixso, 2003). La acetilcolina es otro de los neurotransmisores que han puesto de manifiesto su influencia sobre los nervios cardiacos, ocasionando diferentes cambios en los potenciales de membrana de las células cardiacas en bivalvos (Elliott, 1980). Kuwasawa y Hill (1997) evidenciaron la transmisión neuromuscular sobre el corazón en la almeja *Mercenaria mercenaria*. Observaron que el corazón de esta especie es controlado por nervios colinérgicos que inhiben el potencial de acción, y nervios serotoninérgicos que excitan el miocardio y la válvula A-V. Otra observación relevante realizada por estos autores es que la estimulación de los nervios viscerales que controlan los sifones incurrentes y excurrentes provoca braquicardia o taquicardia.

La respuesta contráctil del corazón de bivalvos no sólo ha sido evaluada a través del efecto de neurotransmisores; también se ha llevado a cabo el monitoreo de los cambios del ritmo cardiaco ocasionado por el efecto de diferentes factores físicos como la temperatura, la alimentación o la disponibilidad de oxígeno, utilizando este parámetro como un indicador de estrés (Pandolfo *et al.*, 2009).

Nicholson (2002) observó que el bivalvo *Perna viridis* responde rápidamente a la temperatura ambiental registrando un incremento en el número de latidos por minuto a medida que ésta aumenta. Este mismo patrón fue observado para las

especies de *Mytilus* sp. por diferentes autores. Widdows (1973), además de evidenciar esta misma respuesta por parte del mejillón *M. edulis* observó que la frecuencia cardíaca de esta especie no se aclimata a los cambios de temperatura. De igual manera, se observó que la inanición reduce el consumo de oxígeno y la frecuencia cardíaca de este organismo, caso contrario observado para la especie *Perna viridis*, en la que no se presentaron efectos de este factor sobre la frecuencia. Pickens (1965), además de reportar la relación positiva existente entre la temperatura y la frecuencia cardíaca para organismos vivos de la especie *M. californianus*, observó que este patrón es seguido por el corazón aislado de esta especie, en donde a diferencia de los organismos vivos, el corazón aislado se mantenía activo tanto a temperaturas bajas (3 °C) como a temperaturas altas (30 °C). La salinidad es otro de los parámetros que ha sido investigado sobre la contractibilidad del corazón de moluscos. Ha sido reportado que el mejillón *Mytilus edulis* muestra tolerancia a los cambios de salinidad al no observar modificaciones en el número promedio de latidos al ser expuesto a diferentes salinidades (Nicholson, 2002). Sin embargo, Bakhmet *et al.* (2005) reportaron que en organismos de esta misma especie, a porcentajes bajos de salinidad, se tiene considerable efecto sobre la actividad cardíaca, siendo los organismos provenientes de la zona sublitoral más sensitivos a las variaciones de este factor.

Como se mencionó con anterioridad, el ventrículo en perfusión de la especie *M. californianus* ha sido evaluado para ser utilizado como modelo en la detección de compuestos análogos a los digitálicos; sin embargo, para conocer en mayor detalle la respuesta contráctil de esta preparación, en este trabajo se ha llevado a cabo la valoración del efecto de la temperatura así como digoxina y ouabaína sobre este modelo.

3. **Hipótesis:**

La velocidad durante la contracción (sístole) y relajación (diástole) ventricular del mejillón *Mytilus californianus* así como su fuerza y frecuencia, se modifican por el efecto de la temperatura y por su exposición a compuestos digitálicos.

4. **Objetivos**

4.1 Objetivo general

Evaluar la fuerza, frecuencia y velocidad de contracción durante la sístole y diástole ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a diferentes temperaturas del medio de perfusión y a una concentración creciente de digitálicos.

4.2 Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de la temperatura en la velocidad del desarrollo de la fuerza de contracción del ventrículo en perfusión de *Mytilus californianus*.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la velocidad de relajación del ventrículo en el mejillón *Mytilus californianus*.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre el tiempo de respuesta y el desarrollo de la fuerza y frecuencia cardíaca en el ventrículo del mejillón *Mytilus californianus*.
- Evaluar el efecto de la digoxina y ouabaína sobre la fuerza y frecuencia cardíaca del ventrículo en perfusión del mejillón *Mytilus californianus*.

5. Metodología

5.1 Colecta y mantenimiento

Mejillones de la especie *Mytilus californianus* colectados en el ejido Eréndira, Ensenada, B. C., fueron utilizados para los diferentes ensayos. Únicamente organismos adultos con un tamaño promedio de concha de 8.0 ± 0.5 cm, medidos con la ayuda de un vernier "Performance Tool", fueron seleccionados. Los organismos fueron transportados al laboratorio el mismo día de su colección y mantenidos en agua de mar natural (35‰) en peceras, bajo una temperatura constante (16 °C). Los mejillones fueron alimentados una vez al día con la microalga comercial Isocrysis 1800 (Instant Algae, Reed Mariculture Inc. USA) con un conteo celular de 3.9 mil millones/ml. Se utilizaron 150 µL por pecera, cada una de las cuales con una capacidad de 20 L, contenía 20 organismos. Los especímenes fueron mantenidos durante dos semanas en estas condiciones antes de ser utilizados en los diferentes ensayos.

5.2 Medición de la mecánica contráctil

Siguiendo la metodología establecida por Guerra-Rivas (1994), los organismos fueron disectados extirpándose rápidamente el corazón. Éste fue colocado en una cámara de prueba, la cual contenía agua de mar natural con aireación constante.

Uno de los extremos de las aurículas del corazón, se mantuvo sujeto, mediante un gancho a la aguja que permite la aireación dentro de la cámara, la cual se encontraba en la base de la misma. El otro extremo de la aurícula se sujetó de un gancho al transductor de fuerza MLT050/A conectado a un amplificador marca Power Lab 10T de ADInstruments. El registro de la señal mecánica de contracción se realizó en computadora a través del programa Chart 7.0 (fig.2 y fig. 3).

Si el ventrículo aislado una vez colocado dentro en la cámara de prueba, no mostraba una respuesta contráctil, se estimulaba mediante de una ligera punción sobre la superficie de unión entre las aurículas y el ventrículo con una aguja hipodérmica estéril.

La tensión contráctil fue medida con una sensibilidad de 5 mV/g. La longitud de máxima tensión del tejido fue determinado por el estiramiento gradual del músculo, el cual posteriormente se redujo hasta obtener alrededor del 80% de

máxima tensión. Latidos con fuerza estables y constantes son requeridos por lo menos 5 minutos antes de exponer el tejido a las soluciones de prueba.

Para cada registro se obtuvo la frecuencia cardiaca, definida como el número de latidos por minuto (lat/min). Cada latido se encuentra comprendido desde el inicio de la contracción hasta el final relajación, en el movimiento ventricular. Se estableció además la fuerza de contracción, como la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de registro de cada latido, expresado en gramos-fuerza (g-f). La velocidad máxima durante el desarrollo de la contracción y relajación del ventrículo se determinó a través de la derivada de los registros, con ayuda de las funciones del programa Lab Chart 7 Reader.



Figura 2. Ventrículo aislado de la especie *Mytilus californianus* (CONRAD 1837) sobre la cámara de prueba.

Figura 3. Registro de la mecánica de contracción ventricular de la especie *Mytilus californianus*

5.2.1 Temperatura

Para la evaluación del efecto de la temperatura sobre la contracción ventricular, fueron tomados organismos aclimatados previamente a una temperatura de 16 °C dentro del laboratorio, a los cuales individualmente se les extirpó el ventrículo para ser posteriormente colocado dentro de la cámara de prueba. Los ventrículos aislados una vez dentro de esta, fueron mantenidos en agua de mar natural encontrada a la temperatura de análisis (16°, 17 °, 21°, 22 ° y 23 °C) llevándose a cabo el registro del tiempo de respuesta (tiempo necesario para que la preparación ventricular empiece a latir de forma uniforme dentro del sistema de perfusión), la frecuencia y la amplitud de los latidos del sistema ventricular.

5.2.2 Digitálicos

Se llevó a cabo el registro de la fuerza y frecuencia de contracción del corazón aislado en un medio de perfusión a 21 ± 1 °C, tras haberse observado que a esta temperatura el ventrículo tiene una rápida respuesta contráctil sin presentarse efectos o alteraciones sobre los parámetros a evaluar. Una vez alcanzada una lectura constante bajo estas condiciones, se adicionó digoxina (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 5 y 10 μ M) o ouabaína (1, 1.5, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 80, 50, 100 y 200 μ M) en concentraciones crecientes dentro de la cámara de perfusión.

Debido a que las preparaciones de la digoxina requirieron de un porcentaje de etanol como disolvente, se evaluó la respuesta del sistema ventricular a distintas concentraciones de éste, probando un intervalo de 0.1 a 1% V/V.

5.3 Reactivos

Se utilizaron ampollas de digoxina inyectable (0.25mg/ml), marca GLAXO y PISA así como también digoxina Sigma-Aldrich y ouabaína Sigma.

5.4 Análisis estadístico.

Para cada grupo de datos obtenido en los bioensayos, con la ayuda del programa Sigma Plot 11, se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianza (Shapiro-Wilks y Bartlett), realizándose comparaciones por el método de pruebas pareadas (t-Student) para establecer la respuesta antes y después del tratamiento (Zar, 1999). Dentro del análisis estadístico, se consideró: $P < 0.05$ como cambios significativos.

6. Resultados:

6.1. Temperatura y tiempo de respuesta del ventrículo en perfusión.

A temperaturas bajas de 16 y 17 °C fue difícil obtener respuesta de las preparaciones, aún transcurrida una hora posterior a su colocación. De éstas, sólo a 17 °C se logró tener algunos registros de contracción de los organismos. Los tiempos promedios de respuesta obtenidos se encontraron entre los 45 y 13 minutos. Para todas las temperaturas analizadas los valores mostraron diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis, $P < 0.001$), presentando una relación negativa (fig. 4), en donde se llegó a tener latidos regulares y constantes en tan sólo 13 minutos a 23 °C.

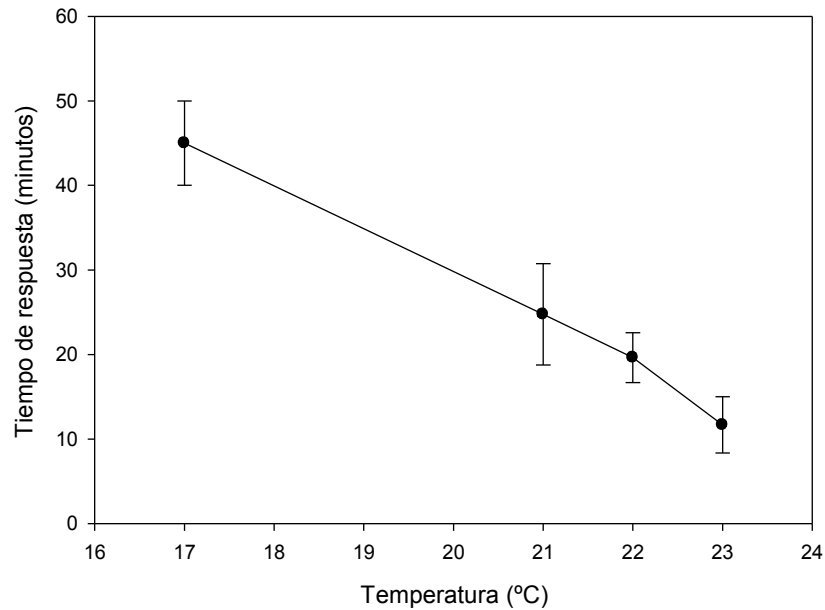


Figura 4. Tiempo de respuesta contráctil de la preparación ventricular de los mejillones de la especie *Mytilus californianus* a diferentes temperaturas.

6.2. Temperatura, fuerza y frecuencia de contracción ventricular.

Las frecuencias promedio de contracción del sistema ventricular aislado del mejillón *Mytilus californianus* obtenidas para las temperaturas de 17, 21, 22 y 23 °C fueron de 23, 23, 24 y 29 latidos por minuto respectivamente, presentándose diferencia significativa entre los valores encontrados a las temperaturas de 17 y 23 °C (Prueba t, $P = 0.047$) (fig. 5).

La fuerza promedio de contracción para esta especie a las temperaturas de 17, 21, 22 y 23 °C fueron de 0.54, 0.76, 0.74 y 0.89 g-f respectivamente, presentándose diferencias significativas entre los valores de las temperaturas de 17 y 23 °C. En conjunto, a pesar de que no se observan diferencias entre los valores a una temperatura de 21, 22 y 23 °C, puede apreciarse una relación positiva entre los parámetros, tendiendo a incrementarse tanto la frecuencia como la fuerza con el aumento de la temperatura (fig. 5 y 6).

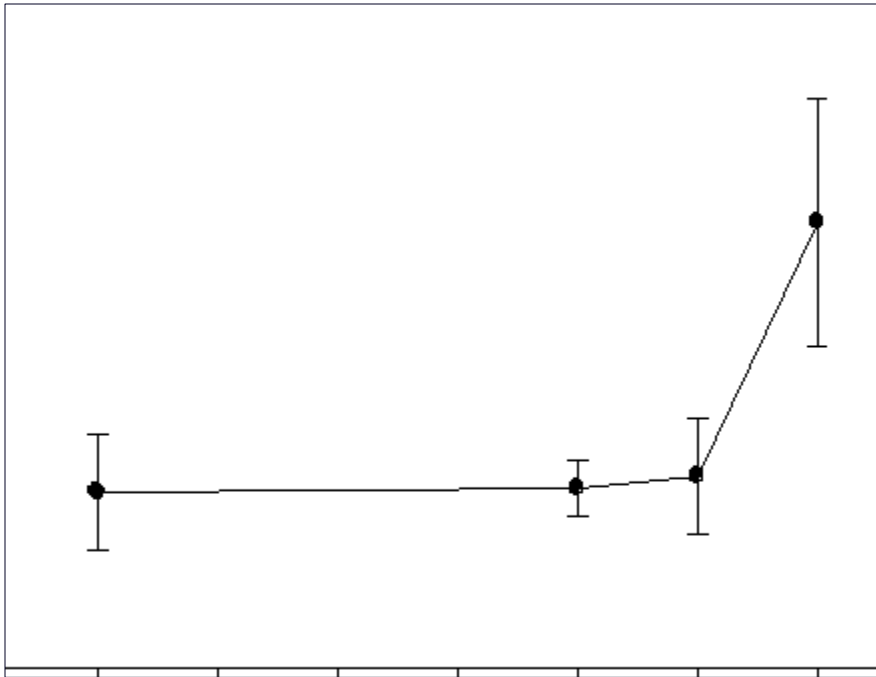


Figura 5. Frecuencias de contracción de la preparación ventricular de los mejillones de la especie *Mytilus californianus* a distintas temperaturas.

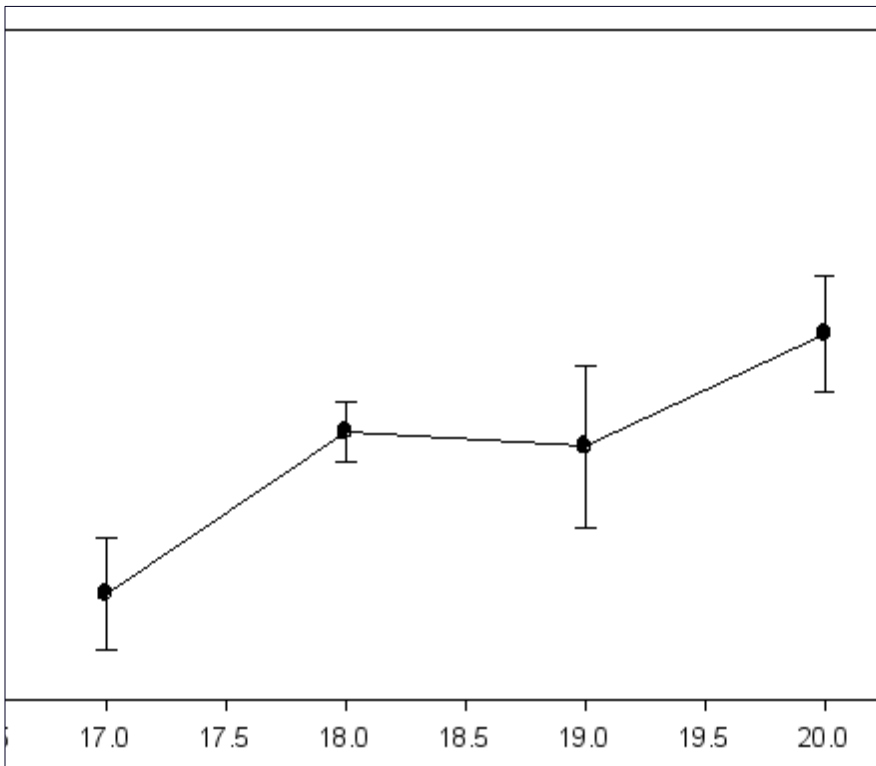


Figura 6. Fuerza de contracción de la preparación ventricular de los mejillones de la especie *Mytilus californianus* a distintas temperaturas.

6.3. Velocidad durante el desarrollo de la contracción ventricular.

La velocidad promedio del desarrollo de la contracción ventricular durante la sístole obtenida para esta especie entre las temperaturas probadas se encontraron entre 1.71 y 3.21 g/s. Se encontró diferencia significativa entre los valores registrados para 17°C y los valores de las temperaturas de 21, 22 y 23 °C (U de Mann-Whitney, $P = 0.017$), presentándose una relación positiva entre la velocidad de contracción ventricular y la temperatura (fig.7).

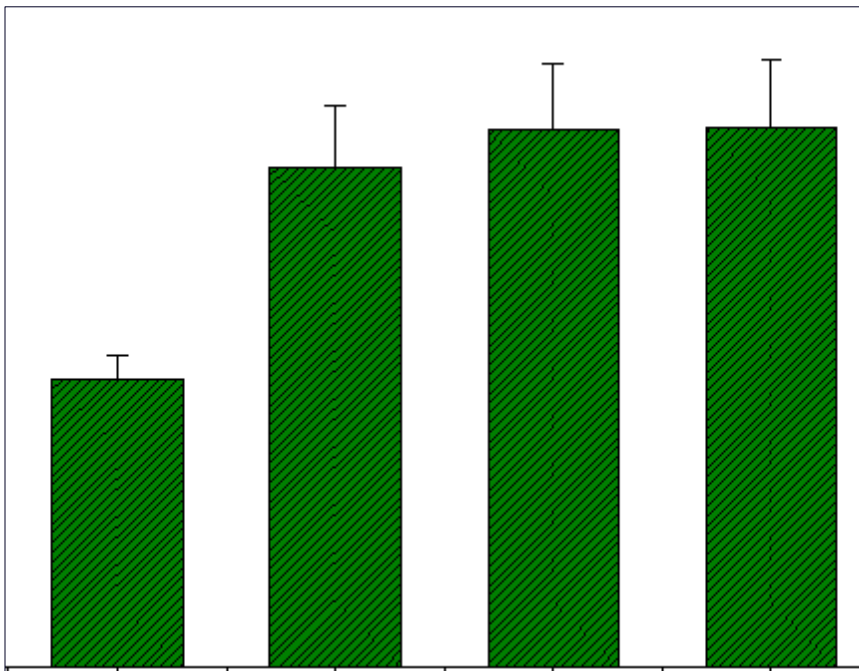


Figura 7. Velocidad durante el desarrollo de la contracción ventricular en el mejillón *Mytilus californianus* a distintas temperaturas.

6.4. Velocidad durante el desarrollo de la relajación ventricular.

Para esta especie se obtuvo una velocidad promedio durante el desarrollo de la diástole o relajación ventricular de entre 1.37 y 2.21 g/s a las temperaturas probadas. A pesar de que no se presentaron diferencias entre los valores de las temperaturas más altas (21, 22, 23 °C) se logra apreciar una relación positiva entre ambos parámetros (Prueba t, $P = 0.010$), incrementándose la velocidad de relajación ventricular al incrementarse la temperatura (fig. 8).

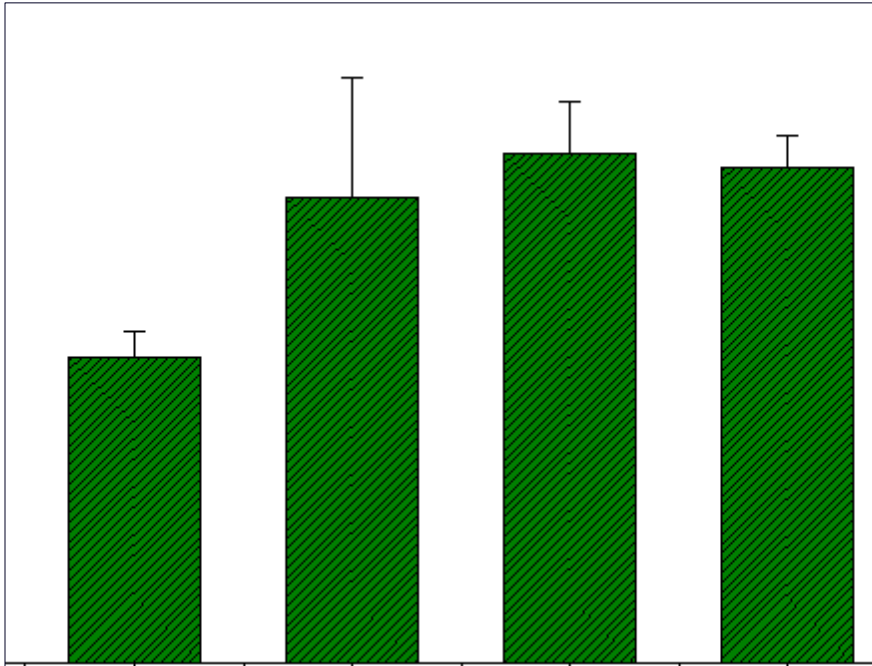


Figura 8. Velocidad durante el desarrollo de la diástole ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a distintas temperaturas.

6.5. Efecto del excipiente (etanol)

La digoxina comercial utilizada para realizar los diferentes ensayos contiene 10 % de etanol. Las respuestas obtenidos a través de los pruebas realizadas con el solvente mostraron una sensibilidad alta de la preparación ventricular al etanol, ya que a una concentración de 0.7%, se observó un efecto tóxico sobre el ventrículo (fig. 9), alterando el patrón de contracción y llegando a disminuir significativamente la fuerza de contracción (Prueba pareada t, $P = 0.040$). Sin embargo de manera

esporádica, en algunos organismos, se observaron efectos negativos a una concentración de 0.3% y de 0.5%, ocasionando una disminución tanto en la fuerza de contracción como en la frecuencia cardiaca, llegando a provocar latidos irregulares o por bloques (fig. 10). Debido a que la toma de organismos es aleatoria y no se conoce la sensibilidad que éstos pueden llegar a presentar al solvente, se decidió trabajar por debajo de una concentración de 0.3%, evitando así alteraciones en los patrones de contracción del ventrículo en organismos con relativamente mayor sensibilidad a este solvente.

Para las concentraciones de 0.1 y 0.3 % de etanol en el medio de perfusión no se presentaron cambios significativos sobre la fuerza y frecuencia de contracción ventricular (Pruebas pareadas t, $P > 0.145$), a pesar de esto, se puede observar una tendencia de disminución tanto en la fuerza de contracción como en la cantidad de latidos por minuto conforme se incrementa el porcentaje de etanol (fig. 11 y fig.12).

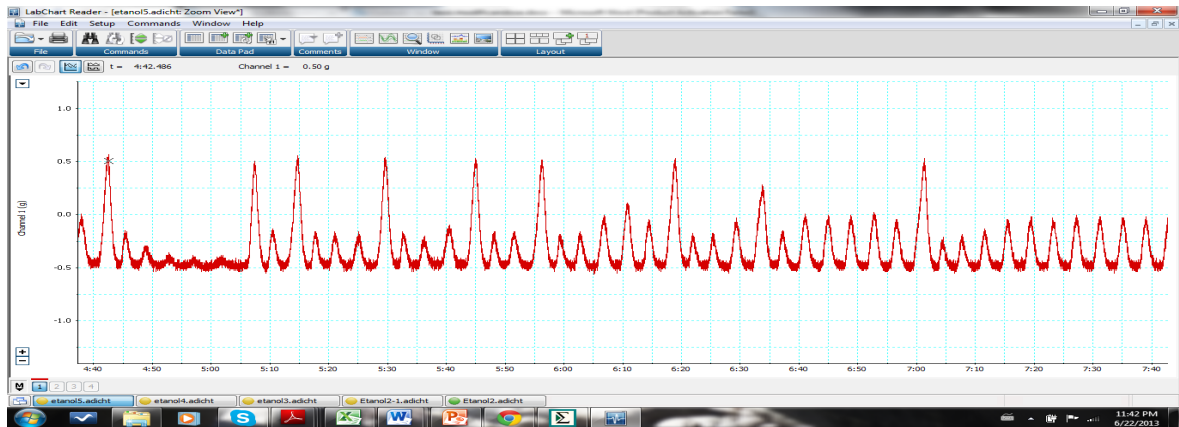


Figura 9. Latidos irregulares ocasionados por una concentración de etanol del 0.7% dentro del sistema.

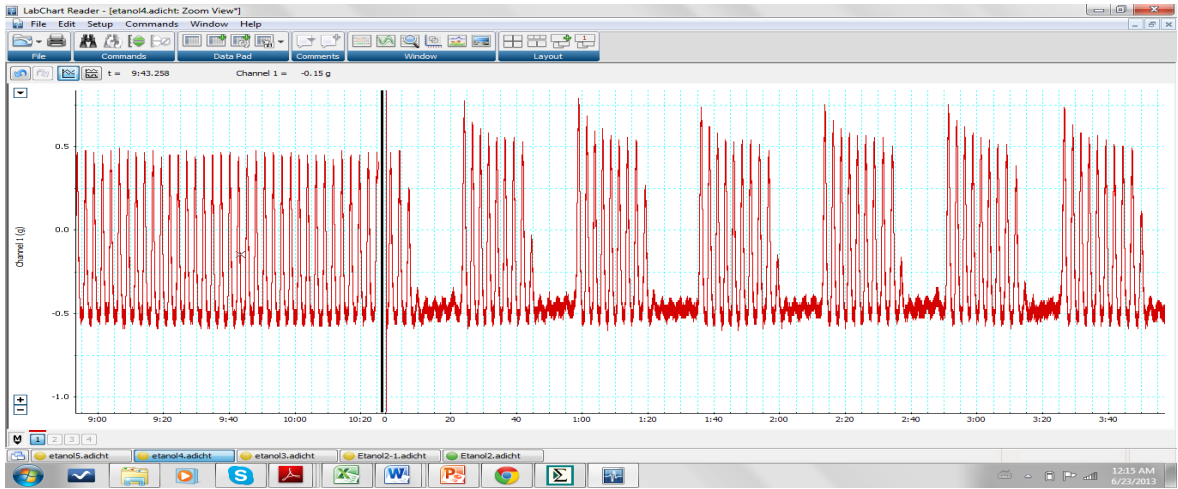


Figura 10. Latidos por bloques ocasionado por un concentración del 0.3% de etanol dentro del sistema.

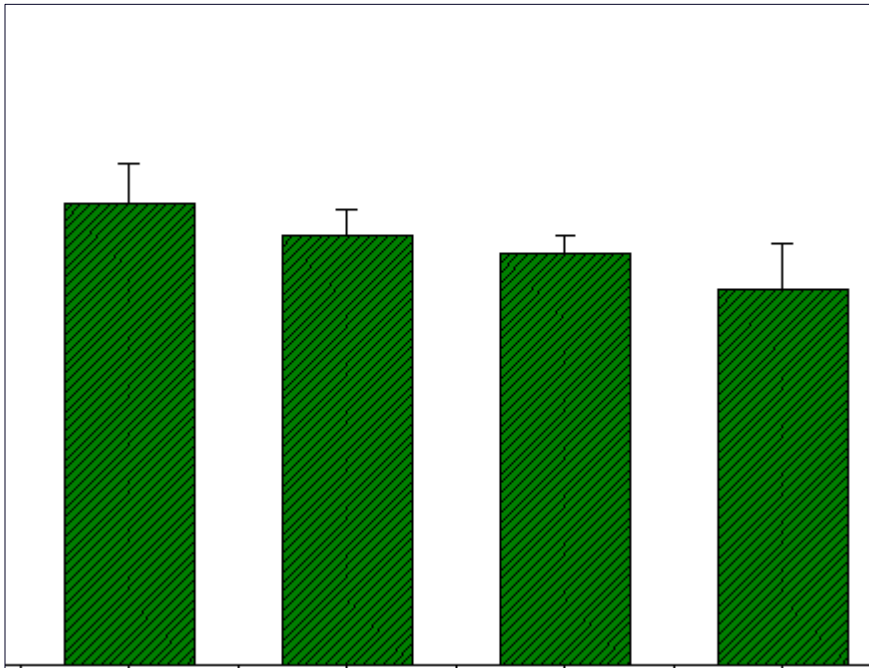


Figura 11. Frecuencias de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a diferentes concentraciones de etanol en el medio de perfusión.

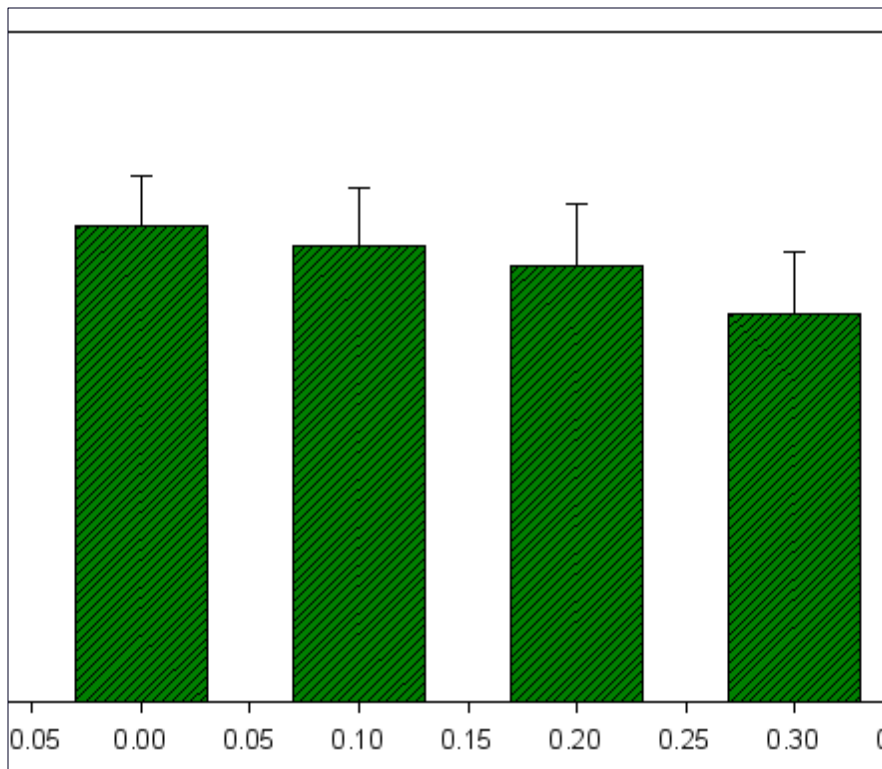


Figura 12. Fuerza de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a distintas concentraciones de etanol en el medio de perfusión.

6.6. Efecto de la digoxina sobre la fuerza y frecuencia de contracción.

Para la digoxina se exploraron efectos sobre la fuerza y frecuencia de contracción desde una concentración de 0.1 μM hasta 10 μM a una temperatura de 21 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, evaluándose los efectos o cambios a través de pruebas pareadas sobre los valores antes y después de la adición del digitálico. La digoxina comercial presenta un 10% de etanol en la solución de acuerdo a su etiqueta. La concentración límite a la que se observan efectos sobre los organismos por parte de este solvente se alcanza a una concentración de 10 μM de digoxina en el medio de perfusión (0.38% de etanol), por lo que no pudieron evaluarse valores del digitálico más elevados.

La fuerza de contracción del ventrículo en perfusión de la especie *Mytilus californianus* no se vio afectada (Pruebas pareadas, $P \geq 0.063$) por las concentraciones de digoxina evaluadas (fig. 13). De estas concentraciones

probadas, sólo se obtuvieron cambios significativos sobre la frecuencia a la concentración de 5 μM (Prueba pareada t, $P = < 0.001$) con una reducción de latidos en un 8%. Para las concentraciones 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 μM del digitálico, la frecuencia no muestra cambios significativos, sin apreciarse una tendencia o relación clara entre ésta y la concentración del compuesto (fig. 14).

Tanto para la fuerza como para la frecuencia de contracción, a pesar de mostrarse una ligera disminución en ambos parámetros después de la adición del digitálico (fig. 13 y fig. 14), este cambio no se ve garantizado debido al traslape de las desviaciones estándar de los valores.

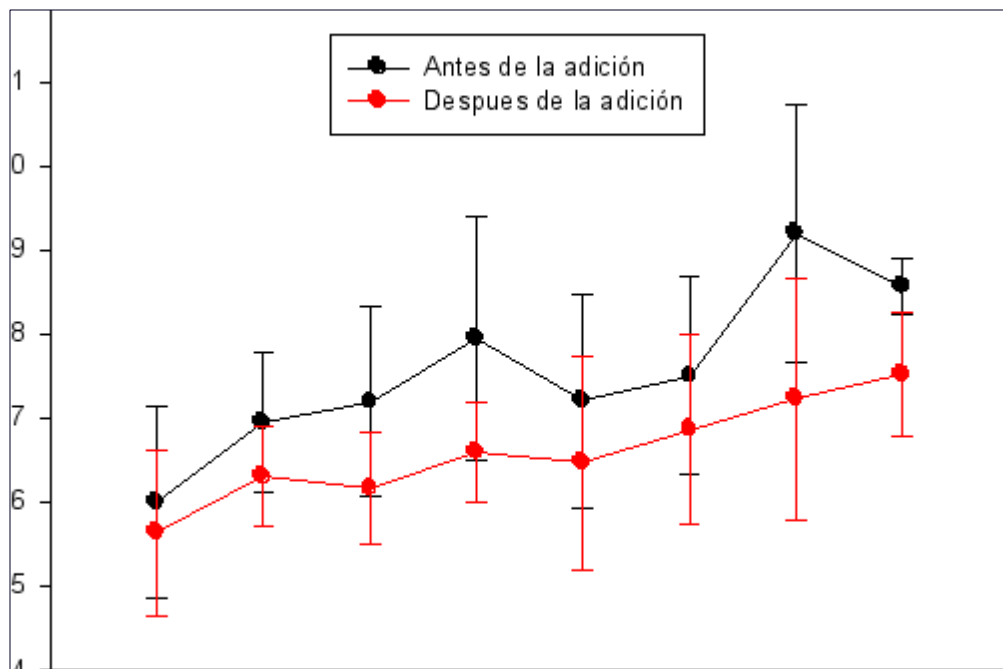


Figura 13. Fuerza de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a diferentes concentraciones de digoxina en el medio de perfusión.

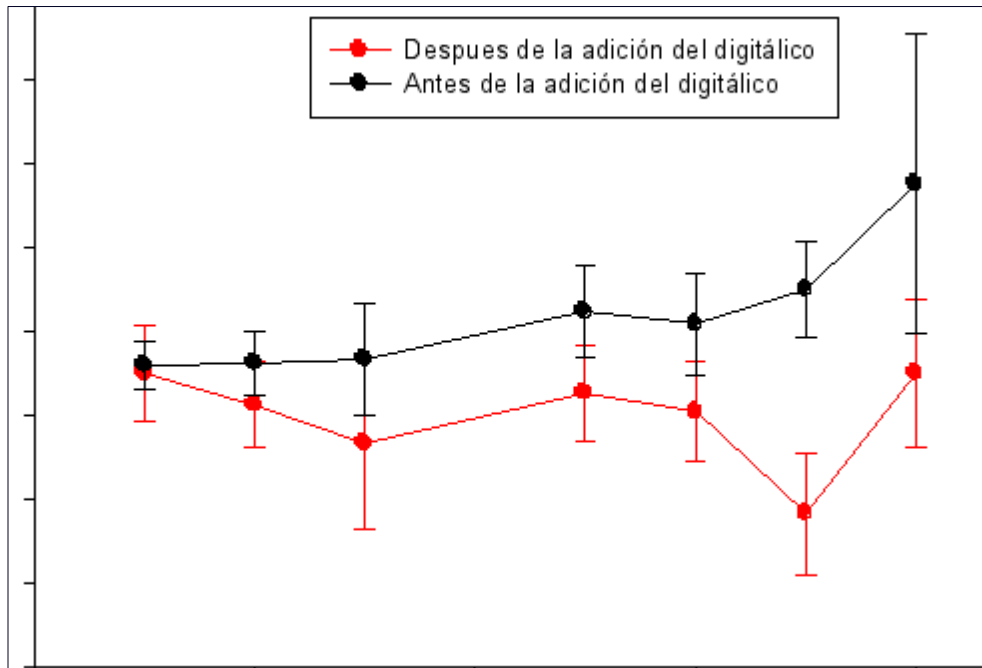


Figura 14. Frecuencia de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a diferentes concentraciones de digoxina en el medio de perfusión.

6.7. Efecto de la ouabaína sobre la fuerza y frecuencia de contracción

Para el digitálico ouabaína fueron evaluados los efectos de las concentraciones de 1, 1.5, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 100 y 200 μM , a una temperatura de 21 ± 1 $^{\circ}\text{C}$; sin embargo, únicamente se muestran los valores resultantes a las concentraciones de 5, 10, 100 y 200 μM , en los cuales se obtuvieron valores suficientes para realizar análisis estadístico.

Con las concentraciones evaluadas no se mostraron diferencias significativa sobre la frecuencia registradas antes y después de la adición del digitálico (Prueba pareada t, $P \geq 0.148$), resultado que se aprecia por el traslape de las desviaciones estándar de los valores (fig. 15).

La fuerza de contracción del ventrículo en perfusión de la especie no se vio afectada a las concentraciones de 5 y 10 μM (Pruebas pareadas, $P = 0.319$), mientras que para las concentraciones de 100 y 200 μM se presentaron diferencias significativas entre los valores registrados antes y después de la adición del digitálico (Pruebas pareadas, $P \leq 0.022$) (fig.16), generándose un incremento en la fuerza de contracción del 11 y del 24% respectivamente (fig.17).

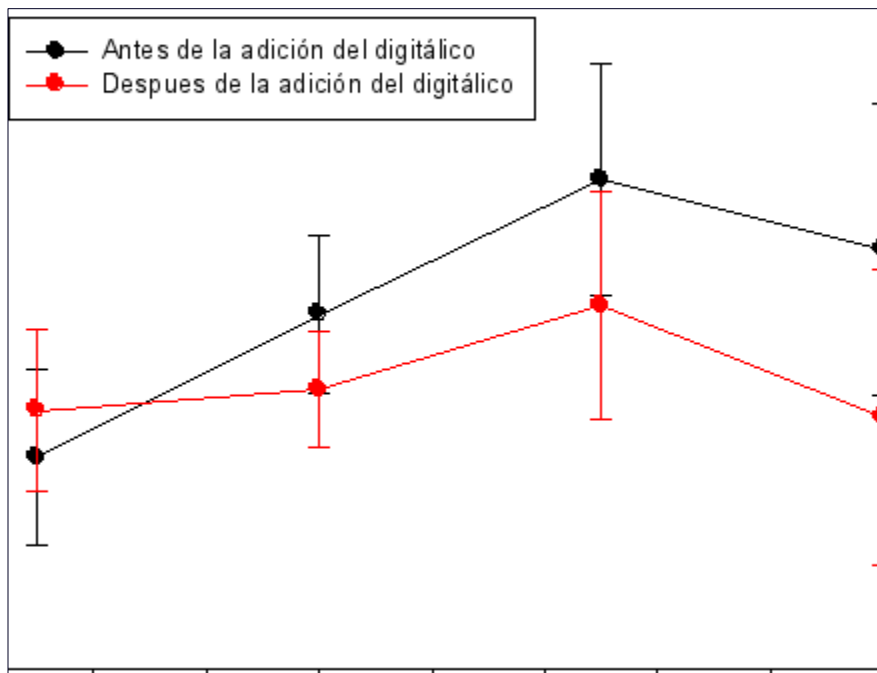


Figura 15. Frecuencia de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a diferentes concentraciones de ouabaína en el medio de perfusión.

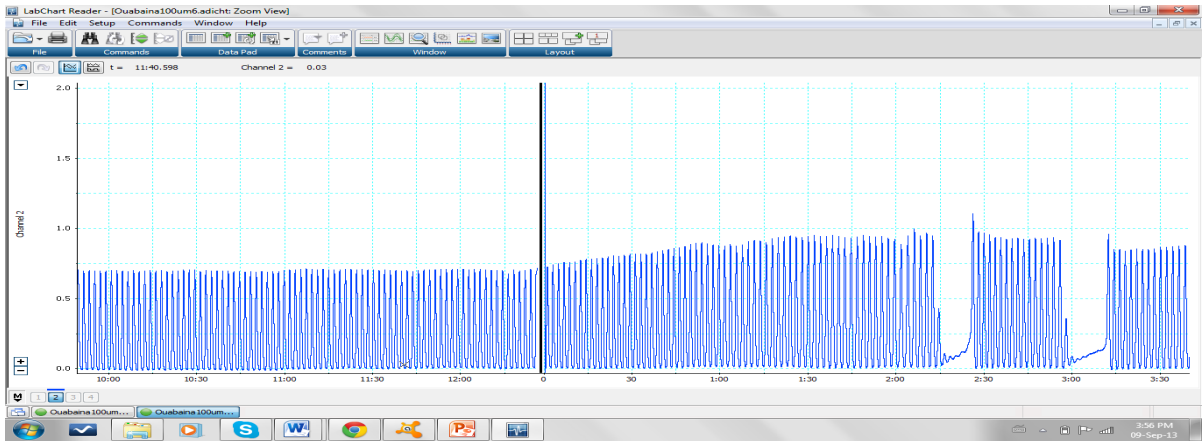


Figura 16. Incremento de la fuerza de contracción sobre el ventrículo de *Mytilus californianus* por una concentración de 200 μM de ouabaina en el medio de perfusión.

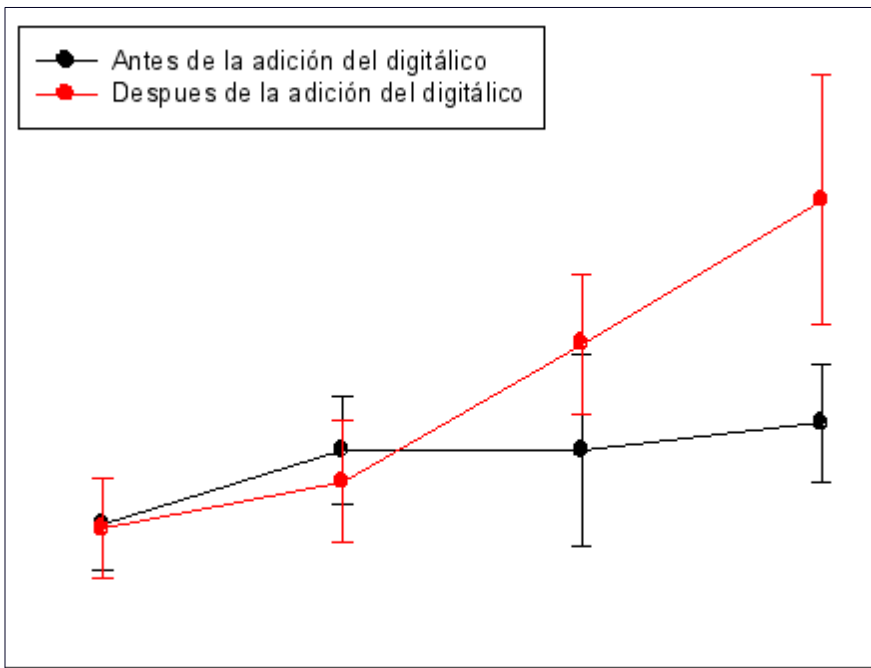


Figura 17. Fuerza de contracción ventricular del mejillón *Mytilus californianus* a distintas concentraciones de ouabaina en el medio de perfusión.

7. Discusión

Los organismos del ambiente marino han sido utilizados como modelos para la investigación biomédica a lo largo de la historia, de las cuales se han desprendido avances de gran importancia para la ciencia. A pesar de esto, los mamíferos, principalmente los roedores, siguen siendo el principal modelo dentro de la investigación biomédica. Se ha llevado a cabo un gran esfuerzo en las últimas décadas para aumentar el uso de los invertebrados como modelos, entre los que se incluyen organismos marinos, llegándose a considerar la posibilidad de sustituir los vertebrados que se usan como modelos actualmente. Entre las principales ventajas para el uso de especímenes invertebrados marinos sobre los mamíferos es el gran número de individuos y de tejido que puede estar disponible, la simplicidad y accesibilidad de algunos órganos y sistemas fisiológicos, así como su fácil manipulación.

Bajo este contexto, Guerra-Rivas (1994) plantea como alternativa para la búsqueda e identificación de nuevos compuestos con la capacidad de incrementar la fuerza de contracción cardiaca (actividad inotrópica), el uso del corazón del molusco bivalvo *Tivela stultorum*. En este trabajo se establece que este órgano en perfusión muestra sensibilidad a compuestos con la capacidad de interactuar con la bomba de sodio y potasio, al presentarse un incremento en la fuerza de contracción cuando se expone a una concentración de 10 μM de digoxina, reconocida por su habilidad de inhibir selectivamente a la enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ (Jiménez y Merchant, 2003). Posteriormente, Alarcón-Arteaga (2005) y Lumbreras-Martínez (2012) retoman el uso de los bivalvos para estos mismos fines, llevando a cabo la evaluación de la respuesta contráctil del corazón de otro molusco, el mejillón *Mytilus californianus*, al exponerlo a concentraciones crecientes de digoxina, utilizando además esta técnica para realizar un cribado e identificar compuestos con la capacidad de causar una respuesta similar sobre este nuevo sistema.

Estas investigaciones sientan las bases para el uso del corazón de estos organismos como modelo para la búsqueda de compuestos con actividad cardioactiva. Sin embargo, aún se requiere de una mayor exploración y descripción de la mecánica de contracción del ventrículo de estos organismos, así como la evaluación del efecto de factores físicos como la temperatura sobre este modelo, ya que es uno de los parámetros fundamentales a considerar durante el uso y

desarrollo de la técnica. Por esta razón, en este análisis se evalúa nuevamente el potencial del corazón de la especie de mejillón *Mytilus californianus*, realizándose la evaluación del efecto de dos clases de glucósidos cardiotónicos y de la temperatura sobre la mecánica contráctil, para tener una mayor comprensión del funcionamiento de este órgano al ser utilizado como modelo en la identificación de compuestos de tipo digitálico.

7.1. Temperatura

La respuesta contráctil del corazón de la especie *Mytilus californianus* dentro del medio de perfusión mostró una correlación positiva con los cambios de temperatura del agua. Se presentó un incremento en promedio del 26% en la frecuencia de contracción al aumentar la temperatura del medio en 6 °C. Esta relación entre los latidos y la temperatura ya ha sido reportada para esta especie por Pickens (1965), así como también para organismos pertenecientes a este género. Por ejemplo, en ensayos *in vivo* realizados sobre la especie de mejillón *Perna viridis* de la familia Mytilidae, se ha reportado incremento en la frecuencia cardíaca, en la que se observó un aumento por arriba del doble en las contracciones cuando se indujo un incremento de 10 °C en la temperatura de su entorno (Nicholson, 2002).

Pickens (1965) observó que tanto organismos vivos de *Mytilus californianus*, como los corazones aislados de esta especie presentan un incremento de la frecuencia contráctil conforme aumenta la temperatura del medio, resultados que indican aclimatación a nivel tisular. Para esta especie, este autor encontró que los límites superiores de actividad cardíaca en los organismos vivos se localizan entre los valores 25 y 27 °C. Temperaturas por arriba de estos valores producen taquicardia o contracciones erráticas, comportamiento que se piensa es ocasionado por una estimulación nerviosa de los termorreceptores y por el efecto directo de la temperatura sobre los cardiomiocitos. Sin embargo, para los corazones aislados estos límites no fueron observados, manteniéndose activos tanto a temperaturas bajas (3 °C) como a temperaturas altas (30 °C). Dicha respuesta contráctil por parte de los ventrículos en perfusión a tan bajos valores no lograron ser observados en los ensayos realizados en este trabajo, debido posiblemente al tiempo que le tomaba al corazón comenzar y mantener latidos

regulares. Para esta preparación se obtuvo una relación negativa entre la temperatura y el tiempo de respuesta contráctil, en donde a una temperatura de 23 °C el corazón comenzaba a latir en promedio alrededor de los 13 minutos, mientras que para una temperatura de 17 °C la respuesta promedio de contracción se lograba alrededor de 45 minutos. El tiempo de espera para observar una respuesta contráctil por parte del ventrículo fue de máximo una hora, por lo que los resultados sugieren que a temperaturas menores le tomaba a la preparación una mayor cantidad de tiempo para comenzar a latir, sin poder lograrse su registro.

Las velocidades de acortamiento de las fibras musculares son altamente dependientes del ritmo cardiaco (Quinones *et al.*, 1975; Steven, 1984) por lo que cambios en la frecuencia generados por aumento en la temperatura del medio de perfusión, se vieron reflejados en cambios sobre las velocidades de desarrollo tanto de contracción como de relajación ventricular. La velocidad durante el desarrollo de la contracción se vio incrementada alrededor de 1.5 (g/s) para un aumento de 6 °C, alcanzando una velocidad de 3.21 g/s a una temperatura de 23 °C, mientras que para este mismo aumento de temperatura, la velocidad durante la relajación ventricular aumentó en promedio 0.84 (g/s) alcanzando una velocidad de 2.21 g/s a 23 °C. No existen reportes realizados sobre el desarrollo de las velocidades de contracción y relajación en el corazón de esta especie. Sin embargo, Guerra-Rivas describió el comportamiento de la actividad cardiaca para la almeja *Tivela stultorum*, para la que reporta valores promedio de velocidad durante el desarrollo de la contracción de 3.375 g/s y una velocidad promedio durante el desarrollo de la relajación ventricular de 0.538 g/s. La diferencia encontrada en la velocidad durante la relajación ventricular entre estos organismos se debe principalmente al contraste entre los tamaños de los corazones. El tamaño del corazón de la almeja *T. stultorum* tiene una longitud promedio de 1.40 cm, mientras que organismos de la especie *M. californianus* con una amplitud de concha de alrededor de 8 cm presenta un corazón de una longitud promedio aproximada de 8.5 mm. Por lo anterior, un bajo valor de velocidad durante la relajación ventricular de la especie *T. stultorum*, es reflejo de una baja frecuencia, indicativo a su vez de una gran contracción, debido a un mayor volumen del corazón (Trueman *et al.*, 1973). Estas diferencias son explicadas por la relación metabolismo-peso corporal que rige la fisiología animal. De acuerdo con Hill *et al.* (2006) y Fanjul *et al.* (1998), en todos los organismos el tamaño del corazón se mantiene proporcional al tamaño corporal,

debido a que la función cardíaca se encuentra estrechamente relacionada al consumo de oxígeno. Los organismos pequeños requieren de una mayor cantidad de O_2 por gramo de peso corporal que los de mayor tamaño, por lo que su corazón debe latir con mayor rapidez para proveer del oxígeno requerido, mientras que en los organismos de gran tamaño, la disminución relativa en la necesidad de O_2 se acompaña de una reducción en la frecuencia y por lo tanto en la velocidad, debido a un aumento en el gasto cardíaco.

Los cambios ocasionados en la frecuencia cardíaca por aumento de la temperatura también modifican de manera importante la fuerza de contracción del ventrículo, la cual se incrementó en promedio 0.35 g de fuerza en un aumento de 6 °C. Esta relación entre la frecuencia y la fuerza de contracción es descrita por el fenómeno denominado de Bowditch, el cual menciona que la fuerza de contracción del músculo cardíaco se modifica con tan solo cambiar, mediante estímulos externos, el intervalo entre una contracción y la siguiente, pudiendo aumentar la fuerza hasta diez veces al aumentar la frecuencia. Este cambio en la fuerza se debe a un aumento en la disponibilidad de los iones de calcio en la célula. El influjo de este ion se ve incrementado por el aumento en el número de potenciales de acción alcanzado por unidad de tiempo, generados por el incremento en la frecuencia de contracción. Este aumento en los potenciales de acción, amplían el tiempo durante el cual se puede transportar calcio al interior de la célula. La disponibilidad de calcio, además, se ve favorecida por una reducción en la salida de este ion, debido a que disminuye el intervalo entre contracciones sucesivas. Por otro lado, el incremento en la concentración de sodio intracelular a través del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} contribuye a la reducción en la salida del ion calcio (Muñoz - Martínez y García, 1994).

Además de la temperatura, se ha reportado que otros factores influyen también sobre la frecuencia cardíaca. Por ejemplo, la frecuencia de contracción se ve reducida en organismos más grandes (Nicholson, 2002; Pickens, 1965). En otros casos, se ha observado que valores bajos de oxígeno en el medio generan bradicardia a los moluscos bivalvos, al igual que la falta de alimento y la exposición de estos organismos a condiciones hiposalinas (Widdows, 1973; Bakhmet *et al.*, 2005). Es por eso que las condiciones, tanto de mantenimiento en el laboratorio de los organismos, como aquellas bajo las cuales se encuentra el ventrículo en perfusión, requieren de ser estrictamente controlados y constantes. De no ser así,

las variaciones en la temperatura o el suministro de oxígeno pueden llegar a ocasionar cambios en la contractibilidad, los cuales podrían enmascarar la respuesta. Por otro lado, se necesita también tener establecidos los valores óptimos de los diferentes parámetros físicos que se encuentran afectando el modelo, como la temperatura y salinidad, con el fin de maximizar la eficiencia de la respuesta para la cual fue diseñado el modelo ventricular del mejillón *M. californianus*. Por ejemplo, trabajar a temperaturas relativamente altas puede llevar a que la contracción se encuentre en su máximo acortamiento de las fibras musculares, dejando un intervalo bajo de inotropía para ser desarrollado por los glucósidos cardiotónicos antes de llegar a los límites de toxicidad (Wasserstrom y Aistrup, 2005).

7.2. Digitálicos

El efecto de dos de los digitálicos de mayor uso, digoxina y ouabaína, fue evaluado sobre la contracción mecánica del ventrículo en perfusión de la especie *M. californianus*. Los ensayos se realizaron a 20 ± 1 °C, temperatura que no ocasionó cambios significativo sobre la amplitud y el ritmo de contracción ventricular. Uno de los posibles problemas en el uso de modelos puede ser la sensibilidad que éste muestre hacia los solventes o excipientes de los medicamentos o sustancias a probar. En la experimentación que se realizó en el presente trabajo, se observó que el organismo mostró sensibilidad hacia el etanol, disolvente usado para la disolución de la digoxina. A una concentración del 0.3% (V/V) en el medio de perfusión, se observó interferencia sobre el proceso de contracción, llegando a ocasionar taquicardia. Ante este hecho, no fue posible evaluar concentraciones de digoxina mayores a 10 μ M. De las concentraciones probadas para este digitálico, en el intervalo de 0.1 μ M a 10 μ M, no se encontró cambio significativo sobre la frecuencia o fuerza de contracción con respecto al control. El intervalo analizado para la ouabaína incluyó concentraciones desde 0.1 μ M hasta 10 μ M, así como concentraciones altas, desde 10 μ M a 200 μ M. Al igual que la digoxina, la ouabaína no ocasionó ningún cambio significativo sobre la frecuencia o fuerza de contracción a bajas concentraciones. El aumento de la fuerza de contracción o efecto inotrópico comenzó a presentarse a una

concentración de 100 μM , alcanzándose un incremento del 11 % y llegando a un aumento del 24% a 200 μM . Este hallazgo contrasta con la investigación previamente realizada sobre *M. californianus*, ya que en otros trabajos, esta especie ha mostrado diferente sensibilidad hacia esta clase de compuestos. Lumbrera-Martínez (2012) reporta que este efecto inotrópico se presentó a una concentración de 2.5 μM de digoxina en el medio de perfusión, generando un incremento del 24% en la fuerza de contracción, además de una disminución del 66% de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico negativo). Por otra parte, Alarcón-Arteaga (2005) anteriormente había señalado que la inotropía positiva generada por la digoxina comenzaba a una concentración de 8 μM , causando un incremento en la fuerza del 30 %, así como una disminución en la frecuencia cardíaca del 31 %. Ambas concentraciones reportadas en las que se genera inotropía positiva se encuentran muy por debajo de las que se encontraron en el presente análisis. Dicha disparidad sobre las concentraciones en el modelo pudieran deberse a diferencias en el manejo operativo de la preparación, ya que algunos factores como la colocación del ventrículo en la cámara de prueba y la tensión inicial pueden verse afectadas por la habilidad del operador. El mal ajuste de la tensión del ventrículo en el fisiógrafo puede llegar a generar el traslape de filamentos así como también la ausencia de su efecto, ya sea por poca tensión o exceso de ésta, respectivamente. En ambos casos, esto deja un estrecho margen para desarrollar el efecto inotrópico positivo por parte de los digitálicos (Guyton, 1975).

Al igual que en el caso de *M. californianus*, sobre el corazón de la rata se ha reportado efecto inotrópico positivo en una amplia gama de concentraciones de digitálicos (Fricke *et al.*, 1975; Grupp *et al.*, 1985; Wasserstrom y Aistrup, 2005), a pesar de ser considerado un organismo con baja sensibilidad a esta clase de compuestos. Grupp *et al.* (1985), encontraron que la ouabaína, a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 μM , produce un incremento sobre la fuerza de contracción del ventrículo de la rata de alrededor de 10, 30, 50, y 80% respectivamente. Fricke *et al.* (1975) por otro lado, reportan que a una concentración de 23 y 24 μM es a la que se genera el 50% del efecto máximo inotrópico por los digitálicos digoxina y ouabaína respectivamente. Dicha respuesta inotrópica presentada por el ventrículo de rata a bajas y altas concentraciones de digitálicos, se ha atribuido a la presencia en el corazón de este organismo de dos subunidades alfa de la bomba de Na^+/K^+

con alta y baja sensibilidad hacia esta clase de compuestos ($\alpha 2$ y $\alpha 1$ respectivamente). La inhibición consecutiva de estas bombas, iniciada por la isoforma sensible $\alpha 2$ y seguida por $\alpha 1$, son las causas sugeridas de control del efecto inotrópico positivo a distintas concentraciones (Kang y Weiss, 2002, Wasserstrom y Aistrup, 2005). A pesar de no encontrarse en la literatura estudios sobre la identificación y descripción de las diferentes subunidades presentes en el tejido de moluscos bivalvos, la respuesta de inotropía observada en el presente trabajo por el bivalvo *M. californianus* en altas concentraciones de digitálicos y el reporte de respuesta inotrópica a bajas concentraciones, sugiere la presencia de una mezcla de subunidades de alta y baja sensibilidad a estos compuestos.

Para otros organismos como el cobayo, se ha detectado de igual manera la presencia de dos subunidades con baja y alta sensibilidad, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respectivamente (Berrebi-Bertrand *et al.*, 1991). Sin embargo, a pesar de predominar la isoforma $\alpha 1$ (Swadner, 1994) al igual que en el caso de la rata, el cobayo es una especie de mayor afinidad a los digitálicos, en la que se ha observado un efecto inotrópico positivo desde una concentración de 1.2 μM de ouabaína, de la que se obtiene un incremento de la fuerza de contracción en un 30% aproximadamente, alcanzándose un aumento del 300% a una concentración de 10 μM (Ku, 1974). Aunado a esto, para el humano y la oveja, organismos de alta sensibilidad con respuesta inotrópica a concentraciones nano-molares, se ha reportado la expresión de las diferentes subunidades alfa (Swadner *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2001). El que estas especies con alta sensibilidad hacia los digitálicos, posean una distribución similar de las isoformas alfa a las presentadas por la rata, hace poco probable que la baja sensibilidad presentada por estos organismos, sea debido únicamente a una inhibición selectiva entre las tres subunidades alfa con distintas afinidades hacia los glucósidos (Wasserstrom y Aistrup, 2005). En investigaciones realizadas sobre el fragmento de unión del digitálico en la subunidad $\alpha 1$, se encontró que mutaciones en la secuencia de aminoácidos de esta región, generan un aumento en la resistencia hacia los glucósidos por parte de la bomba de Na^+/K^+ presentes en organismos con alta sensibilidad a esta clase de compuestos. Esto se logró observar a través de substituciones en los aminoácidos residuales de la porción extracelular de dichas subunidades $\alpha 1$ de la oveja, específicamente sobre los dominios H1-H2, generando la secuencia de aminoácidos presente en la rata, lo que redujo la afinidad al nivel característico de

esta última especie (Price y Lingrel, 1988). El hallazgo demostró que pequeñas variaciones sobre los aminoácidos en la isoforma $\alpha 1$ tiene un gran efecto en la unión del glucósido en la enzima, lo cual explica por qué la isoforma $\alpha 1$ en la rata tiene menor sensibilidad a los glucósidos que los encontrados en otros organismos (Price y Lingrel, 1988; Wasserstrom y Aistrup, 2005). Este hecho sugiere que la razón por la cual el corazón del bivalvo *M. californianus* incrementa su fuerza de contracción sólo hasta concentraciones relativamente altas de digitálico en el medio, es la presencia de subunidades alfa con secuencias de aminoácidos de baja afinidad a los glucósidos, de manera similar a lo que ocurre en la rata. Sin embargo, con los resultados obtenidos no es posible asegurar que en este trabajo, la causa de los hallazgos sea la predominancia de este tipo de subunidades.

Por otro lado, además de la existencia de la bomba de Na^+/K^+ en la membrana de mamíferos e invertebrados, se ha detectado la coexistencia de una bomba de sodio secundaria (Na^+ ATPasa) en distintos tejidos. Esta bomba participa en la salida de Na^+ de la célula mediante la transferencia de este ion en contra del gradiente electroquímico. A diferencia de la ATPasa de Na^+/K^+ , esta bomba secundaria de sodio, no requiere de K^+ para ser activada, y ha demostrado ser insensible a la ouabaína para todas las especies de mamíferos e invertebrados analizados. Tanto en mamíferos como en el tejido de peces se ha reportado que esta bomba insensible se encuentra en menor proporción que la ATPasa de Na^+/K^+ . Sin embargo, para moluscos bivalvos, como en el caso de *M. galloprovincialis*, se ha reportado que el tejido de estos organismos es especialmente rico en esta bomba secundaria insensible, encontrándose en mayor proporción que la ATPasa de Na^+/K^+ (Pagliarani, *et al.*, 2006). Esta gran abundancia, en consecuencia, le permite a la ATPasa de Na^+ sustituir las funciones de la Na^+/K^+ ATPasa cuando ésta se encuentra inhibida, pudiendo mantener la homeostasis iónica (Pagliarani *et al.*, 2006; Pinoni y López -Mañanes, 2009). Por lo anterior, la presencia de la bomba secundaria en el tejido de estos organismos, puede llegar a interferir sobre la acción de los digitálicos, compensando a través del eflujo de Na^+ , el incremento en la concentración intracelular de este ion, que debería generarse por la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ por parte de los digitálicos. En consecuencia, esta bomba secundaria se encontraría impidiendo que se desarrollara el principal mecanismo de acción de inotropía, frenando el incremento en la fuerza de contracción que

debería observarse en el tejido al encontrarse bajo la influencia de esta clase de compuestos.

8. Conclusiones:

- Incrementos en la temperatura del medio de 6 °C ocasionaron un aumento de aproximadamente 6 latidos por minutos en la frecuencia y de 0.35 g-f sobre fuerza de contracción, así como un aumento de 0.84 g/s y de 1.5 g/s en la velocidad de relajación y contracción ventricular del organismo, respectivamente.
- El ventrículo en perfusión del bivalvo *Mytilus californianus* a una temperatura de 20 ± 1 , presentó un aumento en la fuerza de contracción a concentraciones relativamente altas del digitálico ouabaína (100 μ M), sin presentarse cambios significativos sobre la frecuencia cardiaca, mostrando para este caso, una sensibilidad baja hacia los glucósidos cardiotónicos probados.

9. Recomendaciones

- Se sugiere llevar a cabo la identificación y cuantificación de abundancia de los diferentes tipos de subunidades presentes en la Na^+/K^+ ATPasa de *M. californianus*, que permita conocer con mayor profundidad las características moleculares de los procesos involucrados en el mecanismo de contracción ventricular de estos organismos.
- La detección y la determinación de la abundancia de la bomba de sodio secundaria en el tejido cardíaco de esta especie, es otro de los factores importantes que requieren ser analizados, para poder conocer el nivel de interferencia que puede llegar a generar en el efecto causado por los compuestos digitálicos sobre el acortamiento de las fibras musculares de esta especie.
- Someter este modelo a la evaluación de la respuesta contráctil de compuestos de acción inotrópica con distintos mecanismos de acción a la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ , como los agonistas β -adrenorreceptores o inhibidores de la fosfodiesterasa III, permitiendo determinar la capacidad de

este modelo de detectar cambios en la fuerza y frecuencia para otra clase de compuestos.

Referencias bibliográficas

- Arias, J., Aller, M. A., Arias, J. I. y Aldamendi, I. (2000). Enfermería médico-quirúrgica I. Tébar, Madrid. 452 pp
- 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.
- Bakhmet, I.N., Berger, V. J. & Khalman, V. V. (2005). The effect of salinity on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 318: 121-126.
- Baños-Diez, L. E. y Albaladejo, M. F. (2002). Principios de farmacología clínica: bases científicas de la utilización de medicamentos. Masson. Barcelona. 204 pp.
- Berrebi-Bertrand, I., Maixent, J.M., Guede, F.G., Charlemagne, D. & Lelievre, L. G. (1991). Two functional N^+/K^+ -ATPase isoforms in the left ventricle of guinea pig heart. *Eur. J. Biochem.* 196: 129-133.
- Bhakuni, D.S. & Rawat. D.S. (2005). Bioactive marine natural products. Anamaya. New Delhi. 382 pp.
- Cáceres-Martínez, J., Del Rio-Portilla, M.A., Ramírez-Gutiérrez, S.C. & Gómez-Humarán, I.M. (2003). Phenotypes of the Californian mussel, *Mytilus californianus*, Conrad (1837). *Journal of shellfish*. 22(1): 135-140.
- De Teresa – Galván, E. y Anguita – Sanchez, M. (2006). Insuficiencia cardiaca. datos para el debate. Segunda edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. 349 pp
- Dias, P. J., Piertney, S. B., Snow, M. & Davies, I.M. (2011). Survey and management of mussel *Mytilus* species in Scotland. *Hydrobiologia*. 670:127–140

- Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. 2:303-336.
- Durazo, R., Ramírez A.M., Miranda L.E. y Soto-Mardones L.A. (2010). Climatología de variables hidrográficas. En: Gaxiola-Castro, G. y Durazo, R. (eds.). *Dinámica del Ecosistema Pelágico frente a Baja California, 1977–2007: diez años de Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California* (pp. 25-57). S y G editores. México, D.F.
- Elliott, E. J. (1980). Three types of acetylcholine response in bivalve heart muscle cells. *J.Physiol*. 300: 283-302.
- Fanjul, M. L., Hiriart, M. y Fernández de Miguel, F. (1998). *Biología funcional de los animales*. Siglo XXI. Madrid. 585 pp.
- Fricke, U., Hollborn, U. & Klaus, W. (1975). Inotropic action, myocardial uptake and subcellular distribution of ouabain, digoxin and digitoxin in isolated rate hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol*. 288:195-214
- Garateix, A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos: ciencia y cultura*. 12(58): 39-47.
- Gomes-Valdes, J. & Jeronimo, G. (2009). Upper mixed layer temperature and salinity variability in the tropical boundary of the California Current, 1997–2007. *Journal of Geophysical Research*. 114:1-14.
- Gordaliza, M. (2012). Synthetic Strategies to Terpene Quinones/Hydroquinones. *Mar. Drugs*. 10: 358-402.
- Gosling, E.M. (1992). Systemics and geographic distribution of mytilus. In: E.M. Gosling (editor). *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetic and culture*. (pp. 1-20). Elsevier, Amsterdam.
- Gross, D. R. (1994). *Animal models in cardiovascular research*. 2nd. Kluwer Academic. Boston. 505 pp.
- Grupp, I., Im, W. B., Lee, C.O., Lee, S.W., Pecker, M. S. & Schwartz, A.(1985). Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *Journal of Physiology*. 360: 149-160.
- 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.
- Guo, L., Dong, Z. & H. Guthrie. (2009). Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 60: 130-151.
- Guyton, C. A., (1975). *Fisiología humana*. Cuarta edición. Nueva Editorial Interamericana. Madrid. 446 pp.
- Herzig, S. & Mohr, K. (1984). Action of ouabain on rat heart: comparison with its effect on guinea-pig heart. *Br. J. Pharmac*. 82:135-142.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. y Anderson, M. (2006). *Fisiología animal*. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 770 pp.

- Jiménez, L. F. y Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. Prentice Hall. México D.F. 912 pp.
- Kang, W. & Weiss, M. (2002). Digoxin uptake, receptor heterogeneity, and inotropic response in the isolated rat heart: a comprehensive kinetic model. *J. Pharm. Exp. Ther.* 302(2): 577-583.
- Korolkovas, A. y Burckhalter, J. H. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Reverté. Barcelona. 857 pp.
- Kodirov, S. A. (2011). The neural control of cardiac functions in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte A.* 60:102-116
- Ku, D., Akera, T., Pew, C.L. & Brody, T.M. (1974). Cardiac glycosides: correlations among Na⁺, K⁺-ATPase, sodium pump and contractility in the guinea pig heart. *Naunyn-schmiedeberg's arch. Pharmacol.* 285:185-200.
- Kuwasawa, K & Hill, R. (1997). Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J Exp Biol* 200:2123–2135.
- Large, B.J. y Hughes, I.E. (1988). *Learning pharmacology through MCQ a comprehensive text*. Second edition. Wiley. New York. 251 pp.
- Lucchesi, P.A. & Sweadner, K. J. (1991). Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. *The Journal of Biological Chemistry.* 226 (14): 9327-9331.
- Lumbreras-Martínez, H. (2012). *Caracterización de compuestos cardiotónicos del Ofiuroideo *Ophioderma panamenses* Lutken, 1859 y validación del corazón de *Mytilus californianus* como método de cribado*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B. C.
- Malgor, L.A., y Valsecia, M.E. (2000). *Farmacología médica*. Segunda edición. 5 volúmenes. Recuperado 3 de septiembre: <http://med.unne.edu.ar/farmacology.html>
- México, Secretaría de Salud. (2011). *Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares*. Recuperado 1 de septiembre: <http://www.ampacac.org.mx/rinconClinico/EpidemiologiaEnfcardiov2011.pdf>
- Michaelidis, B., Rofalickou, & E. Beis, I. (1993). The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) on glycolysis in the perfused ventricle of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*: evidence for phosphorylation/dephosphorylation control of phosphofructokinase. *J. Exp. Biol.* 180: 15-25.
- Muñoz- Martínez, J. y García, X. (1994). *Fisiología. Células, órganos y sistemas*. Fondo de la Cultura Económica. México D.F. 272 pp.
- Nicholson, S. (2002). Ecophysiological aspects of cardiac activity in the subtropical mussel *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of experimental marine biology and ecology.* 267: 207-222.

- Norling, P. & Kautsky, N. (2008). Patches of the mussel *Mytilus* sp. are islands of high biodiversity in subtidal sediment habitats in the Baltic Sea. *Aquatic biology*. 4: 75-87.
- Oliveri, R. (1999). *Insuficiencia cardiaca*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 707 pp.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
- Pagliarani, A., Bandiera, P., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M. & Borgatti, A. R. (2006). Response to alkyltins of two Na⁺-dependent ATPase activities in *Tapes philippinarum* and *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicology in vitro*. 20: 1145-1153.
- Pandolfo, T. J., Cope, W. G. & Arellano, C. (2009). Heart rate a sublethal indicator of stress in juvenile freshwater mussels. *Comparative biochemistry and physiology, part A*. 154: 347-352.
- Pastelín-Hernández, G., (2002). Farmacología de los agentes inotrópicos. *Arch. Cardiol. Mex.* 72(1):156-162.
- Peret-Riera, J. (1971). Los cardiotónicos: su uso y abuso en la práctica médica diaria. *Jano*. 1 (1):15-16.
- Perlin, D. S. (1988). Ion pumps as targets for therapeutic intervention: Old and new paradigms. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(2): 55-64.
- Pickens, P. E. (1965). Heart Rate of Mussels as a Function of Latitude, Intertidal Height and Acclimation temperature. *Physiological Zoology*. 38 (4): 390-405.
- Pinoni, S.A. & López – Mañanes, A. A. (2009). Na⁺ ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: differential response to environmental salinity. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 372: 91-97.
- Price, E. M. & Lingrel, J. B. (1988). Structure-Function Relationships in the Na, K-α ATPase a Subunit: Site-Directed Mutagenesis of Glutamine- 111 to Arginine and Asparagine- 122 to Aspartic Acid Generates a Ouabain-Resistant Enzyme. *Biochemistry*. 27: 8400-8408.
- Quinones, M.A., Gaasch, W.H., Cole, J.S. & Alexander, J.K. (1975). Echocardiographic determination of left ventricular stress-velocity relations in man. With reference to the effects of loading and contractility. *Circulation*. 51: 689-700.
- Rayner, B. & Weatherall, M. (1957). Digoxin, ouabain and potassium movements in rabbit auricles. *Brit. J. Pharmacol.* 12: 371-381.
- Rodríguez – Pérez, J. M., Gallardo, G. J. y Vargas-Alarcon, G. (2006). Bases moleculares de la insuficiencia cardiaca. *Arch. Cardiol. Mex.* 76:10-17.
- Rosas-Peralta, M. y Attie, F. (2007). Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Arch. Cardiol. Méx.* 77: 91-93.

- Ruch, S. R., Nishio, M. & Wasserstrom, J. A. (2003). Effect of cardiac glycosides on action potential characteristics and contractility in cat ventricular myocytes: role of calcium overload. *J. Pharm. Exp. Ther.* 307(1): 419- 428.
- Schmidt, D. (1999). A review of California Mussel (*Mytilus californianus*) fisheries biology and fisheries programs. Canadian stock assessment secretariat research document 99/187. Recuperado 15 de septiembre: http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas/Csas/DocREC/1999/pdf/99_187e.pdf
- Shumway, S. E. (1991). Functional anatomy of scallops: cardio-vascular system. In: S. E. Shumway (editor), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. (pp. 159-171). Elsevier, Amsterdam.
- Smith, P. J. S. (1987). Cardiac output in the Mollusca: Scope and regulation. *Experientia*. 43 (9): 956-965.
- Smith, J. R., Fong, P. & Ambrose, R. F. (2006). Long-term change in mussel (*Mytilus californianus* Conrad) populations along the wave-exposed coast of southern California. *Marine Biology*. 149: 537-545.
- Steven, D., Colan, M.D., Kenneth, M., Borow, M.D. y Alexander, N. (1984). Left ventricular end-systolic wall stress-velocity of fiber shortening relation: A load-independent index of myocardial contractility. *JACC*. 4(4): 715-724.
- Swadner, K. J., Herrera V. L. M., Amato, S., Moellmann, A., Gibbons, D. K. & Repke, K. R. H. (1994). Immunologic identification of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in myocardium. Isoform change in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Circulation Research*. 74(4): 669-678 pp.
- Tammela, P. (2004). Screening Methods for the Evaluation of Biological Activity in Drug Discovery. Academic Dissertation, University of Helsinki. 74 pp. Recuperado 5 de septiembre: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/801/screenin.pdf?sequence=1>
- Trueman, E.R., Blatchford, J.G., Jones, H.D. y Lowe, G.A. (1973). Recordings of the heart rate and activity of molluscs, *Isognomum alatus*, in tropical conditions. *Comp. biochem. Physiol.* 38A: 555-564.
- Therien A. G. & Blostein, R.. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *AJP-Cell Physiol*. 279: C541-C566.
- Vassalle, M., Greenspan, K. & Hoffman, B. F. (1963). An analysis of arrhythmias induced by ouabain in intact dogs. *Circulation research*. 13:132-148.
- Velázquez - Monroy, O., Barinagarrementería-Aldatz, F. S., Rubio-Guerra, A. F., Verdejo, J., Méndez-Bello, M. Á., Violante, R., Pavía, A., Alvarado-Ruiz, R. & Lara- Esqueda, A. (2007). Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. 2005. *Arch. Cardiol. Méx.* 77(1): 31-39.
- Wang, J., Velotta, J. B., McDonough, A. A. & Farley, R. A. (2001). All human Na⁺-K⁺-ATPase α -subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *AJP-Cell Physiol*. 281: C1336-C1343.

- Wasserstrom, J.A. & Aistrup, G. L. (2005). Digitalis: new actions for an old drug. *AJP-heart circ physiol.* 289: H1781-H1793.
- Widdows, J. (1973). Effect of temperature and food on the heart beat, ventilation rate oxygen uptake of *Mytilus edulis*. *Marine Biology.* 20: 269-276.
- Wilson-Sanders, S.E. (2011). Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR journal.* 52(2): 126-152.
- Wu, D., Yasumura, Y., Nozawa, T., Tanaka, Nobuaki, Futaki, S. Ohgoshi, Y. Yaku, H. & Suga, H. (1989). *Heart Vessels.* 5: 17-24.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis.* Fourth edition. Prentice Hall. 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.