



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFECTOS HEMATOLOGICOS DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis*



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA

GERMAN PEREZ PLASCENCIA

ENSENADA, B.C.

OCTUBRE DE 1991

RESUMEN

La fracción cruda conteniendo el principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*, se aplicó a conejos de prueba para observar los efectos producidos en sus componentes sanguíneos.

Para asegurar la bioactividad del principio activo, se realizó un bioensayo sobre peces de prueba *Girella nigricans*, para los que resultó letal el compuesto aplicado.

Se midieron los niveles de glucosa, hemoglobina, colesterol y proteínas totales en sangre junto con recuento de eritrocitos y leucocitos en conejos Nueva Zelanda, mismos a los que se les aplicó el principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Los resultados obtenidos se compararon contra los valores medios sin tratamiento de dichos conejos, encontrándose diferencias apreciables solo en el recuento de eritrocitos con una disminución del $26 \pm 2.3\%$, sin presentar estados patológicos y con recuperación al final del tratamiento. Se propone la hemólisis como causa del decremento de eritrocitos.

**EFFECTOS HEMATOLOGICOS DEL PRINCIPIO ACTIVO
DEL PEPINO DE MAR *Stichopus parvimenis***

TESIS

QUE PRESENTA:

GERMAN PEREZ PLASCENCIA


APROBADA POR:

PRESIDENTE DEL JURADO



Q.F.B. GRACIELA GUERRA RIVAS

SINODAL PROPIETARIO



DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ

SINODAL PROPIETARIO



OC. JUAN A. FERNANDEZ APANGO

SINODAL SUPLENTE



OC. EUGENIO CARPIZO ITUARTE

SINODAL SUPLENTE



M.C. HECTOR BUSTOS SERRANO

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California", gracias al apoyo de la Dirección General de Investigación Científica y superación Académica de la Secretaría de Educación Pública por medio del convenio # 8484.

D E D I C A T O R I A

A mi padre y amigo

Dr. Germán Pérez Anaya, quien nunca me ha enseñado como vivir; sino que él, al ir viviendo, me ha permitido observarle. Porque de él yo soy total hechura.

A mi madre y amiga

Raquel Plascencia de P., el sol de nuestro hogar. Una mujer maravillosa.

A Raquel y Gerardo, por la gran fortuna de tener unos hermanos como ellos.

A Laura Verónica, con quien escribí algunas de estas líneas.

A la maestra Graciela, por la enseñanza sincera, la dedicación excepcional que imprime a su labor y la gran calidad humana que posee.

AGRADECIMIENTOS

Aunque la lista es larga, quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado más de cerca durante estos años.

A la Q.F.B. Graciela Guerra Rivas, por el apoyo y la oportunidad que me ha brindado para aprender un poco más.

A los miembros del proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de las especies marinas de las costas de Baja California", y en especial a el alma del mismo: Ana María.

A mis sinodales, cuyos acertados comentarios enriquecieron este pequeño trabajo.

Al "Club de Gimnasia de Ensenada", por hacerme sentir parte de esa gran familia gimnástica...ahí y por la computadora.

A mi tía Marcela y a su familia, que siempre me brindaron su apoyo incondicional.

A la Sra. Mary y a su familia, por la suerte de haber llegado a su hogar.

Y a todos aquellos buenos compañeros que siempre me preguntaron "para cuando".

INDICE

	Pág.
1.0. INTRODUCCION	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Antecedentes	4
1.3. Descripción de la especie	8
2.0. OBJETIVO	10
3.0. METODOLOGIA	11
3.1. Area de colecta	11
3.1. Captura de <i>Stichopus parvimensis</i> y obtención del principio activo	11
3.3. Prueba de bioactividad	13
3.4. Bioensayo en conejos..	14
3.5. Seguimiento del estado de salud	15
3.6. Tratamiento de datos	15
4.0. RESULTADOS	17
5.0. DISCUSIONES	27
5.1. Efecto sobre peces	27
5.2. Efecto sobre conejos	28
6.0. CONCLUSIONES	37
7.0. BIBLIOGRAFIA	38

INDICE DE TABLAS

Tabla I.- Bioensayo con peces para seguimiento de toxicidad	19
Tabla II.- Constituyentes sanguíneos obtenidos de conejos sin tratamiento.	22
Tabla III.- Valores de Anova anidada para grupos muestrales distintos	24
Tabla IV.- Recuento de eritrocitos después de la aplicación de los compuestos de prueba	25
Tabla V.- Recuento de eritrocitos durante los bioensayos con tratamiento.	26

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.- a) Ciclopentanoperhidrofenantreno.
b) digitoxina. c) digoxina. 2**
- Fig. 2.- Localización del área de colecta. 12**
- Fig. 3.- Distribución de frecuencias para
el recuento de células sanguíneas
en conejos Nueva Zelanda sin tratamiento. 20**
- Fig. 4.- Distribución de frecuencias para
los valores sin tratamiento de la
química sanguínea de conejos Nueva Zelanda. 21**
- Fig. 5.- Efecto de los compuestos de prueba
sobre el recuento de eritrocitos. 23**

1.0.- INTRODUCCION

1.1.- GENERALIDADES

La Farmacología Marina -estudio y utilización de drogas de origen marino- es un campo relativamente nuevo. Sin embargo, los organismos marinos y/o sus materiales han sido usados desde tiempos antiguos para curar o aligerar varios padecimientos, que van desde dolores estomacales hasta enfermedades menos comunes (Martín y Padilla, 1973).

En las últimas décadas, se han aislado una gran cantidad de drogas útiles a partir de plantas y animales terrestres. Aunque es imposible recopilar una lista completa, estas drogas incluyen analgésicos, antibióticos, anticoagulantes, agentes antileucémicos, agentes cardioactivos, enzimas, hormonas, narcóticos y vitaminas (Martín y Padilla, 1973). Formando parte de los agentes cardioactivos se encuentran los llamados glucósidos cardiotónicos, sustancias que permiten realizar al corazón ineficiente el mismo trabajo con menor consumo de oxígeno, aumentando su eficiencia mecánica (efecto inotrópico positivo). El cardiotónico más importante es el que se encuentra en la planta llamada Digital; por lo anterior también se les denomina glucósidos cardiotónicos, principios cardioactivos o digitálicos (Litter, 1972). Dentro de su estructura existe un esqueleto central formado por tres ciclohexanos y un ciclopentano, conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 1), unido a una cadena

lateral formada por algunos monosacáridos (Domínguez, 1973). Como ejemplos de digitálicos de uso en farmacia están la digitoxina y la digoxina (Fig. 1).

En todas las preparaciones de digitálicos se encuentran compuestos denominados saponinas (Kuschinsky y Lüllman, 1973),

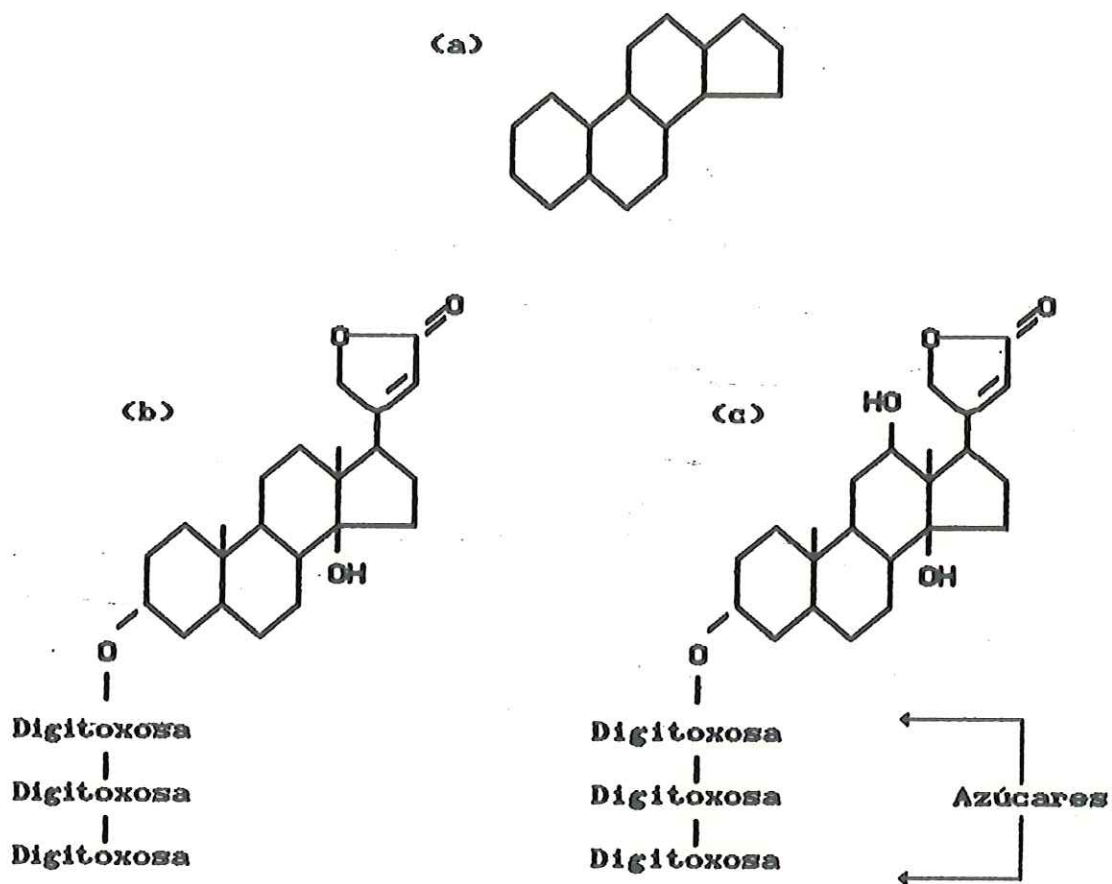


Fig. 1.- a) ciclopentanoperhidrofenantreno. b) digitoxina
c) digoxina

formados por esteroides y azúcares o triterpenoides, que están ampliamente distribuidos en plantas pero en animales terrestres son poco comunes (Hashimoto, 1979). Dentro de los compuestos de origen marino son de particular importancia las saponinas producidas por los llamados pepinos de mar. Estos organismos, pertenecientes al phylum Echinodermata y clase Holothuroidea (parientes cercanos de erizos y estrellas marinas) tienen una característica muy especial: algunas especies como *Actinopyga agassizi* y *Holothuria difficilis* descargan unos filamentos muy delgados y de consistencia pegajosa cuando son perturbados. Estos filamentos están normalmente asociados al tronco del árbol respiratorio cerca del ano, y son los llamados órganos de Cuvier, que poseen características tóxicas, y la detección de su toxicidad dió origen al estudio de las secreciones de los pepinos de mar. Sin embargo, se ha encontrado que todas las partes del cuerpo de un pepino contienen saponinas y muchas especies muy tóxicas no contienen los túbulos de Cuvier, como son *Holothuria atra* y *Stichopus japonicus*, y más aún, muchas especies están reportadas como no tóxicas (Scheuer, 1983).

Las toxinas aisladas de las paredes del cuerpo y de los órganos de Cuvier en los pepinos de mar, consisten en una mezcla de glicósidos esteroidales. Estos materiales son solubles en agua y en soluciones de etanol, estables al calor y generalmente no dializables (Baslow, 1977).

Ya que la clase Holoturoidea invariablemente contiene saponinas (Hashimoto, 1979), los pepinos de mar constituyen una fuente potencial de recursos para la obtención de nuevos componentes; sustancias que puedan utilizarse para la curación, mitigación o prevención de las enfermedades y padecimientos del hombre u otros animales.

Aunque la pesquería del pepino de mar es aún a pequeña escala (Caddy, 1989), se puede pensar en un aprovechamiento integral en el que se destine una parte hacia la búsqueda de fármacos y la otra a complementos de tipo alimenticio.

1.2.- ANTECEDENTES

El primer reporte sobre la naturaleza de las secreciones de los pepinos de mar data de 1880: Cooper observó que ciertas especies pueden descargar de sus cavidades viscerales, filamentos que producen inflamaciones dolorosas al contacto con la piel humana (Halstead, 1967). A partir de estas observaciones iniciales, las secreciones de pepino de mar despertaron el interés de otros investigadores:

Yamanouchi (1955), usando extractos en agua de mar de las paredes corporales de *Holothuria vagabunda*, detectó letalidad en peces marinos. Philips et al. (1956) (citado por Halstead, 1967) indicaron que la vía de entrada del tóxico fueron las branquias y propusieron que la acción de estos extractos sobre las paredes de las membranas celulares puede

ser la principal causa de muerte en vertebrados envenenados. Posteriormente, Jakowska et al. (1958) encontraron que la saponina esteroidal aislada de *Actinopyga agassizi* producía cambios hematológicos. Ruggieri y Nigrelli (1960) probaron los extractos crudos de *A. agassizi* en larvas de equinodermo, encontrando deformaciones durante el desarrollo embrionario de éstas, así como letalidad en ratones e inhibición de crecimiento en protozoarios. Nigrelli y Jakowska (1960) reportaron que los extractos de pepino de mar suprimían el crecimiento de las raíces aéreas en berros, y causaban necrosis en raíces de cebolla. Compararon además las propiedades hemolíticas de la holoturina con soluciones estándar de saponina comercial en eritrocitos de conejo, lo cual reveló una potencia para la holoturina diez veces mayor que el producto comercial.

Marderosian (1969) encontró que las secreciones de estos organismos muestran una amplia variedad de efectos sobre sistemas biológicos. Entre éstos se incluye: toxicidad en animales como crustáceos, anémonas marinas, gusanos de tierra, moluscos, peces y mamíferos, además de propiedades hemolíticas, efectos citotóxicos y neuromusculares y acción antitumoral.

Lasley y Nigrelli (1971) encontraron para extractos acuosos y compuestos químicos aislados de *A. agassizi*, un efecto significativo en la tasa de movimiento ameboideo de

leucocitos, lo que se manifiesta en una estimulación de la migración de éstos en concentraciones relativamente bajas, y una inhibición de su movimiento a altas concentraciones. Descubrieron también que estos extractos causan un cierto porcentaje de desintegración de las células blancas, decremento en conteos celulares y alteración en la viabilidad celular, propiedades neurotóxicas, actividad antitumoral (capaz de suprimir el crecimiento del Sarcoma-180 y de tumores Krebs-2 en ratones), así como efectos en las células sanguíneas de *Rana pipiens*. Pocsidio (1983) mencionó que los extractos de *Holothuria pulla*, *H. fuscocinerea*, *Actinopyga lecanora* y *Opheodesoma grisea* son capaces de romper las membranas de los eritrocitos humanos.

Marderosian (1969) mencionó que de unas 1100 especies existentes en la clase Holothuroidea, por lo menos 30 especies se han reportado como tóxicas. Hashimoto (1979) enlista entre los holoturoideos más estudiados con presencia de toxicidad a los siguientes:

Actinopyga agassizi

Actinopyga mauritania

Holoturia atra

Holoturia cubana

Holoturia edulis

Holoturia mexicana

Holoturia vagabunda

Morris et al. (1980) mencionaron que pruebas en peces sometidos a extractos de *Stichopus parvimensis* mostraron que ni la pared corporal ni las víceras de este pepino marino contenían materiales tóxicos.

Un efecto interesante del principio activo de los pepinos de mar es la inhibición que ocasionan a la adenosintrifosfatasa dependiente de sodio y potasio (Gorshkov et al., 1982), ya que esta enzima está relacionada con el efecto cardiotónico de los glucósidos digitálicos. Usabiaga del Moral (1990) reportó que la fracción cruda de *S. parvimensis* presentó inhibición enzimática sobre la bomba de Na^+ , K^+ -ATPasa. Cuando la acción de los digitálicos ocurre, la adenosintrifosfatasa es inhibida de manera concomitante (Goodman y Gilman, 1978), por lo que la inhibición de esta enzima causada por el principio activo del pepino de mar puede ser un indicio del potencial terapéutico de tales organismos. Para el caso de *Stichopus parvimensis* no existe ningún reporte de los efectos que sus secreciones ocasionan a un vertebrado superior, y más específicamente, sobre su sistema cardiovascular.

En estudios preliminares llevados al cabo en la Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), se ha encontrado un efecto inotrópico positivo en el corazón perfundido de la almeja pismo *Tivela stultorum* sometido a extractos de *S. parvimensis*

(Guerra-Rivas, comunicación personal), pero considerando que una de las vías más comunes de aplicación para la prueba de éstos compuestos es la intravenosa, es importante saber los posibles efectos en el vehículo encargado de transportar a dichos compuestos a través del organismo hacia sus sitios de acción, es decir, la sangre.

Si bien se ha revisado el efecto que extractos de algunos holotúridos causan a células blancas y rojas (Lasley y Nigrelli, 1971; Pocsidio, 1983), no se han reportado estudios de los efectos sobre otros parámetros que conforman la química sanguínea. Estos resultados preliminares han sugerido la necesidad de conocer más a fondo el comportamiento y propiedades de estos compuestos al ser aplicados por una vía rápida a un organismo vivo.

Este trabajo pretende observar la interacción en los elementos sanguíneos de organismos bajo la acción del principio activo de *Stichopus parvitemsis*.

1.3.- DESCRIPCION DE LA ESPECIE.

El cuerpo de los pepinos de mar es alargado, sin brazos, pero con una serie de tentáculos que rodean la región bucal. El tracto intestinal es elongado terminando en el ano. Algunos tienen pequeños "pies" tubulares o papilas que rodean el cuerpo. El poder de regeneración de sus víceras es grande, y va de 10 días a dos meses. Son animales de vida libre, con

sexos separados aunque algunos son hermafroditas. Son cosmopolitas en su distribución y se encuentran desde aguas someras hasta grandes profundidades, con alimentación consistente en material bentónico, plancton y detrito. Aunque los pepinos de mar no son muy usados por los peces como alimento, son un importante recurso alimenticio para el hombre en la región Indo-Pacífica, donde son vendidos bajo el nombre de "Trepang" o "bêche-de-mer" (Halstead, 1967).

Stichopus (Parastichopus) parvimensis alcanza hasta 25 cm de longitud y está cubierto con pequeñas carnosidades punteadas. La coloración del cuerpo varía de naranja amarillo a café rojizo. La boca está rodeada por tentáculos retráctiles que son pies tubulares modificados para la alimentación. El cuerpo es suave y blando, pero al manipularse se engruesan, se ponen rígidos y evisceran. Los órganos perdidos son regenerados en uno o dos meses. Habita entre las rocas desde la zona de marea baja hasta el fondo de los mantos algales. En bahías se encuentra sobre el lodo, arena y sobre los pastos marinos. Su distribución va desde Monterey, California, E.U.A. hasta Baja California, México (Brandom y Rokop, 1985).

2.0.- OBJETIVO

Determinar los efectos hematológicos del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis* en conejos Nueva Zelanda.

3.0.- METODOLOGIA

3.1.- AREA DE COLECTA

Los organismos se colectaron en la zona de Punta Banda conocida como "El Zeppelin", la cual está formada por un cordón montañoso que se encuentra a 31°45'N, 116°45'W, al sur de la Bahía Todos Santos, B.C. (Fig.2) (Secretaría de Marina, 1974). La zona es de acantilados con playa rocosa de mediana energía en el lugar de colecta de los organismos.

3.2.- CAPTURA DE *Stichopus parvimensis* Y OBTENCION DEL PRINCIPIO ACTIVO A PARTIR DE SUS SECRECIONES.

En la captura se usó buceo autónomo; los organismos se colectaron entre los 3 y 8 metros de profundidad, se depositaron en jabs y se transportaron a la playa. Fueron pesados y enjuagados para ser colocados en bidones con agua destilada, dejándolos a extracción durante aproximadamente 4 horas, sacándolos antes de la evisceración (los organismos se retornaron a su medio). Los fluidos corporales se llevaron al laboratorio para su posterior tratamiento.

El extracto obtenido fue filtrado, ajustado su pH a 4 y se le añadió NaCl (50g por litro de extracto). Posteriormente se extrajo con butanol (1:1). La fase butanólica se concentró mediante destilación a presión reducida con un rotavaporador

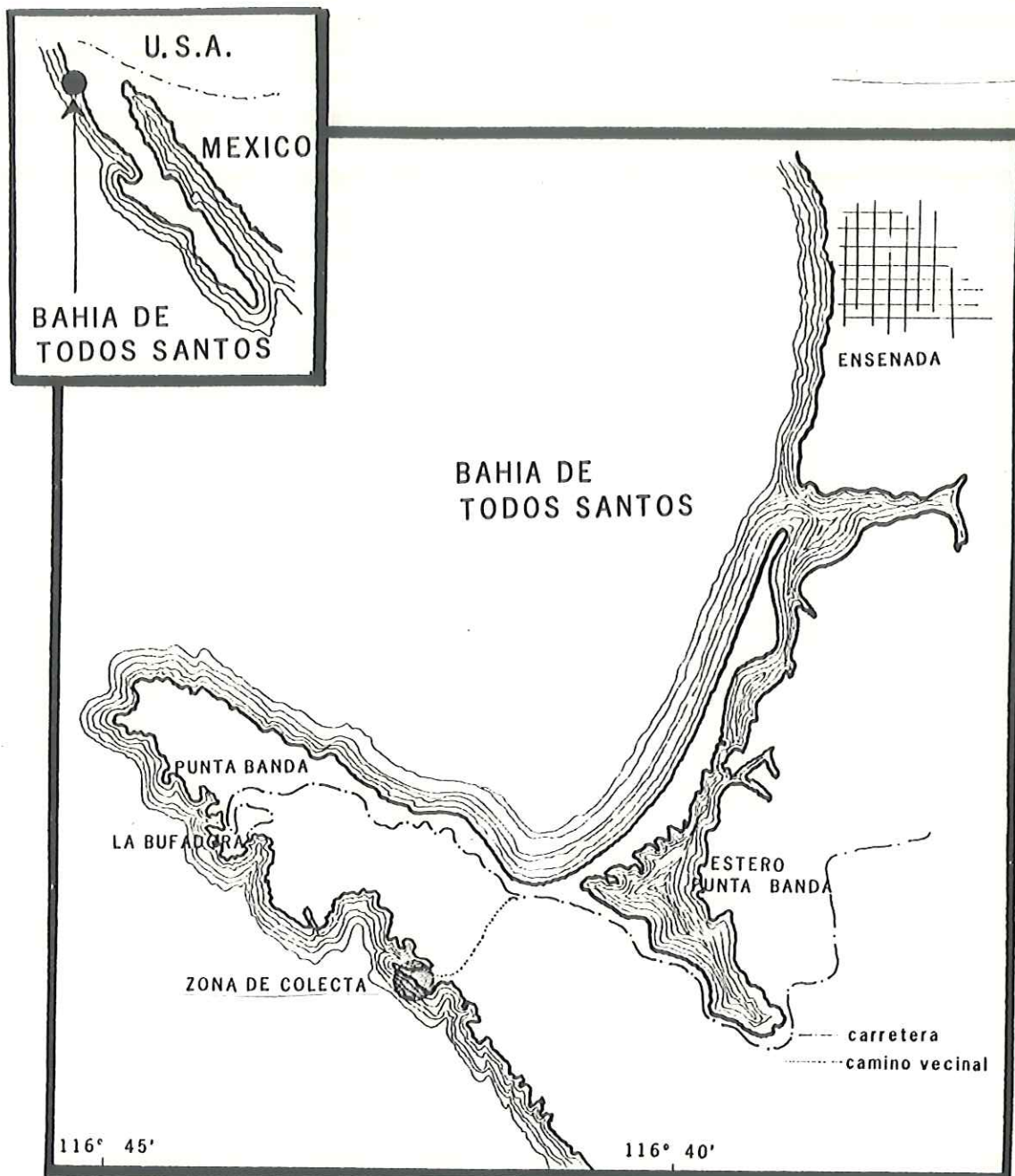


FIG. 2 LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA
 (Tomado de Ifiguez-Martínez, 1990)

YAMATO RE-51 con baño de agua a temperatura controlada YAMATO BM-51 a 40°C, del que se obtuvo un polvo de color blanco cremoso, el cual fué lavado 3 veces con acetona y posteriormente con benceno (ApSimon et al. 1972). Seco el polvo, se etiquetó como "fracción cruda" y estuvo listo para su utilización. Se probaron también en este ensayo dos compuestos (F1 y F2) purificados por Ifiguez Martinez (1990) a partir del polvo que contiene el principio activo, aplicando el mismo método.

3.3.- PRUEBA DE BIOACTIVIDAD

El extracto crudo acuoso con el principio activo del pepino de mar, se probó en peces intermareales *Girella nigricans* (chopa gris) para comprobar su toxicidad. Se usaron 3 peces (por separado) de 4 cm de longitud. En 1 l de agua de mar, con aereación y agitación suave; se añadieron 0.5 ml del extracto concentrado cada 5 minutos, registrando el comportamiento de los peces hasta su deceso. La fracción cruda de *S. parvimensis* se probó en otras 3 chopas (6 cm). Estas se colocaron en 500 ml de agua de mar con aereación y agitación suave. El polvo se disolvió en agua de mar (1.25%), y se agregaron 0.5 ml del extracto cada 5 minutos. Ambos bioensayos se llevaron a cabo contra un control, con las mismas características pero sin la aplicación de los compuestos de prueba.

3.4.- BIOENSAYO EN CONEJOS

Se utilizaron un total de 16 conejos Nueva Zelanda producto de dos camadas obtenidas con los mismos padres. Una vez destetados se les alimentó diariamente la misma ración y a la misma hora con concentrados comerciales (esto siguió hasta finalizar todos los experimentos). A partir de los 3-4 meses de edad, se comenzó con el análisis de sus valores sanguíneos en condiciones normales. La sangre se obtuvo por medio de una pequeña incisión en la vena de la oreja, colectándose en un vasito de plástico que contenía fluoruro de sodio como anticoagulante (10 mg NaFl/ml de sangre)(Lynch et al., 1984). Se estudiaron un par de conejos diariamente, cada ensayo se realizó por triplicado, hasta obtener un registro individual de los parámetros analizados para cada conejo. El número de observaciones para cada conejo fueron variables, con un máximo de 8 observaciones para cada parámetro.

Posteriormente, se aplicaron por vía intravenosa los compuestos de prueba. Como testigo de prueba se utilizó digoxina en forma de preparado comercial (ampolleta inyectable de 2ml con 0.5 mg de digoxina), que se administró a tres conejos con monitoreo de su estado de salud antes de cada aplicación. El testigo se aplicó durante 6 a 7 días consecutivos, con dosis fijas diarias de 0.0625 mg y a la

misma hora para cada conejo. Después de esto, la fracción cruda de *S. parvimensis* se aplicó en dosis individuales de 0.15 mg (dosis para infantes, DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS, 1981) a 3 conejos durante 6 a 7 días; el compuesto F1 se aplicó a 3 conejos en dosis individuales de 0.005 mg y el compuesto F2 se aplicó a 2 conejos con 0.005 mg a cada uno (F1 y F2 en solución preparada por Ifigüez-Martínez, 1990). En todos los casos se realizó un monitoreo del estado de salud de cada individuo (cuantificación de parámetros sanguíneos) antes de cada aplicación. Tanto la toma de muestra como la aplicación de la dosis se realizaron con los organismos en ayuno.

3.5.- SEGUIMIENTO DEL ESTADO DE SALUD

Además de la observación diaria del comportamiento de los animales, se cuantificaron los siguientes parámetros sanguíneos:

Glucosa (Método de Somogyi-Nelson, Lynch et al., 1984).

Hemoglobina (Método de Drabkin, Lynch et al., 1984).

Colesterol (Método de Lieberman-Burchard, Rendina, 1974).

Proteínas Totales (Método de Biuret, Rendina, 1974).

Recuento de eritrocitos (Lynch et al., 1984).

Recuento de leucocitos (Lynch et al., 1984).

3.6.- TRATAMIENTO DE DATOS

Para asegurar que los parámetros sanguíneos obtenidos

antes de la aplicación de los compuestos de prueba fueran normales, se aplicó la prueba ji-cuadrada (para curvas con forma monticular) (Mendenhall, 1982). Debido al tratamiento aplicado a los organismos de prueba se realizó un análisis Anova anidado para tamaños muestrales distintos (Sokal y Rohlf, 1969). Para evaluar el efecto ocasionado por cada tratamiento se aplicó la prueba t de student (para $n < 30$) a cada grupo de resultados. En cada caso se comparó el valor promedio de cada parámetro estudiado en los organismos de prueba sin tratamiento, con el valor promedio del máximo efecto observado durante el tratamiento (efecto máximo).

4.0.- RESULTADOS

La prueba de bioactividad mostró, para el extracto acuoso, letalidad en peces *Girella nigricans* hacia los 26 ± 3 minutos, mientras que para la fracción cruda en polvo, hacia los 14 ± 1.5 minutos. El comportamiento registrado se muestra en la Tabla I, el cual fue similar en los dos bioensayos excepto en el tiempo de muerte.

La distribución de frecuencias para los parámetros bioquímicos analizados antes del tratamiento se muestran en las figuras 3-4. El tratamiento de estos valores para determinar su normalidad, mostró, para un 90% de confianza, que no existieron diferencias significativas entre los valores medios de los parámetros sanguíneos de cada conejo (de acuerdo al estadístico de prueba ji-cuadrado). Estos valores se muestran en la Tabla II. El análisis Anova anidado aplicado a los tratamientos no mostró diferencias significativas entre los grupos y los subgrupos de los organismos de prueba (Tabla III). Después de la aplicación del testigo, la fracción cruda y los compuestos aislados de la fracción cruda, se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo para el recuento de eritrocitos respecto a su recuento sin tratamiento, de acuerdo a los valores obtenidos para la prueba t-Student (tabla IV) con una disminución del 25% aproximadamente.

El testigo usado (digoxina) ocasionó un decremento de eritrocitos del $24.9 \pm 3\%$ (Tabla IV). La fracción cruda de *S. parvimensis* mostró un comportamiento análogo al del testigo, con un decremento de eritrocitos del $26 \pm 2.3\%$ (Tabla IV). En cuanto a los efectos de los compuestos F1 y F2 obtenidos del principio activo de *S. parvimensis* por Irigüez-Martínez (1990), se observó para F1 un efecto paralelo al de la fracción cruda, causando un decremento del $22.7 \pm 1.4\%$, mientras que F2, a la misma concentración, mostró escasa interacción con el organismo. La diferencia entre el valor medio de eritrocitos sin tratamiento, y el valor medio del efecto al aplicar los compuestos de prueba se presenta en la figura 5. Para todos los casos, los valores diarios obtenidos durante la aplicación de los compuestos de prueba se muestran en la tabla IV. Los organismos de prueba nunca mostraron comportamientos irregulares, ni síntomas de estado patológico.

El análisis estadístico aplicado a los efectos ocasionados por los compuestos de prueba sobre el recuento de eritrocitos, mostró para la fracción cruda y el compuesto F1 diferencias a un nivel de significancia del 95%.

TABLA I · **BIOENSAYO CON PECES *Girella nigricans***
PARA SEGUIMIENTO DE TOXICIDAD

TIEMPO DESPUES DE LA ADICION (minutos)		SINTOMAS
Extracto Acuoso	Fracción Gruda	
5	8	Nado rápido y agitado, con tendencia a subir a la superficie. Estrés que se aprecia en la aleta dorsal erizada.
10	5	Se van al fondo y se mantienen alestargados. La aleta dorsal sigue erizada.
15	10	Siguen en el fondo abriendo y cerrando la boca con frecuencia. La aleta dorsal abajo
20	12	Comienzan a abrir el apérculo con "tos" cada 10-15 segundos.
25	15	Disminuye frecuencia opercular, pérdida de equilibrio, cambio de coloración en la piel de gris a negro. Muerte.

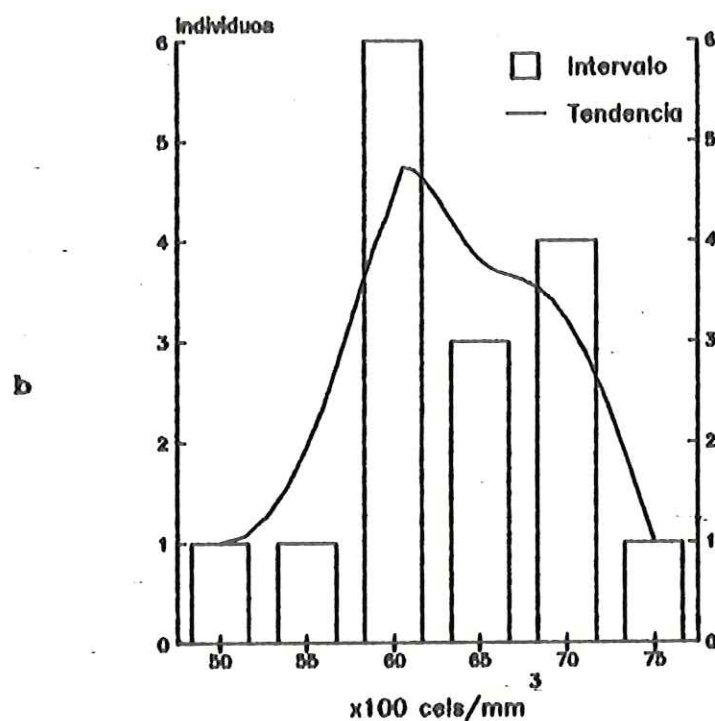
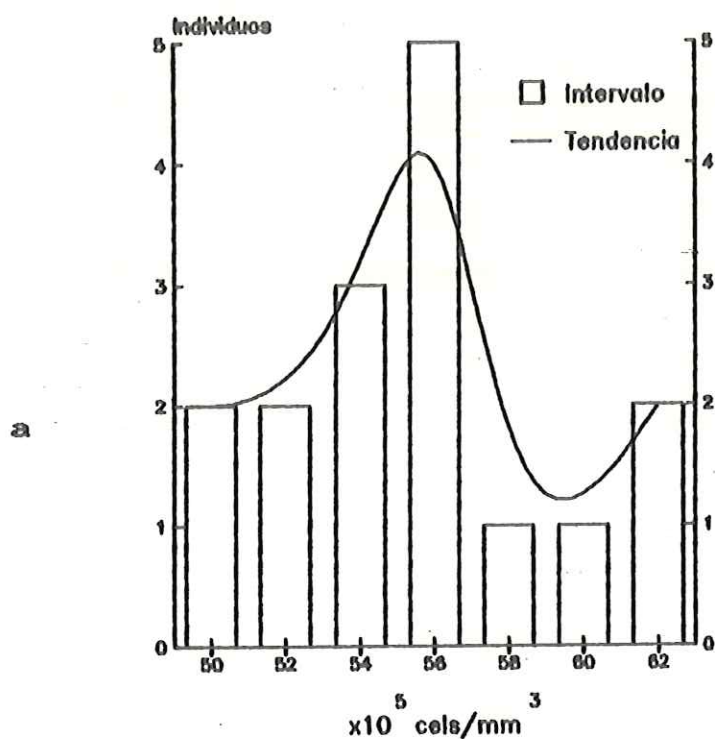


Fig. 3.- Distribución de frecuencias para el recuento de células sanguíneas en conejos Nueva Zelanda sin tratamiento. a) eritrocitos. b) leucocitos. Se usaron un total de 16 individuos. El valor de cada animal representa el promedio de 8 determinaciones.

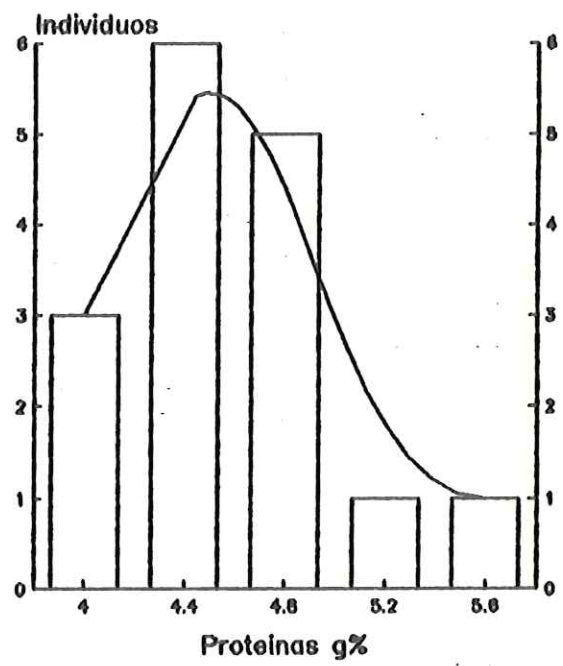
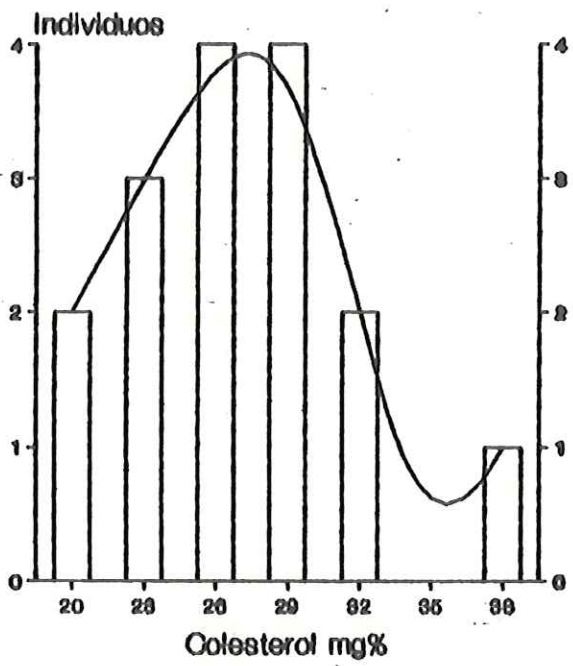
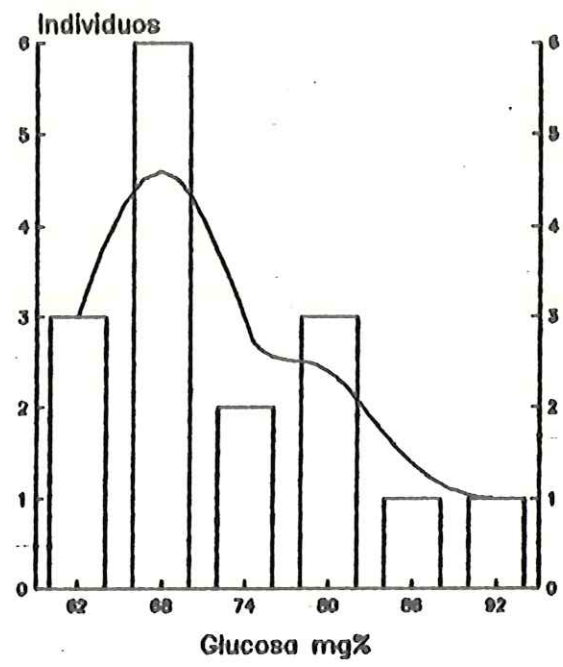
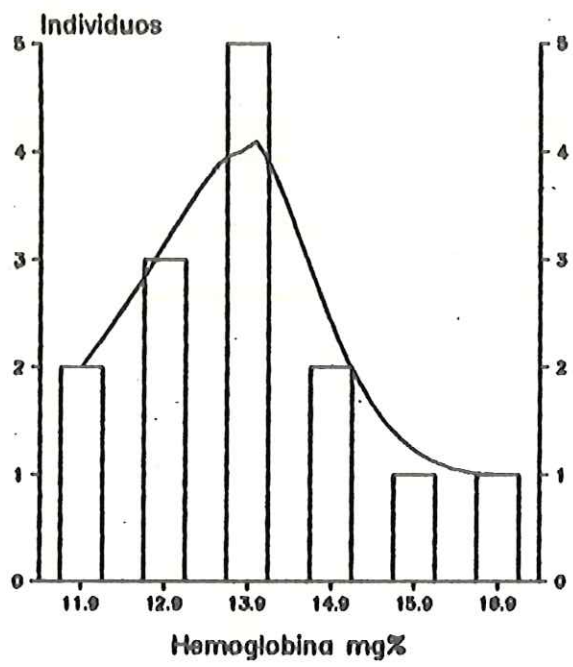


Fig. 4.- Distribución de frecuencias de los valores sin tratamiento de la química sanguínea de conejos Nueva Zelanda.

TABLA II

CONSTITUYENTES SANGUINEOS OBTENIDOS
DE CONEJOS EN CONDICIONES NORMALES

CONSTITUYENTE	MEDIA	±	σ
GLUCOSA (mg%)	70	±	7.4
HEMOGLOBINA (g%)	19.5	±	1.2
COLESTEROL (mg%)	26	±	4.5
PROTEINAS (mg%)	4.5	±	.49
ERITROCITOS $\times 10^5$ cels/mm ³	55	±	9.4
LEUCOCITOS $\times 10^9$ cels/mm ³	6.5	±	.68

n = 16

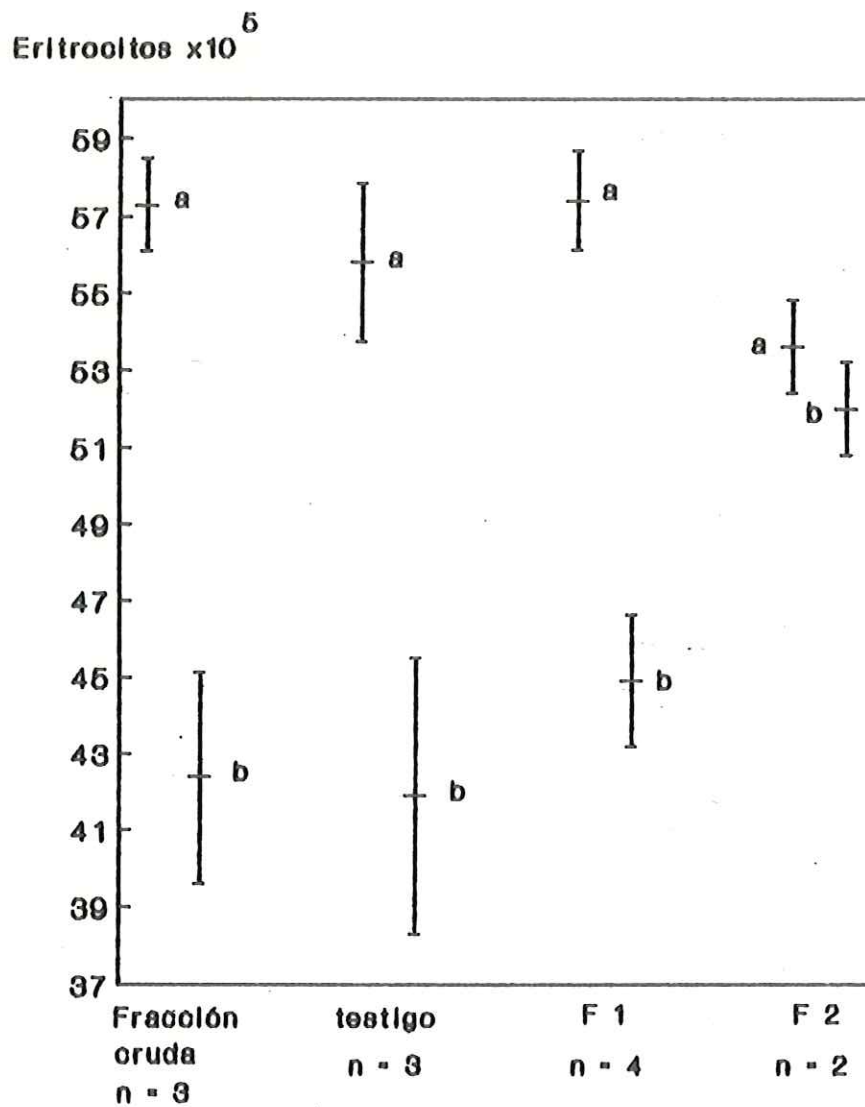


Fig. 5.- Recuento de eritrocitos con aplicación de los compuestos de prueba. a) valor medio sin efecto. b) valor medio de máximo efecto.

TABLA III VALORES DE ANOVA ANIDADA PARA TAMAÑOS DE GRUPOS MUESTRALES DISTINTOS

FUENTE DE VARIACION	g. l.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_t	F_{α}
				$\alpha = 0.05$	
ENTRE GRUPOS	9	2050.8	689.4	4.95	0.826
ENTRE SUBGRUPOS	7	5788.2	826.8	2.17	2.055
DENTRO DE SUBGRUPOS	<u>62</u>	<u>20117.9</u>	402.8		
TOTAL	74	27956.6			

g. l. = grados de libertad

F_t = F teórica

F_{α} = F estimada

TABLA IV RECUENTO DE ERITROCITOS DE CONEJO DESPUES DE LA APLICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO DE *S. parvimensis*

DOSIS PARA CADA ANIMAL DE PRUEBA	CRS $\times 10^5$		ERROR STANDARD DE LA MEDIA		t-Student	
	MEDIA NORMAL	MAXIMO EFECTO	NORMAL	EFECTO	T	E
PRINCIPIO ACTIVO 0.15 mg	57.8 ± 1.68	42.4 ± 3.88 n=8	± 1.19	± 2.74	4.908 $\alpha = 0.05$	6.207
TESTIGO (DIGOXINA) 0.0625 mg	55.8 ± 2.98	41.9 ± 5.08 n=8	± 2.07	± 3.59	1.880 $\alpha = 0.1$	2.860
FRACCION 1 0.005 mg	57.4 ± 2.22	44.9 ± 3.00 n=4	± 1.28	± 1.73	4.908 $\alpha = 0.05$	4.520
FRACCION 2 0.005 mg	59.6 ± 1.20	52.0 ± 2.80 n=2	± 1.20	± 2.80	4.908 $\alpha = 0.05$	1.000

CRS = CELULAS ROJAS SANGUINEAS

T = TEORICA

E = ESTIMADA

Tabla V RECUENTO DE ERITROCITOS ($\times 10^5$ cels/mm³) DE CONEJO Y APLICACION DE COMPUESTOS DE PRUEBA DURANTE LOS BIOENSAYOS

Conejo	Día											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	55 ‡	-- ‡	58	-- ‡	-- ‡	-- ‡	37	-- ‡	-- ‡	57	52	
2	54 ‡	-- ‡	55 ‡	-- ‡	-- ‡	-- ‡	--	46	59	69	59	
3	57	59	58 ‡	-- ‡	62 ‡	-- ‡	54 ‡	-- ‡	48 ‡	45	55	56
4	54	54	-- □	50 □	-- □	-- □	47 □	-- □	-- □	52	55	
5	57 □	57 □	-- □	-- □	-- □	46 □	57	58	58			
6	59	57	61 □	-- □	59 □	-- □	50 □	-- □	46 □	45	57	58
7	51	-- ⊖	-- ⊖	-- ⊖	-- ⊖	54 ⊖	54 ⊖	48	59	50		
8	55	56 ⊖	-- ⊖	52 ⊖	-- ⊖	-- ⊖	56 ⊖	58				
9	58	-- ∞	-- ∞	-- ∞	-- ∞	48 ∞	51 ∞	51	54			
10	58 ∞	-- ∞	54 ∞	-- ∞	-- ∞	36 ∞	46 ∞	49	56	57		
11	57	60	61 ∞	-- ∞	62 ∞	-- ∞	50 ∞	-- ∞	41 ∞	42	57	59

‡ Fracción cruda .15 mg

□ Fracción 1 .005 mg

⊖ Fracción 2 .005 mg

∞ Digoxina .06 mg

-- No se realizó

el análisis

5.0.- DISCUSIONES

5.1.- EFECTO SOBRE PECES.

Una parte fundamental en el estudio de todo compuesto con potencial farmacológico, es la verificación de su presencia en las diferentes etapas de la extracción y purificación; por esta razón se realizó un bioensayo para observar el efecto del extracto acuoso y de una fracción cruda (butanólica) sobre *G. nigricans*. Morris (1980) menciona que pruebas en peces mostraron que ni las paredes corporales ni las víceras de *Stichopus parvimensis* contienen materiales tóxicos. Sin embargo, se presentó una interacción muy clara tanto en el extracto original, como en la fracción cruda obtenida del mismo (Tabla I), además con una marcada diferencia en el tiempo de muerte, siendo menor para los peces sometidos a la fracción cruda.

Este resultado puede dar a entender que la fracción cruda ganó actividad, lo que resultaría lógico si consideramos que esta fracción está más libre de impurezas dado que pasó por mayor número de tratamientos.

Sin embargo, hay que considerar que existen factores ajenos al compuesto de prueba que también pueden tener efecto en el resultado final. Rand y Petrocelli (1985) mencionan que los animales jóvenes son más sensibles al estrés producido por el manejo, lo cual puede disminuir la resistencia a los

tóxicos. Además no hay que olvidar que la purificación del compuesto ha sido parcial, y al aplicar una concentración conocida de éste, están incluidas impurezas que podrían ocasionar otros efectos, incluyendo alguna reacción antagónica. Sin embargo, Yamanouchi (1955) preparó extractos acuosos de *Holothuria vagabunda*, y los encontró tóxicos para *Girella punctata*, que murió al final como resultado de una parálisis muscular completa. Por otro lado, Ifigüez-Martínez (1990) menciona hemólisis en la región branquial de *G. nigricans* sometida a extractos de *S. parvimensis*. En su conjunto, el comportamiento observado en el cribado de bioactividad para las secreciones de *S. parvimensis* sobre *G. nigricans* por Ifigüez-Martínez (1990), es similar a los síntomas que se presentan en la Tabla I. Esto nos da un indicio de la actividad que sobre sistemas biológicos posee el principio activo de *S. parvimensis*, además de que viene a refutar lo mencionado por Morris (1980) respecto a este pepino marino.

5.2.- EFECTO SOBRE CONEJOS.

Como punto de partida en todo bioensayo, necesitamos conocer las características de los organismos de prueba en condiciones normales. A pesar de que los organismos de prueba se criaron bajo las mismas condiciones experimentales, con la

misma alimentación y cuidados en general, e incluso la toma de muestra se realizó a una hora fija, se notaron pequeñas diferencias en los parámetros hematológicos de todo el grupo, e incluso en un mismo individuo de un día para otro. Sin embargo, estas diferencias fueron despreciables ya que siempre se mantuvieron alrededor de los valores medios reportados para conejos de esta especie. El análisis estadístico aplicado a los conjuntos de datos antes del tratamiento no muestra significancia en la variación. Esto mismo fue notado por Casey et al. (1934), lo que representa una gran confianza en los valores normales obtenidos. Schermer (1967) (citado por Weisbroth et al., 1974) menciona falta de concordancia referente a las variaciones rítmicas de leucocitos para conejos de esta especie. Fox y Laird (1970) revelan no sólo variaciones diurnas en leucocitos, sino también en otros componentes celulares, incluida la hemoglobina. Además las dosis medias de efecto son muy variables, dependiendo de la edad, el peso, el sexo, la susceptibilidad a la droga, alimentación e incluso condiciones ambientales así como para individuos de una misma progenie (Litter, 1972).

La figura 5 muestra el comportamiento del recuento de los glóbulos rojos al aplicar los compuestos de prueba. Con excepción de F2, tanto el testigo como la fracción cruda y F1

muestran un efecto similar entre sí, con una marcada disminución respecto a sus medias sin aplicación. Dado que la desviación estándar de cada valor medio no se traslapa con aquella del valor medio de máximo efecto, tenemos una diferencia significativa entre estos dos valores. Si comparamos con F2, vemos que ambos intervalos se traslapan, por lo que podemos considerar que F2 no ocasionó cambios significativos al recuento de eritrocitos. Además, al aplicar el estadístico de prueba t-Student, encontramos que efectivamente, sólo F2 cae dentro del valor crítico (tabla IV), lo que nos indica que sus dos valores medios (media normal y máximo efecto) son iguales. En cambio, el valor de t para cada uno de los otros casos cae fuera del valor crítico esperado, lo que coincide con lo observado. Sin embargo, es importante notar que esta disminución no rebasa los límites considerados como normales para conejos de esta especie. Aunque hay discrepancia en el rango considerado como normal, algunos autores reportan rangos que van de 30 a 80 $\times 10^5$ cels/mm³. Si observamos en la figura 5 cada valor de máximo efecto, vemos que ninguno de éstos se encuentra por debajo de este rango.

Por otra parte, si seguimos los días de aplicación de cada compuesto (tabla V), se aprecia que en todos los casos hay tendencia a la recuperación y en algunos casos incluso

antes de terminar con la aplicación. Sobre esto, Litter (1972) menciona, respecto a la tasa de desaparición de las drogas, que la cantidad que desaparece del organismo -por biotransformación y excreción- en 24 horas, es una fracción de la dosis administrada, lo que se debe a su fijación en el organismo y a su lenta excreción, todo lo cual condiciona la persistencia de la acción de una dosis.

La acumulación de las drogas en el organismo tiende a ser un proceso autolimitador cuando se administra una dosis fija diaria, aunque es variable para cada individuo. Al principio, con poca cantidad de droga presente en el organismo, la eliminación es también muy pequeña, pues permite la acumulación -el nivel de actividad crece- pero luego, habiendo mayor cantidad en el organismo, la velocidad de disipación de la droga es mayor, y permite la administración de la misma dosis sin acumulación -nivel estable de actividad- (Litter, 1972). Además, la inmensa mayoría de las drogas con acciones útiles producen efectos temporales, y una vez eliminadas del organismo, el tejido vuelve a su actividad normal (Kuschinsky y Lüllman, 1973).

Kuschinsky y Lüllman (Ibid) mencionan que la digoxina -usada como testigo en este bioensayo- se metaboliza poco en el organismo -menos del 10%- y se excreta principalmente en la orina y también en las heces, casi toda en forma de

digoxina no modificada; la excreción es rápida y casi completa en 8 días. Su vida media es de 40 horas aproximadamente. En la tabla V se aprecia el máximo efecto de la acción entre el quinto y sexto día de aplicación. Goodman y Gilman (1978) mencionan que, en lo que a efecto cardíaco se refiere, la digoxina alcanza su máximo de actividad hacia las 4-6 horas. Si consideramos que la fracción de digoxina que desaparece del organismo es de un 25% por día, y que se distribuye por casi todos los tejidos del organismo, incluyendo los glóbulos rojos, el músculo esquelético y el corazón (Goodman y Gilman, 1978), su fijación al plasma sanguíneo durante el tiempo de permanencia en el organismo puede estar contribuyendo a esta disminución de glóbulos rojos.

Dado que los preparados de drogas como la digoxina contienen saponinas, que no poseen acción terapéutica alguna, pero que muestran gran actividad de superficie, como irritación en los tejidos y hemólisis (Kuschinsky y Lüllman, 1973), ésta puede ser la causa de la disminución de glóbulos rojos, hasta que, hacia el último día, la aplicación diaria se vuelva un proceso autolimitador. Esto se puede extrapolar al efecto causado por la fracción cruda y la fracción F1, dado que la existencia de saponinas en la primera y el carácter de saponina en la segunda es probable,

puesto que durante los primeros pasos de su método de extracción, se presenta abundante espuma (característica de las saponinas).

Es claro que, aunque las concentraciones de prueba no fueron iguales, tanto el principio activo como el testigo y el componente F1 causaron efectos muy parecidos. El hecho de que ambos hayan tenido el mismo efecto con dosis menores respecto a la fracción cruda, puede deberse a que el testigo se administró en forma de preparado comercial, mientras que la fracción cruda no fué purificada exhaustivamente ni cristalizada, lo que podría limitar su efecto al entrar a la sangre. Si la fracción cruda se fijara a las proteínas plasmáticas, la existencia de impurezas podría ocasionar un efecto antagónico bloqueando o interfiriendo de alguna manera en la posible acción hemolítica del principio activo sobre los eritrocitos.

Aunque Usabiaga—del Moral (1990) menciona que el principio activo de *S. parvimensis* ocasionó una disminución significativa en las proteínas de la membrana de eritrocitos de conejo, es importante remarcar aquí que para la cuantificación de proteínas en este trabajo se utilizó sangre entera, y no se notó ningún cambio en los valores de proteínas. Por lo tanto el resultado de Usabiaga—del Moral (1990) parece estar directamente relacionado con la actividad

su contenido en libertad (De Robertis et al., 1975). Dado que los glucósidos digitálicos se distribuyen por casi todo el organismo, incluyendo los glóbulos rojos, el músculo esquelético y el corazón (Goodman y Gilman, 1978), cabe suponer que esto ocurra para los posibles glucósidos contenidos en el principio activo de *S. parvimensis*, teniendo efecto sobre las membranas de los eritrocitos.

Suponiendo que el motivo que ocasiona la disminución de los eritrocitos fuera hemólisis, el mínimo valor registrado para el efecto producido por el principio activo y la fracción F1 no rebasa los límites considerados como normales, que pudiera hacer caer a los organismos en un estado patológico (anemia por ejemplo). Vemos que la desviación estándar obtenida para los valores medios normales de los organismos de prueba incluye casi todas las observaciones -más del 95% para $x \pm 2\sigma$ -. Esto nos asegura que el estado de salud de los organismos se encuentra dentro de lo normal una vez terminado el tratamiento.

Para los digitálicos en general, los diversos autores no conceden mucha importancia a los efectos que estos pudiesen producir al sistema vascular, y en particular a los componentes sanguíneos. Esto concuerda con los resultados obtenidos para el testigo, y muestra el porqué la fracción cruda de *S. parvimensis* presentó escasa interacción con los

parámetros analizados, sin ocasionar alteración alguna que fuera de consideración a los organismos.

Para concluir, considerando todos los resultados del presente trabajo, es claro que existió interacción entre los sistemas biológicos y la fracción cruda aislada de *S. parvimensis*, y el compuesto F1 aislado de dicha fracción, lo que significa la presencia de compuestos bioactivos en las secreciones de este pepino marino.

Estos hallazgos junto con lo obtenido por Usabiaga-del Moral (1990) e Iñiguez-Martínez (1990), así como los estudios preliminares sobre la inotropía positiva en la almeja pismo *Tivela stultorum*, llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Marinas de la U.A.B.C., abren una nueva alternativa para considerar a *S. parvimensis* como un recurso potencial farmacológicamente explotable.

6.0.- CONCLUSIONES

⇒ Tanto el extracto acuoso como la fracción cruda obtenidos de *Stichopus parvimensis* presentaron bioactividad con peces de prueba *Girella nigricans*.

⇒ De los parámetros sanguíneos analizados en conejos Nueva Zelanda bajo el efecto del principio activo aislado del pepino de mar *Stichopus parvimensis*, sólo se observaron efectos apreciables en el recuento de eritrocitos, con un decremento del $26 \pm 2.3\%$ a una dosis de 0.15 mg.

⇒ Aunque se presentó interacción entre la fracción cruda y los organismos de prueba (reflejada en el decremento de eritrocitos), estos no mostraron ningún estado patológico.

⇒ De los compuestos F1 y F2 aislados de la fracción cruda, F1 causó efectos paralelos a dicha fracción, con una dosis de 0.005 mg con un $22.7 \pm 1.4\%$, mientras que F2, a la misma dosis, no causó efectos apreciables.

⇒ En todos los organismos de prueba se recuperó el nivel normal de eritrocitos al final de cada tratamiento, y en algunos casos aún antes de terminado éste.

⇒ Se propone la hemólisis como causa del decremento de eritrocitos.

7.0.- BIBLIOGRAFIA

- ApSimon *et al.*, 1972. MARINE ORGANIC CHEMISTRY. ISOLATION OF 3 β ,6 α -DEHIDROXI 5 β -PREGN-9(11)-EN-20ONE FROM THE SAPONINS OF THE STARFISH *Asteria forbesi*. Food drugs from the sea. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp 139-146
- Baslow, M. H., Ph. D. 1977. MARINE PHARMACOLOGY. A STUDY OF TOXINS AND OTHER BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF MARINE ORIGIN. Robert E. Krieger Pub Co. N.Y. pp 328.
- Brandon, J. L. y F. J. Rokop, 1985. LIFE BEETWEN THE TIDES. Am.Pub.Co. San Diego Ca. pp 258.
- Caddy, J.F. 1989. MARINE INVERTEBRATE FISHERIES: THEIR ASSESSMENT AND MANAGEMENT. J. Wiley & Sons. U.S.A. pp 752.
- Casey, A. E., Rosahn, P. D. and Pearce, L. 1934. HEREDITARY VARIATIONS IN THE BLOOD CITOLOGY OF NORMAL RABBITS. *Science* 79, pp. 189-190.
- De Robertis E. D. P., F. A. Saez and E. M. F. De Robertis, 1975. CELL BIOLOGY. Sixth edition. W.B. Saunders Co. U.S.A. pp 615.
- DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS. 1981. Rosenstein E. (Ed.). Ediciones P.L.M. pp 1316.

- Domínguez, X. A., 1973. METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA. Primera Edición. Ed. Limusa. México. pp 281.
- Fox, R. R. and Laird, C. W. 1970. DIURNAL VARIATIONS IN RABBITS: HEMATOLOGICAL PARAMETERS. *Amer. J. Physiol.* 218. pp. 1609-1621.
- Goodman, L. S. y A. Gilman, 1978. BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. Quinta Edición. Ed. Iberoamericana. México, D.F. pp 1412.
- Gorshkov, B.A., I.A. Goskova, V.A. Stonik and G.B. Elyakov, 1982. EFFECT OF MARINE GLYCOSIDES ON ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY. Toxicol. Vol. 20 No. 3 pp 655-658.
- Halstead, B. W. 1967. POISONOUS AND VENOMOUS MARINE ANIMALS OF THE WORLD. U.S. Government Printing Office. Vol. II Washington, D.C. pp 1070.
- Hashimoto, Y. 1979. MARINE TOXINS AND OTHER BIOACTIVE MARINE METABOLITES. Japan Sc. Soc. Press. Japan. pp 369.
- Iñiguez-Martínez, A.M., 1990. AISLAMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C. México.
- Jakowska, S; Nigrelli, R. F.; Murray, P. M. and Veltry, A.M. 1958. HEMOPOIETIC EFFECTS OF HOLOTHURIN, A STEROID SAPONIN FROM THE SEA CUCUMBER *A. agassizi* in *Rana pipiens*. *Anat. Rec.* pp 132, 459.

- Kuschinsky, G. y H.L. Lüllman, 1973. **MANUAL DE FARMACOLOGIA.** Editorial Marín, S.A. 2da ed. España. pp 387.
- Lasley, B. J. y R. F. Nigrelli, 1971. **THE EFFECT OF HOLOTHURIN ON LEUCOCITE MIGRATION.** *Zoologica* 56:1-7
- Litter, M. 1972. **FARMACOLOGIA.** Editorial El Ateneo. Cuarta ed. España. pp 1883.
- Lynch, M.J., S.S. Raphael, L.D. Mellor, P.D. Spare and J.H. Inwood, 1984. **METODOS DE LABORATORIO.** Segunda ed. Interamericana. México, D.F. pp 1522.
- Marderosian, A. D. 1969. **MARINE PHARMACEUTICALS.** *Journal of Pharmaceutical Sciences.* Vol. 58 No. 1 (17) January. pp 19-52.
- Martin, D. F. y G. M. Padilla, 1973. **MARINE PHARMACOGNOSY.** Acad. Press. N.Y. U.S.A. pp 317.
- Mendenhall, W. 1982. **INTRODUCCION A LA PROBABILIDAD Y A LA ESTADISTICA.** Wadsworth Internacional/Iberoamericana Belmont, California. U.S.A. pp 628.
- Morris, H.R., D.P. Abbott and E.C. Haderlie, 1980. **INTERTIDAL INVERTEBRATES OF CALIFORNIA.** Stanford University Press. Stanford, California. U.S.A. pp 690.
- Nigrelli, F.R. and S. Jakowska, 1960 **EFFECTS OF HOLOTHURIN, A STEROID SAPONIN FROM THE BAHAMIAN SEA CUCUMBER (*Actinopyga agassizi*) ON VARIOUS BIOLOGICAL SYSTEMS.** Ann. N.Y. Aca. Sci. Vol. 90 pp 844.

- Pearce, L. and Casey, A. E. 1930. STUDIES IN BLOOD CYTOLOGY OF THE RABBIT. BLOOD COUNTS IN NORMAL RABBITS. *J. Exp. Med.* 51. pp 83-97.
- Pocsidio, G. 1983. HOLOTHURIN OF SOME PHILIPPINE HOLOTHURIANS AND ITS HEMOLITIC ACTIVITY. *The Philippine Journal of Science*. Vol. 112 No 1-2 Jan-June. pp 19-26.
- Rand, M. G. and S. R. Petrocelli, 1985. FUNDAMENTAL OF AQUATIC TOXICOLOGY: METHODS AND APLICATIONS. Hemisphere Publishing Corporation, New York. pp 659.
- Rendina, G. Ph. D. 1974. EXPERIMENTAL METHODS IN MODERN BIOCHEMISTRY. Saunders Co. Philadelphia, Pa. U.S.A pp 333.
- Ruggieri, G. D. and R. F. Nigrelli 1960. THE EFFECT OF HOLOTHURIN A STEROID SAPONIN FROM THE SEA CUCUMBER, ON THE DEVELOPMENT OF SEA URCHIN. *Zool. Acta* 45:1-16
- Scheuer, P.J. 1983. MARINE NATURAL PRODUCTS: CHEMICAL AND BIOLOGICAL PERSPECTIVES. Vol V. Acad. Press. N.Y. pp. 297-379.
- Secretaría de Marina, 1974. ESTUDIO GEOGRAFICO DE LA REGION DE ENSENADA, B.C. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. México, D.F.
- Sokal, R.R. and F.J. Roholf, 1969. BIOMETRY. Second edition. W. H. Freeman and Co. New York, U.S.A. pp 859.

- Usabiaga-Del Moral, A. 1990. EFECTOS DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis* SOBRE LA BOMBA $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPasa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C.
- Yamanouchi, T. 1955. ON THE POISONOUS SUBSTANCE CONTAINED IN HOLOTHURIANS. Publications of the Seto marine Laboratory. Vol. IV. Kyoto University, Japan. pp 183-203.
- Weisbroth, S.H., R.E. Flatt and A.L. Krauss. 1974. THE BIOLOGY OF THE LABORATORY RABBIT. Academic Press. New York, N.Y. 1974 pp 50-72.