



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

UTILIZACION DE LA ALMEJA PISMO
Tivela stultorum (Mawe,1823) COMO UN
ORGANISMO DE PRUEBA PARA
GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS



TESIS
que para obtener el Título de
OCEANOLOGO
presenta
MARC CUELLAR ROEHRI

RESUMEN:

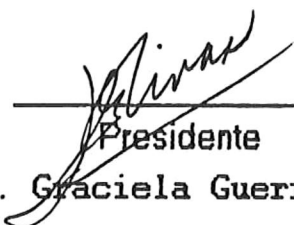
Se determinó la respuesta bioquímica del corazón de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) a los glucósidos cardiotónicos ouabaína, digitoxina y digoxina y al ión K^+ con la medición en el homogenado de la actividad tipo adenosín trifosfatasa dependiente del magnesio, activada por el sodio y potasio. Para ello, se homogenizó el corazón y se preincubó con varias concentraciones de digitálico, en presencia de Na^+ , Mg^{++} y ATP para favorecer el enlace glucosídico y se activó la Na^+, K^+ -ATPasa con la subsecuente adición de distintas concentraciones de K^+ al medio de incubación. La actividad enzimática observada fue dependiente de la concentración de K^+ ; la adición de ouabaína y digitoxina a bajas concentraciones de K^+ incrementaron la actividad de la enzima hasta en un 18%; el posterior incremento de la concentración de K^+ hasta la proporción óptima encontrada en el estudio (10mM), permitió observar para cada concentración de digitálico, una inhibición hasta en un 25%. Un mayor incremento en la concentración de K^+ , redujo la formación del enlace enzima-digitálico por lo cual disminuyó la inhibición de la enzima. Esta respuesta de la Na^+, K^+ -ATPasa fue mayor con la ouabaína la cual es más polar respecto a la digitoxina. Por otra parte, la variación de la concentración del ión Na^+ en el medio de incubación manteniendo la concentración de K^+ constante, modificó el intervalo de concentración a la cual la Na^+, K^+ -ATPasa es sensible a la digoxina al desplazar el equilibrio del enlace. Estos resultados observados para la Na^+, K^+ -ATPasa del corazón de *T. stultorum* siguen un patrón semejante a los observados por numerosos autores para esta enzima en tejidos de diversos organismos. Por lo tanto, se considera a *T. stultorum* un modelo animal en potencia para el estudio del efecto de los digitálicos.

"Utilización de la almeja Pismo *Tivela stultorum* (Mawe,1823) como un organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos"


T E S I S Q U E P R E S E N T A :

MARC CUELLAR ROEHRI.


APROBADA POR:



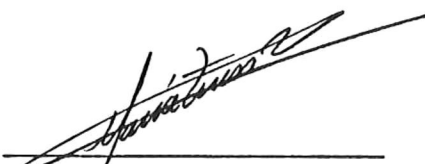
Presidente
Q.F.B. Graciela Guerra Rivas.




Sinodal Propietario
Dr. Jorge de la Rosa
Vélez.



Sinodal Propietario
Oc. Juan A. Fernández
Apango.



Sinodal Suplente
Dra. Maria Teresa Viana
Castrillón.



Sinodal Suplente
Oc. Edgar Arroyo Ortega.

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del Proyecto "Aprovechamiento del Potencial Farmacológico de las especies marinas de las costas de Baja California" perteneciente a la Facultad de Ciencias Marinas, de la U.A.B.C. gracias al apoyo de la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica de la Secretaría de Educación Pública por medio del convenio No. 8434.

DEDICATORIA:

A Ti,
que nos has dado tanto y,
que al ponerse el sol nos
recuerdas lo maravillosa
que es tu obra.

Que bello es soñar
cuando solo no estás,
que tienes a quien amar
cada día... un poco más.

Si mi corazón
en el atardecer
acompañado está,
soñar será un placer.

Y si al despertar,
a mi lado no estás
viviré con la esperanza,
de volver.... a soñar.

AGRADECIMIENTOS:

- A mis padres pa'Toño y Suzzle, y hermanos Dan y Tete, donde quiera que se encuentren. Merci beacoup pour tout, je vous aime.

- A mis *hermanos*, *Zalophus oría*, R2D2, Herrmann, Rosi B., AnE, Ali, por enseñarme tantas cosas, merci.

- A la familia Pérez Chaparro y Ochoa Pérez, por ser mi segunda familia durante tantos años. Gracias por TODO.

- A mis amigos, Will, Conal, Gigo, P.Kori, Pit, Alex, Aida, Monsen, L.Vero, Yoly, Paty G. y _____, por ser preclamente.. amigos.

- Ara, tu nombre lo dice todo, gracias.

- Natl, gracias por formar parte de la Luz en el camino, danke, mine freund.

- Anne C, gracias por esa amistad tan maravillosa.

- A cada uno de mis sinodales y Oc. Lupita, por su apoyo y pedirme un esfuerzo más.

- A vos G.G.R, por vuestra paciencia y dedicación, y... ¡ya no tengo más palabras!

INDICE GENERAL:

	pag.
I. INTRODUCCION.	
1. GENERALIDADES.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. OBJETIVO.....	8
II. METODOS.	
1. COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS.....	9
2. PREPARACION DEL HOMOGENADO.....	9
3. ENSAYO ENZIMATICO.....	9
4. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa.....	12
1. CUANTIFICACION DE Pi.....	12
2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.....	13
3. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	13
III. RESULTADOS.	
1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL HOMOGENADO.....	15
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa.	
2. EFECTO DEL K ⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa.....	17
3. EFECTO DE LA OUABAINA Y EL GRADIENTE DE K ⁺ EN LA ACTIVIDAD DE LA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa.....	18
4. EFECTO DE LA DIGITOXINA Y EL GRADIENTE DE K ⁺ EN LA ACTIVIDAD DE LA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa.....	21
5. EFECTO DEL Na ⁺ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa Y UN GRADIENTE DE DIGOXINA.....	24
5.1 EFECTO DE LA ADICION DE ATP.....	28
IV. DISCUSIONES.	30
V. CONCLUSIONES.	37
VI. LITERATURA CITADA.	38
VII. APENDICE.	46

INDICE DE TABLAS:

	pag.
Tabla 1. Variaciones iónicas del medio en los diferentes experimentos. -----	11
Tabla 2. Respuesta de la Na^+, K^+ -ATPasa a varias concentraciones de homogenado . -----	15
Tabla 3. Variación de la actividad de la Na^+, K^+ ATPasa por efecto del ión potasio (K^+). -----	17
Tabla 4. Valores de actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa en presencia de ouabaína a varias concentraciones de K^+ . -----	20
Tabla 5. Valores de actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa en presencia de digitoxina a varias concentraciones de K^+ . -----	23
Tabla 6. Efecto de la digoxina sobre la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa a dos concentraciones de Na^+ . -----	26
 APENDICE:	
Tabla I: Actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa a distintas concentraciones de homogenado . -----	46

INDICE DE FIGURAS:

	pag.
Figura 1. Diagrama de flujo. -----	10
Figura 2. Actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa del corazón de <i>Tivela stultorum</i> en función de la concentración de Proteínas. Medio de incubación: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6mM, K^+ 50mM, ATP 0.8mM, Na^+ 1.6 mM.	16
Figura 3. Variación de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa del corazón de <i>T.stultorum</i> por la adición de K^+ . Medio de incubación con: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6 mM, ATP 0.8 mM, Na^+ 1.6 mM, K^+ 0-50 mM.	19
Figura 4. Porcentaje de respuesta de la Na^+, K^+ -ATPasa del corazón de <i>T.stultorum</i> a la ouabaina con un gradiente de K^+ . Medio de incubación con: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6 mM, ATP 0.8 mM, Na^+ 1.6 mM, K^+ 0-50 mM, ouabaina 0-1 mM.	22
Figura 5. Porcentaje de actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa del corazón de <i>T.stultorum</i> a la digitoxina con un gradiente de K^+ . Medio de incubación con: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6 mM, ATP 0.8 mM, Na^+ 1.6 mM, K^+ 0-50 mM, digitoxina 0, 0.5 y 2 M.	25
Figura 6. Variación de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa por efecto de la digoxina a dos concentraciones de Na^+ . Medio de incubación con: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6mM, ATP 0.8mM, K^+ 5 mM, Na^+ 1.6 y 100mM, digoxina 0-51 M.	27
Figura 7. Variación de la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa con y sin ATP en un gradiente de digoxina. Medio de incubación con: HEPES 50 mM a pH 8, Mg^{++} 6 mM, K^+ 5 mM, Na^+ 1.6 mM, ATP 0 y 0.8mM, digoxina 0-51 M.	29

I.INTRODUCCION.

I.1.Generalidades.

El siglo XX es el siglo en el que el ser humano se ha expuesto en forma accidental o intencional a un mayor número de sustancias químicas tanto de origen natural como sintéticas (Halstead,1989). Este contacto, aunado al ritmo acelerado de la vida moderna, ha contribuido a la proliferación de afecciones a la salud, como las intoxicaciones, las alergias, el cáncer, enfermedades virales, nerviosas y cardiovasculares, muy comunes hoy en día (Menzer, 1987; Root, 1988; Halstead, 1989).

Para combatir estas enfermedades, se requiere de fármacos cada vez más específicos, los cuales deben ser estudiados y probados antes de ser utilizados por el hombre quien desde la antigüedad ha utilizado a los animales para conocer los efectos y mecanismos de acción de sustancias terapéuticas. Las especies aptas para este tipo de estudios son denominadas "modelos animales" (Menzer, 1987).

Hasta ahora, se han usado una gran variedad de animales como modelo. En la actualidad, los más usados en laboratorios de investigación y desarrollo de fármacos son los mamíferos [ratones, ratas, conejillos de indias, gatos, perros, conejos y, en algunos casos, primates] (Pushkar y Kulkarni, 1977; Nigrelli y Jakowska, 1960; Arrington, 1978), aves [gallinas, palomas, pavos] (Arrington, 1978), anfibios [ranas] (Marikyan et al., 1983), reptiles, (Arrington, 1978; Pushkar, 1977), insectos [grillos], moluscos, equinodermos (Bass,1986), y peces (Arrington 1978). Sin embargo, el principal problema que se presenta en la investigación, es el de realizar una evaluación racional de los riesgos que implica el uso de una sustancia en el hombre a partir de los resultados obtenidos con los modelos animales; esto se debe a que el

ser humano posee mayor variabilidad y complejidad que los animales utilizados en el laboratorio (Dixon, 1976; Stara y Kello, 1979; citados por Menzer, 1987).

Por este motivo, las consideraciones para el uso de uno u otro organismo como modelo animal, dependen de que su naturaleza, sus características fisiológicas, bioquímicas y de manejo proporcionen la mayor cantidad de información confiable, constante y reproducible, así, cada especie posee ventajas y desventajas que deben analizarse con base en el tipo del diseño experimental antes de seleccionarla como modelo animal (Menzer, 1987). Por ejemplo, en algunos casos se utilizan especies no comunes como los armadillos, que han sido utilizados para estudiar la lepra, ya que sus adaptaciones a condiciones del medio ambiente proporcionan información muy importante acerca del mecanismo de acción de algunas sustancias, que ninguna otra especie presenta dadas las características bioquímicas y fisiológicas propias de la especie (Arrington, 1978).

Otro tipo de especies no comunes como modelos animales son los invertebrados, que en 1980 fueron señalados como la futura fuente de modelos animales para experimentos ya que abarcan aproximadamente el 90% de las especies de la Tierra, por lo que representan un importante recurso animal con beneficios al ser humano (Kaiser, 1980).

Con la utilización de los invertebrados como modelos animales se han logrado muchos avances en el conocimiento de la bioquímica y la fisiología. Además, algunos problemas han sido comprendidos e interpretados más fácilmente que en organismos vertebrados y debido a que los invertebrados poseen una menor complejidad y ciclos de vida de menor duración es posible el manejo de grandes grupos de individuos un mayor número de veces (Menzer, 1987). En virtud de estas ventajas, en el proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California" de la Facultad de Cien-

clas Marinas (U.A.B.C.) se investigó la posibilidad de que un invertebrado de nuestra región sea de utilidad en estudios preliminares sobre el efecto cardiotónico de principios activos obtenidos de organismos marinos. Una sustancia se denomina como cardiotónica si, como lo indica su nombre, modifica la fuerza de contracción (tono) del corazón (Goodman y Gilman, 1978; Repke y Schönfeld, 1984). Entre estas sustancias utilizadas en la medicina se encuentran los glucósidos cardiacos o digitálicos (Kelly, 1990) los cuales son extraídos de las plantas *Digitalis purpurea*, *D. lanata* y *Strophantus gratus*.

Dadas las condiciones de este tipo de estudios, el modelo animal debería de cumplir con las siguientes características:

- a) Bajo costo de adquisición y mantenimiento.
- b) Rápida adaptabilidad.
- c) Baja susceptibilidad al estrés.
- d) Que su corazón sea fácilmente perfundido, resistente y de sencilla manipulación.
- e) Que su corazón manifieste una respuesta observable uniforme.
- f) Que la respuesta bioquímica de su corazón sea semejante a la de otros modelos animales en presencia de los glucósidos cardiotónicos.
- g) Que la inhibición enzimática por cardiotónicos disminuya por adición de potasio.

Como parte del objetivo general del proyecto para establecer un modelo animal en el cual se estudien "cardiotónicos potenciales", el propósito de este trabajo es determinar la respuesta bioquímica del homogenado del corazón de la almeja *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) a los glucósidos cardiotónicos bajo distintas condiciones experimentales, es decir, observar el efecto que los digitálicos causan sobre la adenosín trifosfatasa dependiente del magnesio activada por el sodio y potasio.

1.2. Antecedentes.

El océano es el hábitat de aproximadamente el 80% de las especies de la Tierra (Root, 1988). Esta gran diversidad de especies, permite pensar que podemos encontrar en él a un animal cuyas características sean adecuadas para utilizarlo como modelo en el estudio de sustancias cardiotónicas.

Los moluscos, invertebrados predominantemente marinos, son un Phylum excepcionalmente diverso, tanto en morfología como en tipo de hábitat y presenta características físicas, fisiológicas y de comportamiento que pueden ser muy distintas de una especie a otra (Dykens y Mangum, 1979).

Desde principios del siglo, los moluscos han sido objeto de numerosos estudios para conocer sus características fisiológicas, las condiciones óptimas para su desarrollo y el efecto que tienen sobre ellos ciertas sustancias. En particular, se ha observado que los corazones de los bivalvos tienen la capacidad de seguir latiendo por un largo período después de ser extirpados si son mantenidos en un medio de perfusión adecuado, además, son altamente sensibles a los cambios de la composición química del agua y a bajas concentraciones de drogas y venenos (Galtsoff, 1964). Por ello, especies como *Mercenaria spp*, *Anodonta spp*,

Mya spp, *Ostrea spp* y *Crassostrea spp* se emplean desde hace tiempo en bioensayos farmacológicos, utilizando el corazón en un medio de perfusión (Berthe y Petitfrère, 1934; Otis, 1942; Wait, 1943; Galtsoff, 1964; Gray y Deaton, 1987; González y Escalona, 1989).

Una variación de las concentraciones de **potasio** (K^+) y **sodio** (Na^+), así como de **calcio** (Ca^{++}) y **magnesio** (Mg^{++}) en el medio de perfusión producen un cambio característico en la respuesta del corazón. Asimismo, sustancias como la **adrenalina**, la **colinesterasa**, la **cicuta**, la **veratrina**, el **curare** (Galtsoff, 1964) y la **acetilcolina** (Jullien y Vincent 1938; Prosser, 1940; Otis, 1942; Wait, 1943; Pilgrim, 1954; Greenberg y Windsor, 1962; Galtsoff, 1964) modifican la respuesta del corazón de diversas especies.

La sensibilidad de los corazones a las sustancias puede variar según la especie, como el caso de *Dosinia sp*, *Amphiderma sp* y *Mercenaria mercenaria* que son especies sensibles a la acetilcolina, mientras que los ostiones son menos sensibles (Pilgrim, 1954).

Por otra parte, se ha observado que algunas sustancias causan efectos diferentes según la especie, como la acetilcolina, que causa un efecto depresivo sobre el corazón de los ostiones (*Crassostrea virginica* y *C. gigas*), y algunos miembros de la familia Veneridae (*Mercenaria mercenaria*, *Tapes philipinarum*, *Saxidomus giganteus*), *Mya arenaria*, *Entoderma saxicola* y *Prododesmus macroschisma*, y un efecto estimulante en el tejido cardíaco de la familia Mytilidae (*Mytilus californianus* y *M. canaliculus*); pero también ambos efectos se han reportado en especies de las familias Pectinidae, Matridae y Carditidae, entre otras (Pilgrim, 1954).

A partir de la década de los setentas, la utilización de bivalvos u otros moluscos como modelos animales se enfocó principalmente en los grados de respuesta y tolerancia del organismo a contaminantes y a factores físicos y químicos del medio ambiente (Saintsing y

Towle, 1978; Harada et al., 1984; Curran et al., 1986). También existen, pero en menor abundancia, estudios a nivel fisiológico (Dykens y Mangum, 1979; Wheeler y Harrison, 1982). Por ejemplo, el corazón perfundido de *M. mercenaria* se ha empleado para estudiar efectos de nuevas sustancias, como el neuropéptido FMRFamida que la almeja produce para controlar de forma natural la actividad su corazón (Greenberg, 1984), los esteroides de forbol (Gray y Deaton, 1987) y el efecto de la toxina ATX II de anémona (González y Escalona 1989).

Otras sustancias que modifican la respuesta del corazón son los glucósidos cardiotónicos o digitálicos, que son sustancias extraídas de plantas terrestres, se utilizan específicamente en el tratamiento de fallas congestivas del corazón en pacientes con arritmias ventriculares (Kelly, 1990). La hipótesis más aceptada en relación con su modo de acción, es que estas sustancias se enlazan a un receptor específico presente en la membrana celular, la adenosín-trifosfatasa dependiente del Mg^{++} y activada por el sodio y el potasio (Na^+,K^+ -ATPasa), en función del estado iónico del medio (Repke y Schönfeld, 1984; Schönfeld et al., 1986). El digitálico se enlaza en forma preferencial a la enzima fosforilada; este enlace, es favorecido por el sodio y disminuido por el potasio en presencia de magnesio y ATP (Aker, 1981). La formación del enlace ocasiona la inhibición de la enzima, lo que fisiológicamente se traduce en un incremento en la fuerza de contracción del corazón, efecto denominado inotrópico positivo en el campo de la medicina.

Los glucósidos cardiotónicos poseen un bajo índice terapéutico, por lo que es común incurrir en sobredosis. Ya que el K^+ disminuye la afinidad de la enzima por el digitálico, su administración es necesaria para aliviar la inhibición enzimática (Repke y Schönfeld, 1984; Aker et al., 1985; Kelly, 1990).

El descubrimiento de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ por Skou (1957) en homogenados de tejido nervioso de las patas del cangrejo *Carcinus maenas*, y su relación con los iones Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} , originó el empleo de esta enzima para estudiar los efectos de venenos y nuevas drogas (principalmente digitálicos) sobre el corazón de modelos animales superiores (Akera,1971; Akera et al.,1985; Hamlyn et al.,1988). Los estudios realizados en diversas especies (especialmente mamíferos, como ratas y conejillos de Indias) por un gran número de autores, durante los últimos 20 años, bajo diferentes condiciones experimentales, sugieren que el efecto inotrópico positivo se debe a la interacción de los digitálicos con la $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPasa}$, ya que es el único sistema que es afectado reproduciblemente por bajas concentraciones de digitálico (Matsui y Schwartz, 1968; Erdmann y Schoner, 1973; Choi y Akera, 1977; Repke y Schönfeld, 1984; Hamlyn et al., 1988; Hagane et al, 1988).

Sin embargo, estos estudios sobre el corazón se han realizado a nivel bioquímico principalmente en mamíferos, mientras que los estudios realizados sobre el corazón de los bivalvos observan los efectos fisiológicos (Dougan et al., 1987; Gainey y Shumway, 1988; Shumway y Cucci, 1989)

Una especie de la familia Veneridae, endémica en las costas de Baja California es la almeja pismo *Tivela stultorum* reportada por Mawe en 1823 (Abbott,1985); la cual ha sido sometida a estudios de captura, distribución y abundancia (Baqueiro et al., 1982), así como a la medición de respuestas fisiológicas frente a cambios de salinidad y temperatura (Vaillard-Nava, 1981). Esta especie, posee varias características como su bajo costo, fácil manejo y mantenimiento, que favorecen que la almeja pismo *T. stultorum* (Mawe,1823) sea utilizada en laboratorio para realizar una evaluación preliminar los efectos de los glucósidos cardiotónicos.

Por ello, el estudio de la respuesta de la Na^+,K^+ -ATPasa del corazón a iones como el K^+ y digitálicos conocidos, constituye un punto clave para la inclusión de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) como modelo animal para estudios exploratorios de cardiotónicos potenciales.

I.3. OBJETIVO.

Determinar la respuesta bioquímica del corazón de la almeja pismo Tivela stultorum (Mawe,1823) a los glucósidos cardiotónicos, observando el efecto que éstos causan sobre la adenosín trifosfatasa dependiente de magnesio activada por sodio y potasio (Na^+,K^+ -ATPasa, EC 3.6.1.3) en un gradiente de potasio.

II. METODOS.

II.1. COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS.

Las almejas fueron compradas en el "Mercado Negro" de la ciudad de Ensenada y llevadas inmediatamente a la Facultad de Ciencias Marinas donde se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio con aireación y agua de mar en un sistema de flujo continuo manteniendo la temperatura del cuerpo de agua contiguo a las instalaciones de la Facultad (Punta Morro, Bahía de Todos Santos, Ensenada B.C.) de donde era tomada; se alimentaron cada tercer día con *Tetraselmis* sp. donada por el departamento de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

A cada lote se le permitió recuperarse y adaptarse durante los 5 primeros días, a partir de los cuales fueron utilizados en un período no mayor a las 3 semanas después de su compra.

II.2. PREPARACION DEL HOMOGENADO.

El corazón de la almeja fue extirpado, pesado y molido en un homogenizador Elvehjem-Potter, en una solución amortiguadora de HEPES-Sacarosa (0.5-0.25 mM), a pH 7, en hielo (4°C), en una proporción de 75mg/ml. El homogenado se utilizó inmediatamente.

II.3. ENSAYO ENZIMATICO.

Siguiendo el método empleado por Wheeler y Harrison (1982) para cuantificar la actividad de la ATPasa (*Fig. 1*), se realizaron 5 tipos de experimentos, con modificación de las condiciones del medio de incubación en cada uno de ellos.

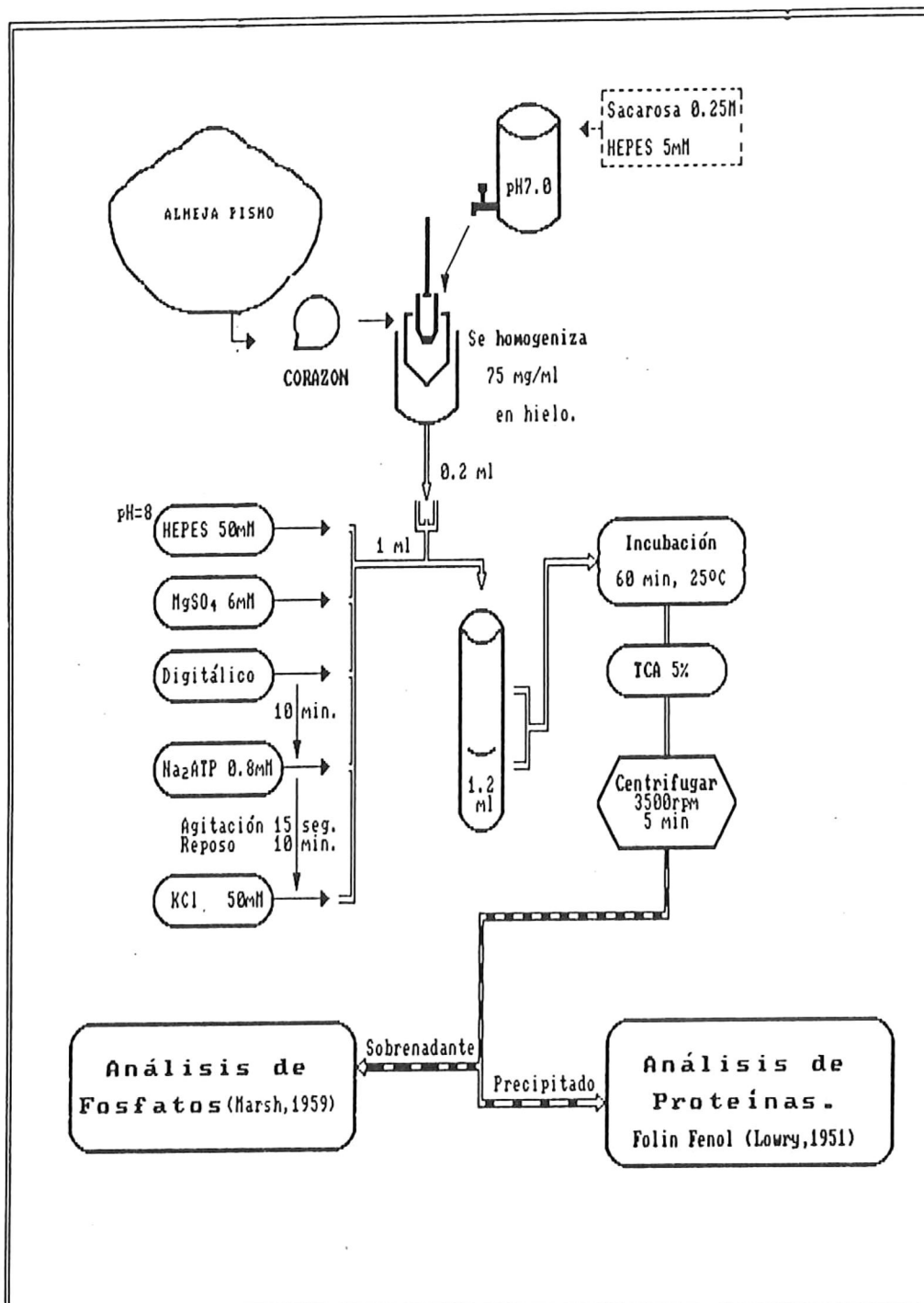


Figura 1. Diagrama de Flujo (Basado en Wheeler y Harrison, 1982)

Metodología para la determinación de la Actividad de la Adenosín trifosfatasa activada por el sodio y potasio (Na^+ , K^+ -ATPasa) del corazón de la Almeja Pismo *Tivela stultorum*, Mave, 1923.

Las modificaciones realizadas fueron en relación a la concentración de:

- a) Proteína (Volumen de homogenado)
- b) Potasio (K^+)
- c) Digitálicos (ouabaína, digitoxina y digoxina)
- d) Sodio (Na^+)

Las concentraciones de: Mg^{++} (6 mM), HEPES (50 mM pH=8) y Na_2 -ATP (0.8 mM) se mantuvieron constantes. El volumen final de incubación fue de 1.2 ml. La *Tabla 1* muestra las concentraciones usadas en cada caso.

Tabla 1. Variaciones iónicas del medio en los diferentes experimentos.				
Experimento:	[Proteína] cruda	[K^+]	[Digitálico]	[Na^+]
a.-Efecto de la cantidad de homogenado en la actividad de la $Na^+K^+ATPasa$.	0.05, 0.26 0.85, 1.3 y 2.1 mg.	50 mM	—	1.6mM
b.-Efecto del ión K^+ sobre la actividad de la $Na^+K^+ATPasa$.	0.85 mg	0,2,5,10, 30 y 50 mM	—	1.6mM
c.-Efecto de la ouabaína y del K^+ en la actividad de la $Na^+K^+ATPasa$.	0.85 mg	0,2,5,10, 30 y 50 mM	0, 0.35, 0.5 y 1 mM	1.6mM
d.-Efecto de la digitoxina y del K^+ en la actividad de la $Na^+K^+ATPasa$.	0.85 mg	0,2,5,10, 30 y 50 mM	0, 0.5, 1 y 2 μ M	1.6mM
e.-Efecto de la digoxina y del Na^+ en la actividad de la $Na^+K^+ATPasa$.	0.85 mg	5 mM	0, 0.3, 0.6, 1.6, 2.5, 128 nM; 1.2, 25.6 y 51.2 μ M	1.6 y 100 mM

Para realizar los experimentos b, c, d, e, se escogió el volumen de homogenado donde la cantidad de enzima en el medio fue lo suficientemente alta para que se observara una inhibición sin que la producción de P_i se limitara por las condiciones iónicas del medio.

Tras agregar el ATP, se homogenizó la solución utilizando un agitador "vortex" (VariWhirl) y se dejó en reposo durante 10 min, de acuerdo con el procedimiento de Akera (1971) y posteriormente se agregó la solución de KCl con agitación, incubándose a 25°C en un baño de temperatura constante (American Science Products), por 60 minutos.

La reacción enzimática fue detenida con la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% .

El sobrenadante se separó del residuo sólido por centrifugación a 3500 rpm por 5 min.

II.4. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa.

La actividad enzimática se definió como la cantidad de moles de fósforo inorgánico (P_i) producidos por la hidrólisis del ATP a ADP, por 1 mg de proteína, en un tiempo de 1 hora (moles P_i /mg h).

II.4.1. CUANTIFICACION DE P_i .

El análisis de fosfatos se realizó en el sobrenadante con el método de Marsh (1959) (tomada de Wheeler y Harrison, 1982). El volumen de n-butanol agregado se incrementó

a 4 ml (para igualar el volumen de la celda del espectrofotómetro), tras el cual se agregaron 0.2 ml de molibdato ácido de amonio (40.45 mM en H₂SO₄ al 22%), se homogenizó y neutralizó con 0.5 ml de solución de citrato de sodio 0.88 M, a pH 7.

La absorbancia del complejo coloreado en el butanol, se leyó a 400 nm en un espectrofotómetro (Bausch & Lomb, Spectronic 21, Milton Roy Co.), determinando la concentración mediante una curva estándar preparada con monofosfato de sodio (0 a 50 moles de fósforo), preparado y tratado de la misma forma que las muestras.

II.4.2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Se utilizó el método de Lowry et al. (1951) para cuantificar las proteínas crudas precipitadas, las cuales fueron resuspendidas en 2 ml de NaOH (1N). Se agregó a esta solución 1 ml del reactivo D (50 ml de carbonato de sodio al 2% y 1 ml de solución de CuSO₄·5H₂O al 0.5% en Na₂-EDTA al 1%), se dejó reposar 10 minutos y se añadió 0.1 ml de reactivo de Folin (Sigma) 1 N. Tras un reposo de 30 minutos, se leyó la absorbancia del complejo a 750 nm. Se preparó una curva de calibración (0 a 250 g/ml) para determinar la concentración, utilizando una solución de albúmina bovina (500 g/ml).

II.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS.

La actividad de la Na⁺,K⁺-ATPasa reportada en todos los experimentos se calculó como la diferencia aritmética entre la actividad de la enzima añadiendo ATP al medio de incubación y la actividad correspondiente sin ATP.

Se utilizó el paquete de análisis estadísticos STATPACK (IBM, 1984) para realizar las pruebas de bondad de ajuste con la distribución Ji-cuadrada (Kreyszig, 1987), para probar la hipótesis H_0 : La distribución de los valores de actividad enzimática no presentan diferencias significativas con la distribución normal y, prueba *t* de Student (Kreyszig, 1987), para determinar si existían diferencias significativas entre los efectos de concentraciones de K^+ y de digitálicos.

III. RESULTADOS.

III.1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL HOMOGENADO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na^+, K^+ -ATPasa.

Los valores obtenidos se encuentran agrupados en la *Tabla 2* en función del promedio de la cantidad de proteína medida para cada volumen de homogenado. En ella, se observa que la cantidad de P_i liberado, reflejo de la actividad de la enzima, aumentó según los distintos volúmenes de homogenado utilizados. A pesar de ello, el incremento en la cantidad de proteínas es mayor, por lo que el valor de la actividad enzimática obtenido, se redujo.

Esta respuesta de la enzima a la variación del volumen de homogenado se observa en la *Figura 2* la cual presenta la actividad de la enzima, así como la cantidad de P_i liberado por la enzima respecto a su valor de proteína medido.

Tabla 2. Respuesta de la Na^+K^+ ATPasa a distintas concentraciones de homogenado.				
Proteína cruda (mg)	Homogenado (ml)	Pi Liberado ($\mu\text{moles Pi/h}$)	Actividad enzimática ($\mu\text{moles Pi/mg h}$)	NUMERO TOTAL de DATOS.
$\bar{x} + \text{d.e.}$		$\bar{x} + \text{d.e.}$	$\bar{x} + \text{d.e.}$	
0.048 \pm 0.003	0.05	0.576 \pm 0.077	11.881 \pm 0.964	2
0.261 \pm 0.066	0.1	0.825 \pm 0.116	3.262 \pm 0.545	26
0.855 \pm 0.215	0.2	0.904 \pm 0.082	1.121 \pm 0.297	27
1.342 \pm 0.244	0.3	0.907 \pm 0.109	0.704 \pm 0.176	27
2.116 \pm 0.012	0.3	0.936 \pm 0.001	0.442 \pm 0.003	3

Medio de Incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, ATP 0.8mM, K⁺ 50mM y Na⁺ 1.6mM

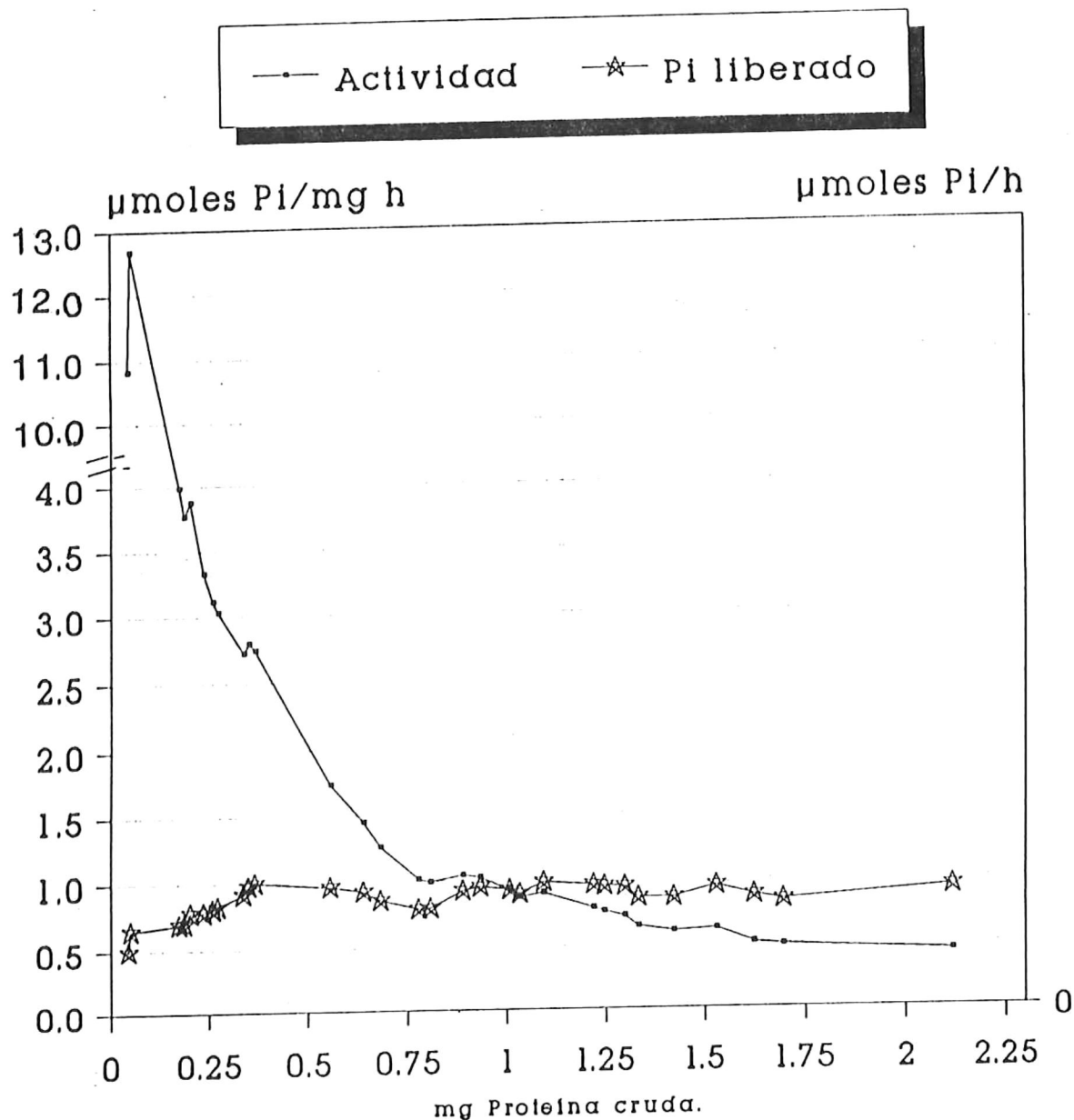


Fig.2.- Actividad de la Na⁺K⁺ATPasa del corazón de *Tivela stultorum* en función de la concentración de Proteína.

Cada valor de esta gráfica es el promedio de 3 mediciones agrupados en base a la cantidad de proteína presente. En la *Tabla del Apéndice* se muestran estos valores calculados a partir de los obtenidos **sin** y **con** la adición de ATP al medio de incubación.

Se utilizó el volumen de 0.2 ml de homogenado, equivalente a 0.85 ± 0.215 mg de proteína para realizar los diferentes estudios, seleccionando así una cantidad de enzima en el medio de incubación lo suficientemente alta para que una inhibición pueda ser observada y suficientemente baja para que la producción de P_i no se viese limitada por las condiciones iónicas del medio.

III.2. EFECTO DEL K^+ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na^+,K^+ -ATPasa.

La adición del ión K^+ al medio de incubación modificó de manera significativa la respuesta enzimática. Los valores de actividad obtenidos a una concentración de K^+ sin digitálicos, se muestran como promedio en la *Tabla 3*.

Parámetros	0mM K^+	2mM K^+	5mM K^+	10mM K^+	30mM K^+	50mM K^+
Promedio (μ moles P_i /mg h.)	1.213	1.227	1.420	1.488	1.461	1.230
Desviación estándar (d.e.)	0.115	0.119	0.121	0.114	0.118	0.178
Número de datos	18	17	15	17	18	11

En éste experimento se observó que conforme aumentó la concentración de K^+ en el medio de incubación se produjo un incremento en la actividad de la enzima hasta alcanzar un valor máximo de actividad a 10 mM de K^+ (1.486 μ moles Pi/mg h) a partir del cual la actividad disminuyó (*Fig. 3*).

III.3. EFECTO DE LA OUABAINA Y EL GRADIENTE DE K^+ EN LA ACTIVIDAD DE LA Na^+,K^+ -ATPasa.

La adición de ouabaina al medio de incubación modificó la respuesta de la Na^+,K^+ -ATPasa a la variación de la concentración del ión K^+ . Los valores promedio de la actividad enzimática se reportan en la *Tabla 4*.

El marco de referencia para la respuesta de la enzima en presencia de ouabaina, es el valor de actividad enzimática a la correspondiente concentración de K^+ y 0 mM de ouabaina.

Medio de Incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, ATP 0.8mM.

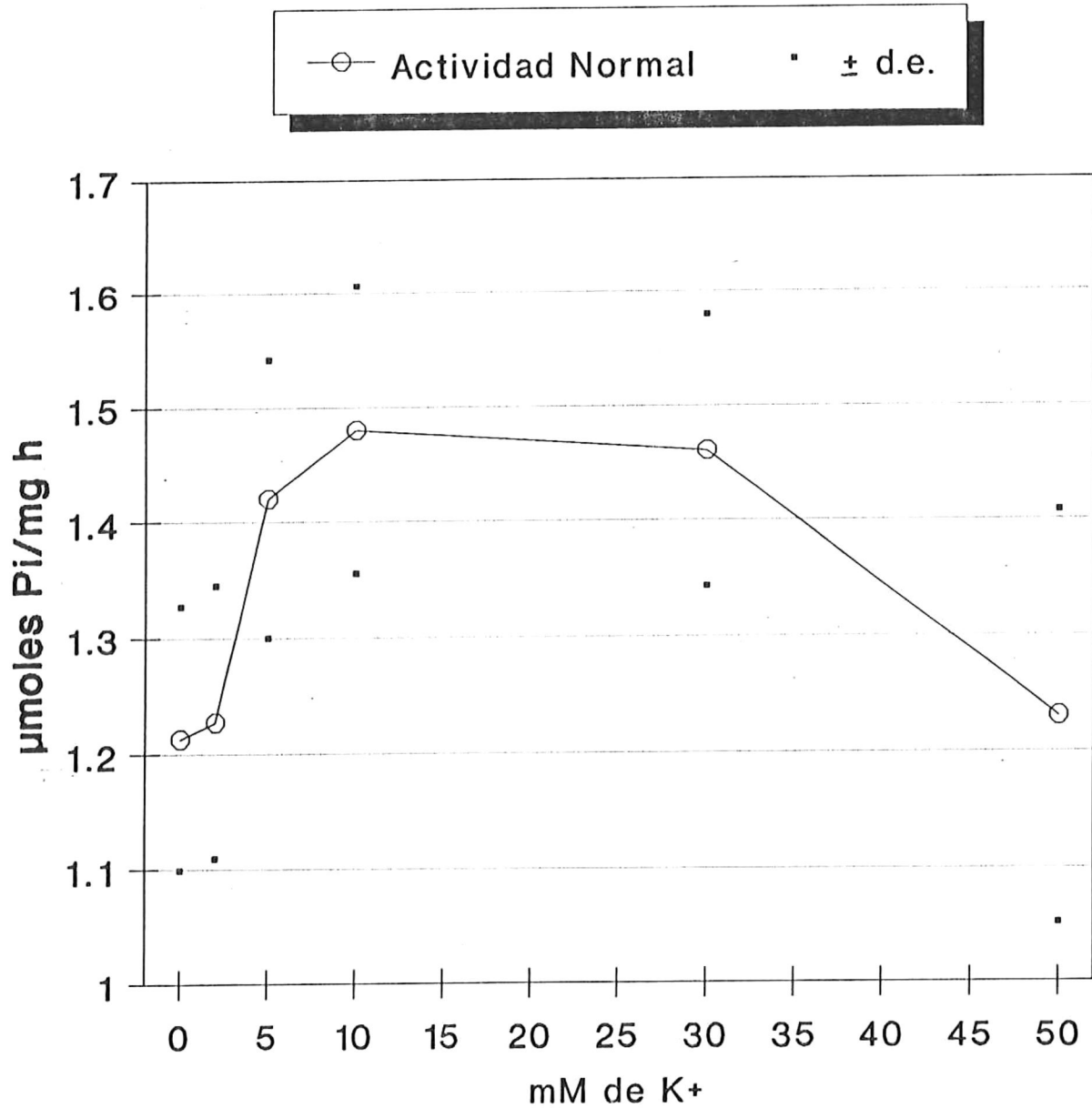


Fig.3.- Efecto del K⁺ sobre la actividad de la Na⁺K⁺ATPasa del corazón de *Tivela stultorum*.

Tabla 4. Valores de actividad de la Na⁺K⁺ATPasa en presencia de QUABAÍNA a varias concentraciones de K⁺. (µmoles de Pi/mg hora ± d.e.)

Quabaína mM	0mM K ⁺	2mM K ⁺	5mM K ⁺	10mM K ⁺	30mM K ⁺	50mM K ⁺
0	1.303 ^{±0.052} n=2	1.362 ^{±0.070} n=2	1.360 ^{±0.116} n=2	1.471 ^{±0.103} n=2	1.432 ^{±0.069} n=2	1.398 ^{±0.104} n=2
0.35	1.540 ^{±0.013} n=2	1.452 ^{±0.121} n=2	1.402 ^{±0.130} n=2	1.536 ^{±0.154} n=2	1.464 ^{±0.087} n=2	1.533 ^{±0.115} n=2
% de respuesta	118.18 †	106.63	103.07	104.48	102.24	109.65 ‡
0	1.200 ^{±0.074} n=5	1.205 ^{±0.062} n=5	1.422 ^{±0.075} n=5	1.432 ^{±0.069} n=5	1.443 ^{±0.061} n=5	1.257 ^{±0.061} n=4
0.5	1.290 ^{±0.148} n=12	1.315 ^{±0.185} n=12	1.298 ^{±0.142} n=12	1.260 ^{±0.140} n=12	1.269 ^{±0.195} n=12	1.297 ^{±0.185} n=12
% de respuesta	107.46	109.16	91.28 ↑	87.97 ‡	87.91 †	103.12
8	1.439 ^{±0.079} n=3	1.442 ^{±0.070} n=3	1.626 ^{±0.095} n=3	1.689 ^{±0.081} n=3	1.660 ^{±0.093} n=3	1.477 ^{±0.076} n=3
1	1.463 ^{±0.059} n=8	1.499 ^{±0.067} n=8	1.464 ^{±0.087} n=8	1.498 ^{±0.065} n=8	1.547 ^{±0.071} n=8	1.613 ^{±0.069} n=8
% de respuesta	101.64	103.94 ‡	90.05 ↑	88.68 †	93.28 ‡	109.25 †

† Diferencia Significativa a la actividad correspondiente sin Quabaína (P<0.1)

↑ Diferencia Significativa a la actividad correspondiente sin Quabaína (P<0.05)

‡ Diferencia Significativa a la actividad correspondiente sin Quabaína (P<0.025)

La respuesta de la enzima a cada concentración de ouabaína fue diferente, pero cada una de ellas presentó una disminución de la actividad a bajas concentraciones de K⁺, y conforme se incrementó la concentración del ión K⁺ la actividad se vio aumentada.

Para comparar la respuesta de la enzima ante las diferentes concentraciones de ouabaína, se refirió su actividad en presencia de ouabaína a su control (tubo correspondiente sin digitálico para cada experimento), para cada concentración de K^+ .

Los resultados obtenidos de esta operación se muestran en la *Figura 4*; en ella se observa que la concentración de 0.5 mM de ouabaína fue la que en mayor grado redujo significativamente la respuesta de la enzima a 5, 10 y 30 mM de K^+ , seguida de la de 1 mM y finalmente, la adición de 0.35 mM de ouabaína incrementó la actividad de la enzima en forma significativa a 0 y 50 mM de K^+ .

III.4. EFECTO DE LA DIGITOXINA Y EL GRADIENTE DE K^+ EN LA ACTIVIDAD DE LA Na^+,K^+ -ATPasa.

La respuesta de la enzima a la variación de la concentración del ión K^+ se modificó en presencia de digitoxina en el medio de incubación. La respuesta de la enzima se reporta como valores de actividad promedio, para cada concentración de K^+ en la *Tabla 5*.

Para evaluar la respuesta de la enzima a la presencia de la digitoxina, se tomó como referencia a la curva de actividad de 0 μ M de digitoxina.

Medio de incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, ATP 0.8mM, Na⁺ 1.6mM.

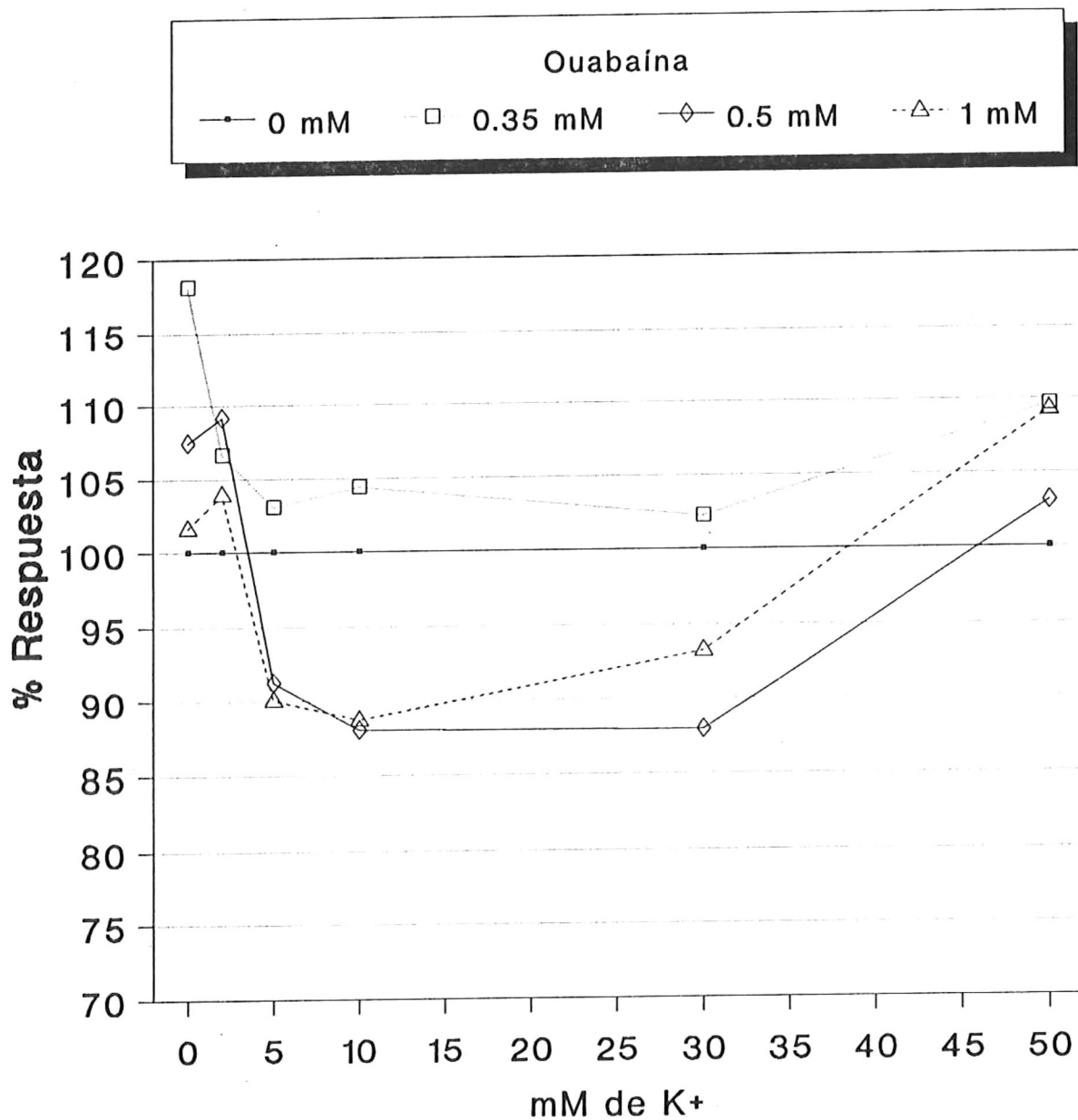


Fig.4.- Porcentaje de respuesta de la Na⁺K⁺ATPasa del corazón de *T.stultorum* a la ouabaína con un gradiente de K⁺.

Tabla 5 Valores de actividad de la Na ⁺ K ⁺ ATPasa en presencia de DIGITOXINA a varias concentraciones de K ⁺ . (μ moles de Pi/mg hora \pm d.e.)						
Digitoxina (μ M)	0mM K ⁺	2mM K ⁺	5mM K ⁺	10mM K ⁺	30mM K ⁺	50mM K ⁺
0	1.087 [±] 0.172 n=8	1.078 [±] 0.104 n=8	1.271 [±] 0.109 n=5	1.328 [±] 0.138 n=8	1.315 [±] 0.140 n=8	1.009 [±] 0.122 n=2
0.5	1.044 [±] 0.150 n=2	1.000 [±] 0.133 n=2	1.018 [±] 0.132 n=2	0.986 [±] 0.118 n=2	1.019 [±] 0.148 n=2	1.037 [±] 0.053 n=2
% de respuesta	96.13	92.77	88.87 †	74.21 †	77.48 †	102.79
2	1.063 [±] 0.144 n=2	1.113 [±] 0.138 n=2	1.039 [±] 0.099 n=2	0.994 [±] 0.123 n=2	1.050 [±] 0.100 n=2	0.968 [±] 0.080 n=2
% de respuesta	97.81	103.25	81.70 †	74.81 †	79.84 ↑	95.96

† Diferencia Significativa a la actividad correspondiente sin DIGITOXINA (P<0.1)

↑ Diferencia Significativa a la actividad correspondiente sin DIGITOXINA (P<0.05)

La adición de digitoxina al medio de incubación redujo la actividad de la enzima hasta alcanzar un mínimo a 10 mM de K⁺ para cada concentración a partir de la cual la actividad aumentó.

La digitoxina modificó la actividad de la enzima respecto a su actividad normal para cada concentración de K⁺; en general, la concentración de 0.5 μ M de digitoxina redujo más la actividad de la enzima que 2 μ M.

Para comparar el efecto de las concentraciones de digitoxina a lo largo del gradiente de K^+ , se refirió la actividad obtenida en presencia de digitoxina a la actividad obtenida sin ella para cada concentración de K^+ (*Figura 5*).

Tras esta operación se observa que la actividad de la enzima con 0.5 y 2 μ M de digitoxina redujo su actividad significativamente a 5, 10 y 30 mM de K^+ , alcanzando en ambas concentraciones de digitoxina un mínimo a 10 mM K^+ y una recuperación de la actividad cercana a la normal, a 50 mM K^+ .

III.5. EFECTO DEL Na^+ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA Na^+,K^+ -ATPasa Y UN GRADIENTE DE DIGOXINA.

En este caso, la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa ante dos concentraciones de sodio, una baja (1.6 mM) y una alta (100 mM) presenta un comportamiento semejante entre sí al verse aumentada la concentración de digoxina en el medio de incubación. Ambas curvas sufren primero un incremento en la actividad hasta alcanzar un máximo después del cual sufren una drástica reducción de la actividad. A partir de aquí, la actividad nuevamente se incrementó. Los valores obtenidos se muestran a continuación en la *Tabla 6*.

Medio de incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, ATP 0.8mM, Na⁺ 1.6mM.

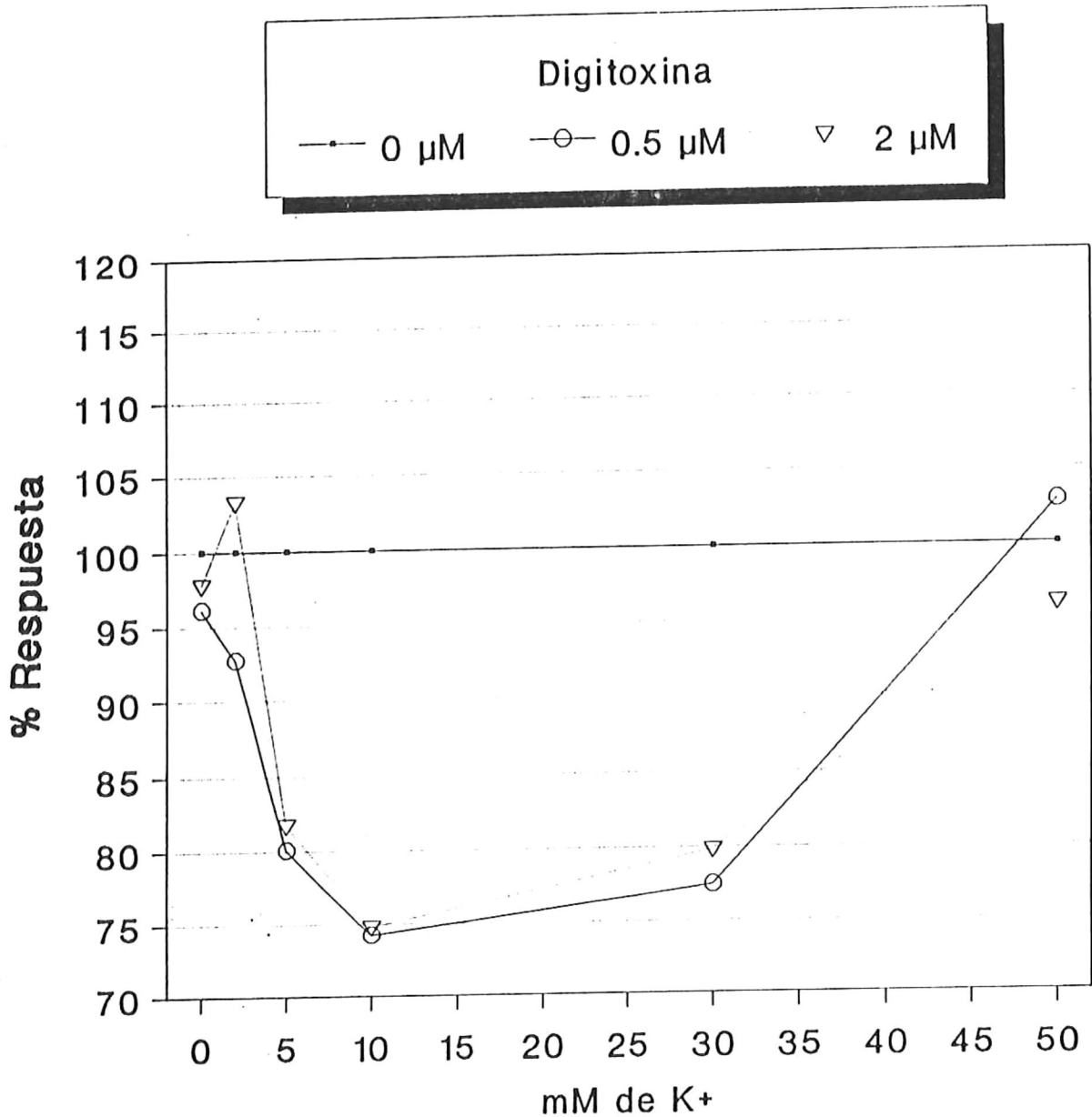


Fig.5.- Porcentaje de respuesta de la Na⁺K⁺ATPasa del corazón de *T.stultorum* a la digitoxina con un gradiente de K⁺.

Tabla 6. Efecto de la DIGOXINA sobre la actividad de la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ a dos concentraciones de Na^+ .

[Digoxinal] (nM)	1.6 mM Na^+		100 mM Na^+		Número total de observaciones
	$\mu\text{moles Pi/mg hr} \pm \text{d.e.}$	%	$\mu\text{moles Pi/mg hr} \pm \text{d.e.}$	%	
0	1.125 \pm 0.169	100	1.072 \pm 0.097	100	38
0.32	1.357 \pm 0.033	111.91	1.051 \pm 0.016	94.04 Δ	6
0.64	1.403 \pm 0.016	115.71	1.115 \pm 0.041	104.04 \Downarrow	6
1.64	0.974 \pm 0.025	80.32	1.142 \pm 0.039	106.52 \parallel	6
2.56	0.972 \pm 0.063	80.16	1.221 \pm 0.026	113.89 \parallel	6
128	1.045 \pm 0.023	96.18	0.856 \pm 0.027	79.85 \Downarrow	6
1,280	1.144 \pm 0.010	94.35	0.935 \pm 0.036	87.22 Δ	6
25,600	1.183 \pm 0.056	97.56	1.043 \pm 0.035	97.29	6
51,200	1.143 \pm 0.048	94.26	1.068 \pm 0.017	99.62	6

\Downarrow Diferencia significativa al valor correspondiente con digoxina a 1.6 mM de Na^+ ($P < 0.025$)
 Δ Diferencia significativa al valor correspondiente con digoxina a 1.6 mM de Na^+ ($P < 0.010$)
 \parallel Diferencia significativa al valor correspondiente con digoxina a 1.6 mM de Na^+ ($P < 0.005$)

Con 1.6 mM de sodio, la actividad de la enzima se incrementó conforme aumentó la concentración de digoxina (Fig.6), llegando a una región donde ocurre la inhibición de la enzima (1.6-128 nM de digoxina) y nuevamente al aumentar la concentración de digoxina, se observó una estimulación en la actividad.

Con 100 mM de sodio, ocurre prácticamente lo mismo, salvo que el intervalo de inhibición se vio desplazado a la derecha (1.28-25.6 μM de digoxina).

Medio de incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, ATP 0.8mM, K⁺ 5mM.

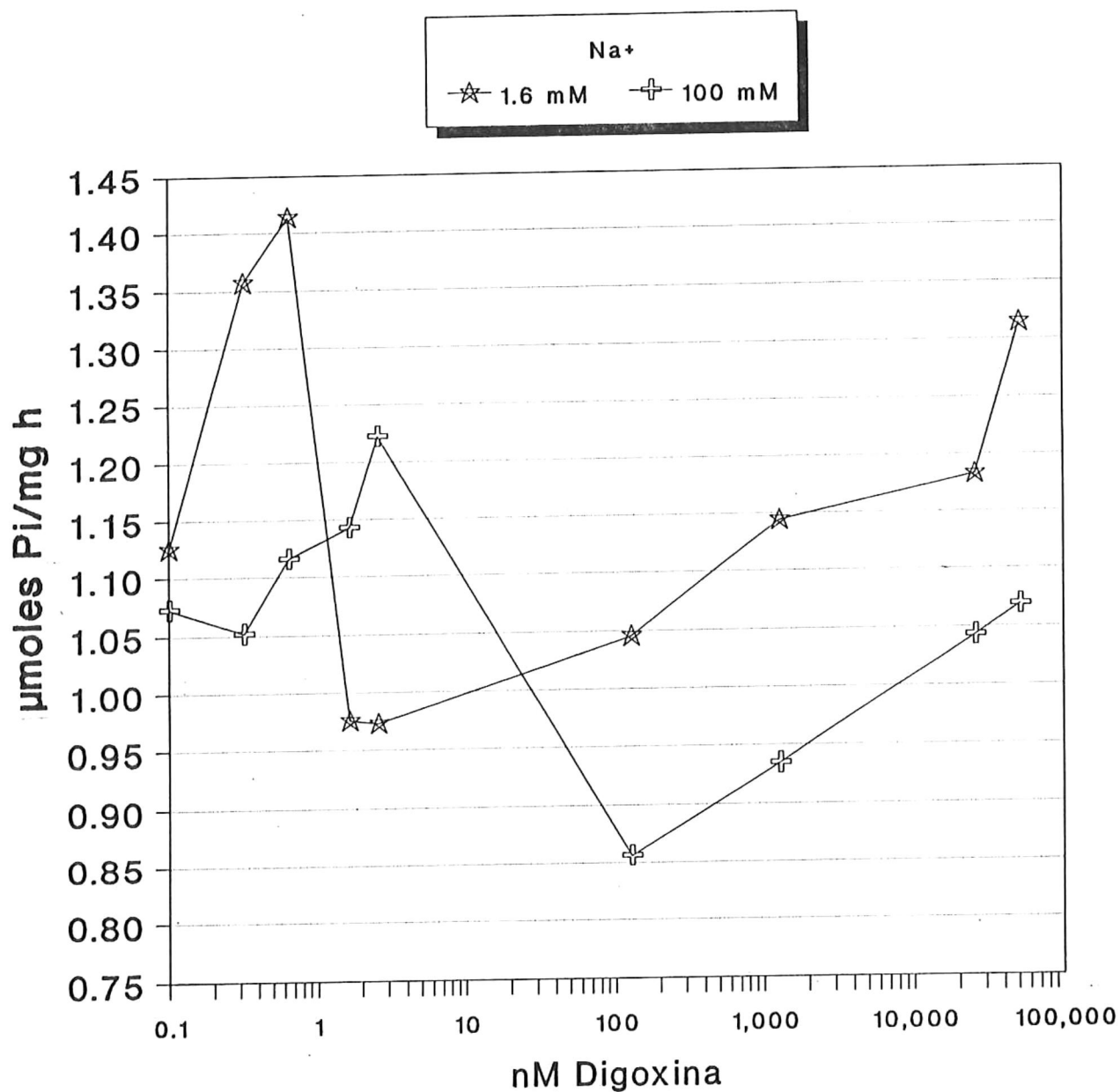


Fig.6.- Variación de la actividad de la Na⁺K⁺ATPasa por efecto de la digoxina a dos concentraciones de Na⁺.

III.5.1 EFECTO DE LA ADICION DE ATP .

Aunque no se realizaron ensayos con distintas concentraciones de ATP, es importante mencionar que con altas concentraciones de digoxina (25.6 y 51.2 μ M) se observó un incremento apreciable en la actividad de la enzima sin adición de ATP. Cuando se le añadió ATP al medio de incubación, la actividad fue mayor, pero la actividad debida a la adición del ATP permaneció dentro del intervalo obtenido anteriormente. Este efecto se observó tanto a 1.6 mM de Na⁺ como a 100 mM (Fig. 7).

Medio de incubación: HEPES 50mM a pH 8,
Mg⁺⁺ 6mM, Na⁺ 1.6mM, K⁺ 5mM.

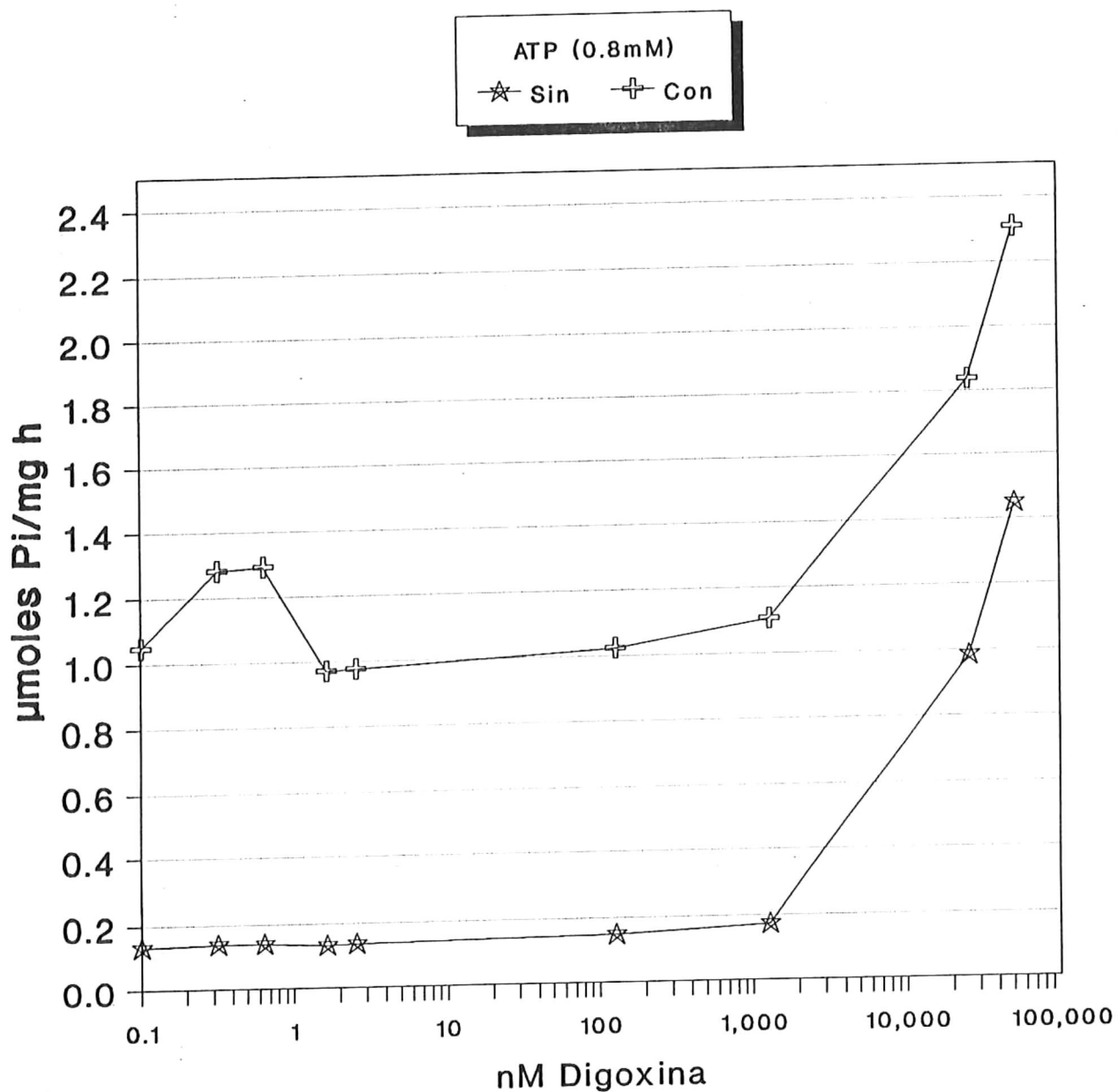


Fig.7.- Variación de la actividad de la Na⁺K⁺ATPasa con y sin ATP en un gradiente de digoxina.

IV. DISCUSIONES.

El valor de la actividad encontrado para la ATPasa activada por el Na^+ y K^+ (Na^+, K^+ -ATPasa) en el homogenado del corazón de la almeja *Tivela stultorum*, es de magnitud semejante a la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa de otros tejidos homogenados de invertebrados como la almeja *Rangia cuneata* (manto, nefridio, branquias y pie, 1.04, 0.56, 0.33 y 0.07 moles $\text{P}_i/\text{mg h}$, respectivamente) (Saintsing y Towle, 1978), y del corazón del cangrejo *Carcinus maenas* ($0.7 \pm 0.2 \mu\text{moles } \text{P}_i/\text{mg h}$) (Siebers et al., 1982). Estos valores de actividad para la Na^+, K^+ -ATPasa difieren sustancialmente de los obtenidos para fracciones purificadas de los corazones de rata y conejillo de indias ($1-15 \mu\text{moles } \text{P}_i/\text{mg h}$) y cerebro de rata ($20-220 \mu\text{moles } \text{P}_i/\text{mg h}$) (Akerá et al., 1985).

A pesar de que el principal motivo de las diferencias encontradas para estos valores enzimáticos se debe a la naturaleza de la enzima según el tejido y la especie (Akerá et al., 1985), se ha observado que también las condiciones experimentales influyen de manera determinante sobre la actividad de la enzima (Lee y Klaus, 1971; Erdmann y Schöner, 1973; Akerá et al, 1978; 1979a; Godfraind, 1981; Akerá et al, 1985). En el presente estudio la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa en el ventrículo de *T. stultorum* fué detectada a diferencia del de Saintsing y Towle (1978) en el que se reporta que no se detectó la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa en el ventrículo de *Rangia cuneata*, pero sí en su manto, la cual a su vez, no fue detectada por Wheeler y Harrison (1982) en el manto de la almeja *Anodonta cataracta*.

La respuesta de la enzima puede ser modificada por diversos factores durante la incubación (Skou, 1957; Auditore y Murray, 1962). Uno de ellos es la temperatura de incubación empleada, la cual se ha observado que en experimentos con invertebrados es de 25°C

(Saintsling y Towle, 1978; Siebers et al., 1982; Wheeler y Harrison, 1982) mientras que en otros organismos como los mamíferos se ha empleado una temperatura alrededor de 37°C (Dunham y Glynn, 1961; Auditore y Murray, 1962; Akera, 1971) por lo que la comparación de la actividad enzimática debe de realizarse con precaución, considerando las condiciones experimentales.

Otro factor a considerar es la proporción óptima entre el Na^+ y K^+ , la cual varía ampliamente según la especie (Auditore y Murray, 1962). Aunque en este trabajo no se pretendió encontrar la proporción óptima entre el Na^+ y K^+ para la ATPasa del corazón de la almeja, el uso de un intervalo desde 1:2 hasta 1:50 en la proporción de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ permitió observar una variación significativa de la actividad de la enzima, lo que confirma que la Na^+,K^+ -ATPasa es dependiente de las condiciones iónicas del medio de incubación.

La adición de K^+ al medio de incubación causó la estimulación de la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa hasta alcanzar un punto de máxima actividad a partir del cual el Na^+ es desplazado del sustrato por el K^+ , lo cual causa la inhibición de la enzima (Skou, 1957; Post et al, 1960; Dunham y Glynn, 1961 y Auditore y Murray, 1962).

El valor de la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa del homogenado de corazón de la almeja (*Fig.3*), sin la adición de K^+ al medio de incubación fué ligeramente mayor a la respuesta de ATPasa purificada de tejidos de otros organismos como el corazón de conejo y eritrocitos humanos (Post et al., 1960; Auditore y Murray, 1962). Esta respuesta, se atribuye a los iones endógeno, que a las concentraciones del tejido fueron capaces de activar a la enzima.

A pesar de ello, el patrón de respuesta de la Na^+,K^+ -ATPasa del corazón de la almeja a la adición del ión K^+ , es muy similar a los resultados encontrados en la Na^+,K^+ -ATPasa de otros modelos experimentales para los que se reporta que la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa se ve estimulada por la adición de K^+ hasta alcanzar una actividad máxima en un inter-

valo de 5-10 mM K^+ y un posterior incremento en la concentración de K^+ causa una inhibición de la enzima. Entre los sistemas de prueba en los cuales se ha observado este efecto por la adición de K^+ se encuentran el corazón de conejo (Auditore y Murray, 1962), el corazón de conejillo de Indias (Erdmann et al., 1971; Peters et al., 1974) así como los eritrocitos humanos (Post et al., 1960, y Dunham y Glynn, 1961).

La adición de ouabaína al medio de incubación modificó en forma significativa la respuesta de la Na^+, K^+ -ATPasa a lo largo del gradiente de K^+ (Figura 5). Se observa que el valor de la actividad enzimática fué superior al normal con la adición de 0.35 mM, 0.5 y 1 mM de ouabaína en presencia de 0, 2 y 50 mM de K^+ , mientras que a 5, 10 y 30 mM de ouabaína se observó una inhibición de la enzima. Esta estimulación de la enzima ha sido reportada esporádicamente por algunos investigadores (Lee y Klaus, 1971; Peters et al., 1974; Akera, 1981; Godfraind, 1981). Apesar de ello, la gran mayoría de los estudios observan a la inhibición como efecto típico de los digitálicos sobre la de la Na^+, K^+ -ATPasa (Akera, 1971; Fricke y Klaus, 1971; Erdmann y Schöner, 1973; Akera et al., 1985).

El incremento de la concentración de K^+ en el medio de incubación para todas las concentraciones de ouabaína, causó la disminución de la actividad de la enzima. La mayor inhibición observada, ocurrió bajo las mismas condiciones de incubación en las que la Na^+K^+ ATPasa obtuvo la actividad óptima en ausencia de digitálico, (10 mM K^+ , 6 mM Mg^{++} , 1.6 mM Na^+). Un incremento mayor en la concentración de K^+ altera el equilibrio del complejo enzima-digital lo cual conduce a una reducción ("alivio") de la inhibición de la enzima. Esto se debe a que el K^+ reduce la afinidad del sitio de enlace sensible a la ouabaína de manera que las tasas de asociación y de disociación entre la ouabaína y la ATPasa se reducen (Akera et al., 1978 y Godfraind, 1981). Esta reducción del enlace digitálico por la adición de K^+ , ha sido ob-

servada sobre sistemas enzimáticos y fisiológicos de numerosos tejidos, como el corazón y cerebro de rata y conejillo de Indias (Akerá, 1981; Akerá et al., 1979b, 1985; Noël et al., 1990).

Por otra parte, la adición de digitoxina al medio de incubación modificó de manera similar a la ouabaína la respuesta de la Na^+, K^+ -ATPasa a lo largo del gradiente de K^+ . Aunque a bajas concentraciones de K^+ (2 mM) la respuesta a 0.5 y 2 μM de digitoxina son distintas (Fig.6), el incremento en la concentración de K^+ a partir de 10 mM, redujo la afinidad aparente de la enzima por ambas concentraciones de digitoxina, lo cual indica que a partir de 10 mM la adición de K^+ fue suficiente para "aliviar" a la enzima de la inhibición. Esto concuerda con los hallazgos de Frike y Klaus (1971), quienes encontraron que el incremento de la concentración de K^+ de 5 a 16mM causó una estimulación significativa tanto en el comportamiento dosis-respuesta del músculo papilar de conejillos de indias, así como en el sistema de la Na^+, K^+ -ATPasa. De igual manera, observaron que una mayor adición de K^+ contrarrestó la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa y modificó el comportamiento dosis-respuesta del músculo papilar por la adición de digitoxina.

Este efecto del ión K^+ sobre la Na^+, K^+ -ATPasa aislada de varios tejidos en presencia de distintos digitálicos, fue observado por otros autores (Akerá et al., 1985) quienes sugirieron que la adición de K^+ reduce la formación del enlace de la enzima con el digitálico al disminuir su afinidad por él o bien, retrasando la disociación del enlace.

Comparando los resultados obtenidos para la enzima en presencia de ouabaína y digitoxina, se observa que en ambos casos se obtuvieron respuestas de inhibición para algunas concentraciones y de estimulación para otras presentando diferencias en su respuesta a 0 mM, 2 mM y a 50mM de K^+ , que bien pueden ser causadas por las características intrínsecas de cada digitálico (Peters et al., 1974; Akerá et al., 1979a y Godfraind, 1981). Una de estas

características es la estructura química del digitálico de la cual dependen los ángulos y distancias de enlace con los sitios activos del complejo enzima-digital (Akerá et al., 1985). La diferencia de estructuras entre la ouabaína y la digitoxina les confiere distinta polaridad. La digitoxina posee sólo un grupo hidroxilo, por lo cual es menos polar que la ouabaína que posee cinco (Goodman y Gillman, 1978). Eso le permite atravesar de manera selectiva la capa lipídica formada sobre el sitio de enlace de la ATPasa por la adición de K^+ , la cual es responsable de la velocidad de disociación del complejo enzima-digital (Akerá et al., 1978, 1979a). De esta manera, se explicaría cómo a la concentración de 50 mM K^+ la inhibición causada por la digitoxina fue mejor contrarrestada que la causada por la ouabaína. A pesar de ello, es claro que la tendencia generalizada del efecto del ión K^+ sobre la Na^+, K^+ -ATPasa es de disminuir la inhibición enzimática causada por el cardiotónico, la cual es mayor con la digitoxina que con la ouabaína.

El incremento de la concentración de Na^+ en el medio de incubación en presencia de un gradiente de concentraciones de digoxina (*Fig. 8*) indica el papel que la proporción $Na^+:K^+$ desempeña en la acción de la enzima y el efecto que esta relación ejerce sobre la inhibición por digoxina. La modificación en la proporción $Na^+:K^+$ se reflejó en la disminución de la actividad enzimática. Esta reducción de la actividad es semejante a la observada por Auditore y Murray (1962), quienes encontraron que altas concentraciones de Na^+ con poco K^+ no permitieron a la enzima alcanzar su máxima activación, y a una baja concentración de Na^+ y poco K^+ la estimulación era muy grande.

Así mismo, al verse modificada la proporción $Na^+:K^+$ por el incremento de Na^+ , la concentración de digoxina que causó la inhibición de la enzima se modificó de tal manera que para obtener un máximo de inhibición semejante fue necesario incrementar la concentración de la digoxina en dos órdenes de magnitud, es decir la región donde la digoxina inhibe a la enzima se desplazó hacia la derecha. Este comportamiento entre la enzima, la propor-

ción $\text{Na}^+:\text{K}^+$ y el digitálico es semejante al observado para la Na^+,K^+ -ATPasa del homogenado de patas de *C. maenas* por (Skou, 1957) y corazón de rata (Akerá et al., 1985) para los cuales se encontró que al incrementarse la concentración de Na^+ en el medio fué necesario incrementar la concentración del digitálico para observar una inhibición semejante, lo cual indica el grado de afinidad de la enzima por el digitálico, es decir la capacidad de formar un complejo enzima-digital estable.

Por otra parte, la adición de altas concentraciones de digoxina (25.6 y 51.2 nM) causó un incremento de la actividad tanto a 1.6 mM como 100 mM de Na^+ la cual se presentó **sin** la adición de ATP y la actividad medida alcanzó y superó la actividad obtenida con otras concentraciones de digoxina **con** la adición de ATP, mientras que la cantidad de P_i liberado por la adición de ATP fue semejante a la de otras concentraciones de digoxina. Por lo tanto el incremento en la producción de P_i fue independiente de la adición de ATP y concentración de sodio (se muestra a 1.6 mM en la Fig. 9). Este comportamiento debió ser causado por la digoxina la cual al encontrarse en altas concentraciones modificó el equilibrio iónico entre la enzima y sus ligandos. Un incremento similar en la actividad de la Na^+,K^+ -ATPasa fue observado por Erdmann et al., (1971) en organismos con deficiencias de K^+ .

Considerando los valores de actividad de las Tablas 4, 5 y 6, las inhibiciones máximas obtenidas bajo condiciones iónicas semejantes para los 3 digitálicos (1.6 mM Na^+ y 5 mM K^+) se observa:

Digitalico	[]		máximo % de inhibición a 5 mM de K ⁺
<i>digoxina</i>	2.56nM	ó 2 ng/ml	19.8 %
<i>digltoxina</i>	0.5µM	ó 382ng/ml	19.9 %
<i>ouabaína</i>	0.5mM	ó 364 g/ml	13.1 %

Considerando estos valores, se puede decir que la digoxina ocasiona una mayor respuesta de la Na⁺,K⁺-ATPasa del corazón de la almeja, luego la digltoxina y por último, la ouabaína, y en base a la cantidad administrada, se observa que la digoxina es nuevamente la que causó una mayor respuesta de la enzima, luego la ouabaína y la digltoxina.

Aunque el presente trabajo es preliminar con el fin de explorar las posibilidades de la almeja *Tivela stultorum* como modelo animal para el estudio de glucósidos cardiotónicos, es posible afirmar que los resultados encontrados abren esta alternativa. La respuesta de la Na⁺,K⁺-ATPasa obtenida en preparaciones crudas, establece un marco de referencia para estudios posteriores, tanto para un mayor conocimiento bioquímico de la almeja, como a nivel fisiológico de la interacción de los glucósidos cardiotónicos con la Na⁺,K⁺-ATPasa, la cual es el posible receptor inotrópico positivo en el corazón.

V. CONCLUSIONES.

I. Se detectó una actividad enzimática tipo Adenosín trifosfatasa dependiente de magnesio, activada por sodio y potasio (Na^+, K^+ -ATPasa, EC 3.6.1.3) en el corazón de la almeja pismo (*Tivela stultorum*, Mawe 1823).

II. La actividad de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa del corazón varió de 1.213 moles $\text{P}_i/\text{mg h}$ (sin la adición de K^+) hasta una actividad máxima de 1.48 moles $\text{P}_i/\text{mg h}$ (a 10 mM de K^+ y 1.6 mM de Na^+) al adicionar K^+ al medio de incubación en una concentración desde 0 hasta 50 mM.

III. La Na^+, K^+ -ATPasa encontrada fue estimulada hasta en un 18% e inhibida hasta un 12% por ouabaína (sin adición y con adición de 10 mM de K^+ respectivamente). La adición de digitoxina causó una estimulación del 3% (al añadir 2 mM de K^+), y una inhibición hasta del 25.79% (con la adición de 10 mM de K^+).

IV. El efecto de inhibición de los digitálicos sobre la Na^+, K^+ -ATPasa de *T. stultorum* es contrarrestado por la adición de K^+ al medio de incubación.

V. El comportamiento de la Na^+, K^+ -ATPasa ante las diferentes variaciones de K^+ y digitálicos, es semejante al patrón de comportamiento de otras enzimas reportadas para especies que se utilizan para el estudio de los glucósidos cardiotónicos.

VI. La almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe 1823) posee potencial como modelo animal para el estudio de glucósidos cardiotónicos.

VII. LITERATURA CITADA.

Abbott, R.T.(1985) **Seashells of the world.** Golden Press, U.S.A., 160 pp.

Akera, T. (1971) **Quantitative aspects of the interaction between ouabain and Na^+, K^+ -ATPase *in vitro*.** Biochim.Biophys. Acta, 249:53-62.

Akera, T.(1981) **EFFECTS OF CARDIAC GLYCOSIDES ON Na^+, K^+ -ATPase,** en **Cardiac GLYcosides.** Part I. Experimental Pharmacology. Chapter 14. Greef K. (ed),Spring-Verlag Berlin. pag. 287-336.

Akera, T.; K.Temma; S.A.Wiest and T.M.Brody (1978) **Reduction of the equilibrium binding of Cardiac Glycosides and related compounds to Na^+, K^+ -ATPase, as a possible mechanism for the Potassium-induced reversal of their toxicity.** Arch. Pharmacol., 304:157-165.

Akera, T.; S.Yamamoto; J. Chubb; R.McNish and T.M. Brody (1979a) **Biochemical basis for the low sensitivity of the rat heart to Digitalis.** Arch. Pharmacol., 308:81-88.

Akera, T.; S.A. Wiest and T.M. Brody (1979b) **Diferential effect of Potassium on the action of Digoxin and Digoxigenin in Guinea-pig heart.** Eur.J.Pharmacol., 57:343-351.

Akera, T.; Yuk-Chow Ng; Ing-Shih Shieh; E. Bero; T.M. Brody and W.E. Braselton (1985) **Effects of K^+ on the interaction between Cardiac Glycosides and Na^+, K^+ -ATPase.** Eur. J. Pharmacol., 111:147-157.

- Arrington, L.R. (1978) **Introductory Laboratory Animal Science**. Interstate, Illinois, U.S.A., 211 pp.
- Auditore, J. and L. Murray (1962) **Cardiac (microsomal) Na⁺K⁺, Adenosintriphosphatase and its Possible relationship to the active Na⁺,K⁺-transport system**. *Archs. Biochem. Biophys*, 99:372-382.
- Baquelro-C., E.; J.A. Masso-R. y H. Guajardo-B. (1982) **Distribución y abundancia de moluscos de inportancia comercial en Baja California Sur**. Delegación Federal de Pesca en el Estado de B.C.S., Centro de Investigaciones Pesqueras, La Paz, B.C.S.,I.N.P. ___ pp.
- Bass, E. (1986) **Use of the cricket *Acheta domestica* as a bioassay organism for the toxic extract from *Gonyaulax molinata*** *J.Phycol.*, 22(4):546-548.
- Berthe, J. et C. Petitfrère (1934) **L'autonomisme cardiaque chez l'*Anodonte*** *Archives Internationales de Physiologie*, 39:98-111.
- Chol, Y. and T. Akera (1977) **Kinetics studies on the interaction between ouabain and Na⁺,K⁺-ATPase**. *Biochim.Biophys.Acta*, 481:648-659.
- Curran J.C.; P.J. Holmes; J.E. Yersin (1986) **Moored shellfish cages for pullution monitoring. Design and operational experience**. *Mar. Pollut. Bull.* 17(10):464-465.
- Dougan D.H.F.; P.Duffield; D.N.Wade (1987) **Modulation of dopamine receptors in *Tapes* clam by dextroamphetamine and phenylethanolamine**. *Comp. Blochem. Physiol.*; 86C(2):317-324.

- Dunham, E.T. and I.M. Glynn (1961) **Adenosinetriphosphatase activity and the active movemens of alkali metal ions.** J.Physiol., 156:274-293.
- Dykens, J.A. and C.P.Mangum (1979) **The design of cardiac muscle and the mode of metabolism in Molluscs.** Blochem. Physiol., (62A):549-554.
- Erdmann, E.; H.D. Bolte; B.Lüderitz (1971) **The (Na⁺ + K⁺)-ATPase Activity of Guinea pig heart muscle in Potassium deficiency.** Archs. Biochem. Biophys., 145:121-125.
- Erdmann, E. and W. Schöner (1973) **ouabain-receptor interactions in Na⁺,K⁺-ATPase preparations from different tissues and species.** Blochim. Biophys. Acta, 307:386-398.
- Fricke, U. and N. Klaus (1971) **Comparative studies of the influence of various K⁺ concentrations on the action of K-stophantidin, digitoxin and stophantidin-3-bromoacetate on papillary muscle and on membrane ATPase of guinea pigs hearts.** Eur. J. Pharmac., 15:1-7.
- Galney, L.F. Jr and S.E. Shumway (1988) **Physiological effects of *Protogonyaulax tamarensis* on cardiac activity in bivalve molluscs.** Comp. Biochem. Physiol.; 9C(1):159-164.
- Galtsoff, P.S. (1964) **The american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)** Fishery Bull. of the Fish and Wildlife Service, Chapt. XI. 64:239-270.

- Godfraind, T. (1981) **Stimulation and inhibition of the Na^+K^+ Pump by Cardiac Glycosides.**
Part I. Experimental Pharmacology. Chapter 16 Greef K. (ed), Spring-Verlag Berlin. pag. 381-393.
- ález, V. and G. Escalona de Motta (1989) **Inhibitory action of sea anemone toxin II (ATX II) on clam heart.** Am. Zool., 29(4):51A.
- Goodman, L.S. y A. Gilman (1978) **Bases farmacológicas de la terapéutica.** 5a. Interamericana, México, 1412 pp.
- Gray, K.R. and L.E. Deaton (1987) **Excitation of the clam heart by phorbol esters.** Am. Zool. 27(4) 127A.
- Greenberg, M.J. and D.A. Windsord (1962) **Action of Acetylcholine on bivalve hearts.** Science, 137 (3529):534-535.
- Greenberg, M.J. (1984) **The heart of the northern hard clam: Its enduring role in neuropharmacological research.** National Shellfisheries Association, Tampa Florida. Annual Meeting, June 25-28. pag.37.
- Hagane, K.; T. Akera; P. Stemmer; A. Yao; C. Yokoyama (1988) **Comparison of [^3H] ouabain binding sites in intact cells and cell homogenates: apparent lack of glycoside receptors unrelated to sarcolemmal Na^+K^+ ATPase in guinea-pig heart.** Eur. J. Pharmac., 146(1988)137-144.
- Halstead, B. (1989) **Workshop on potential terrestrial and aquatic natural products for the production of drugs.** Facultad de Ciencias Marinas U.A.B.C., Ensenada México.

- Hamlyn, J.M.; M.D. Ashen; B. Forrest; A.C. Rogowski and R.J. White (1988) **Species sensitivity of the sodium pump to a circulating ouabain-like inhibitor in acute hypervolemia and doxa hypertension: comparison with ouabain.** Prog. Biochem. Pharmacol. 23:22-34.
- Harada, A.; K. Sakata; K. Ina (1984) **A new screening method for antifouling substances using the blue mussel, *Mytilus edulis* L.** Agric. Biol. Chem. 48(3):641-644.
- Jullien A. et D. Vincent (1938) **Sur l'action de l'acétylcholine sur le coeur des Mollusques. L'antagonisme curare-acétylcholine.** Compt. Rend. Hebd. Séances de l'Académie des Sci., 206:209-211.
- Kaiser, H.E. (1980) **Species-specific potential of invertebrates for toxicological research.** Park University Press. Baltimore, U.S.A. 224 pp.
- Kelly R.A. (1990) **Cardiac glycosides and congestive heart failure.** Am. J. Cardiol., March 6, 65:10E-16E.
- Krelszlg, E. (1987) **Introducción a la estadística matemática. Principios y métodos.** Ed. Limusa, México. 505 pp.
- Lee, K.S. and W.Klaus (1971) **The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.** Pharmacol.Rev., 23:193-261.
- Lowry, O.H.; J. Rosemberg; A.L. Farr and R.J. Randall (1951) **Protein measurement with the FOLIN PHENOL Reagent.** J.Biol.Chem., 193:265-275.

- Matsui, H. and A. Schwartz (1968) **Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the Na^+, K^+ dependant ATPase from cardiac tissue.** *Biochim. Biophys. Acta*, 151:655-663.
- Marikyan, G.G.; T.G. Ambartsumyan and S.Y. Adamyan (1983) **Ouabaine insensitive K^+ and Na^+ fluxes in frog muscles.** *Biophysics*, 28(6):1084-1087.
- Menzer, Robert E. (1987) **Selection of animal models for data interpretation.** En: **Toxic Substances and Human Risk.** Chapter 8. R.G. Tardiff and J.V. Rodricks (Eds.) Plenum Press Inc. N.Y., pag. 133-152.
- Michael, L.; B.J.R. Pitts and A. Schwartz (1978) **Is pump stimulation associated with positive inotrophy of the heart?** *Science*, 200:1287-1289.
- Nigrelli, R.F. and S. Jakowska (1960) **Effects of Holothurin asteroid saponin from the Bahamian Sea Cucumber (*Actinopyga agassizi*) on Various Biological systems.** *Ann. N.Y. Sc.*, 90:884-891.
- Noël, F.; M. Fagoo and T. Godfraind (1990) **A comparison of the affinities of rat ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase isozymes for cardioactive steroids, role of lactone ring, sugar moiety and KCl concentration.** *Biochem. Pharmacol.* 40(12):2611-2616.
- Otis, A.B. (1942) **Effects of certain drugs and ions on the Oyster heart.** *Physiol. Zool.*, 15(4):418-435.
- Peters, T.; R.H. Raben and O. Wassermann (1974) **Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase by ouabain, Casseine and their alkylating derivatives.** *Eur. J. Pharmacol.*, 26:166-174.

- Pilgrim, R.L.C. (1954) The action of Acetylcholine on the hearts of Lamellibranch MOLLUSCS. *J.Physiol.*, 125(1):208-214.
- Post, R.L., C.R. Merritt, C.R. Kinsolving and C.D. Albright (1960) Membrane Adenosine Triphosphatase as a participant in the active transport of Sodium and Potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 235:1796-1802.
- Prosser, C.L. (1940) Acetylcholine and nervous inhibition in the heart of Lamellibranch Molluscs. *J. Physiol.*, 125(1):208-214.
- Pushkar, N.K. and S.K. Kulkarni (1977) Pharmacological active substances from the sea, II. Various Cardiovascular Activities Found in the Extracts of Marine Organisms. *Lloydia* 40(3):253-268.
- Repke, K.R.H. y W. Schönfeld (1984) Na^+/K^+ -ATPase as the Digitalis receptor. *Trends Pharmac.Sci.*,5:393-396.
- Root, M. (1988) UnderWater Pharmacy. *Sea Frontiers* Jan-Feb. 13:42-47.
- Saintsling, D.G. and D.W. Towle (1978) Na^+K^+ ATPase in the osmoregulating clam *Rangia cuneata* *Jour.Exp.Zool.*, 206:435-442.
- Schönfeld, W.; R. Schönfeld; K.H. Meneke; J.Weiland and K.R. Repke (1986) Origin of differences of inhibitory potency of cardiac glycosides in Na^+/K^+ transporting ATPase from human cardiac muscle, human brain cortex and Guinea-pig cardiac muscle. *Biochem. Pharmacol.*, 35(19): 3221-3231.

- Shumway, S.E. and Cicci T.L. (1989) The effects of toxic algae on the behavior and physiology of bivalve molluscs. *J.Shellfish Res.*; 8(2):443.
- Siebers, D.; K.Leweck; H.Markus and A.Winkler (1982) Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar. Biol.*, 69:37-43.
- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an Adenosine Triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim.Biophys.Acta*, 23:394-401.
- Vaillard-Nava, M.I. (1981) Respuestas fisiológicas de *Tivela Stultorum* (Mollusca, Lamelibranchia) a cambios de salinidad y temperatura: Implicaciones en su cultivo. Tesis Profesional, U.A.B.C. F.C.M. Ensenada B.C. México. 67 pp.
- Wait, R.B. (1943) The action of the Acetylcholine on the isolated heart of *Venus mercenaria* *Biol.Bull.*, 85(1):79-85.
- Wheeler, A. P. and E. W. Harrison (1982) Subcellular localization and characterization of HCO_3^- ATPase from the mantle of the freshwater clam *Anodonta cataracta*. *J. Biochem. Physiol.*, 71B(4):629-636.

V I I . A P E N D I C E .

Tabla . Actividad de la Na⁺K⁺ ATPasa a distintas concentraciones de homogenado.
I
(Datos agrupados)

Proteína cruda (ng)	Pi μ moles Pi/h.		Pi μ moles Pi /h.	Actividad μ moles Pi /mg h.	NUMERO TOTAL de DATOS.
	Sin ATP	Con ATP			
0.045 ⁺ _{-0.000}	0.071	0.570	0.499	10.916	1
0.051 ⁺ _{-0.000}	0.071	0.725	0.653	12.045	1
0.174 ⁺ _{-0.003}	0.088	0.783	0.695	3.983	3
0.186 ⁺ _{-0.002}	0.089	0.791	0.701	3.764	3
0.203 ⁺ _{-0.009}	0.109	0.792	0.782	3.870	3
0.236 ⁺ _{-0.003}	0.086	0.874	0.787	3.328	3
0.258 ⁺ _{-0.003}	0.110	0.917	0.806	3.116	3
0.271 ⁺ _{-0.004}	0.107	0.930	0.822	3.032	3
0.330 ⁺ _{-0.010}	0.109	1.024	0.914	2.724	3
0.348 ⁺ _{-0.001}	0.113	1.089	0.974	2.793	3
0.365 ⁺ _{-0.004}	0.114	1.115	1.000	2.740	2
0.556 ⁺ _{-0.038}	0.180	1.143	0.963	1.738	3
0.638 ⁺ _{-0.015}	0.181	1.105	0.924	1.449	3
0.682 ⁺ _{-0.017}	0.149	1.009	0.859	1.268	3
0.778 ⁺ _{-0.016}	0.165	0.957	0.792	1.016	3
0.807 ⁺ _{-0.009}	0.153	0.954	0.800	0.991	3
0.887 ⁺ _{-0.057}	0.184	1.110	0.924	1.043	3
1.007 ⁺ _{-0.039}	0.200	1.131	0.930	0.924	3
1.093 ⁺ _{-0.008}	0.207	1.194	0.987	0.904	3
1.245 ⁺ _{-0.017}	0.235	1.188	0.951	0.765	3
0.932 ⁺ _{-0.012}	0.274	1.227	0.953	1.023	3
1.033 ⁺ _{-0.046}	0.311	1.211	0.899	0.871	3
1.219 ⁺ _{-0.035}	0.271	1.234	0.962	0.789	3
1.298 ⁺ _{-0.014}	0.310	1.257	0.947	0.729	3
1.332 ⁺ _{-0.012}	0.298	1.163	0.864	0.649	3
1.428 ⁺ _{-0.030}	0.291	1.155	0.963	0.607	3
1.528 ⁺ _{-0.052}	0.343	1.294	0.950	0.626	3
1.623 ⁺ _{-0.011}	0.309	1.182	0.877	0.540	3
1.696 ⁺ _{-0.051}	0.321	1.163	0.842	0.496	3
2.116 ⁺ _{-0.012}	0.322	1.258	0.935	0.442	3