

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA**
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"EFECTO DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR
Stichopus parvimensis SOBRE LA BOMBA Na^+ - K^+ -ATPasa"



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA
ARTURO USABIAGA DEL MORAL

Ensenada, B.C., Mayo de 1990

RESUMEN:

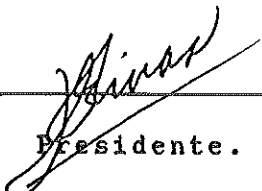
La enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ de la membrana de eritrocitos de conejo, se colocó en presencia del principio activo del pepino de mar Stichopus parvimensis. La enzima experimentó una inhibición en la producción de fósforo inorgánico de hasta un $33 \pm 2\%$ en presencia del principio activo. Por otra parte las proteínas donde se cuantificó el efecto del principio activo experimentaron una disminución significativa respecto a las proteínas donde no se añadió el principio activo.

"EFECTO DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR Stichopus
parvimensis SOBRE LA BOMBA $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ "

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

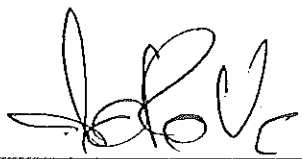
ARTURO USABIAGA DEL MORAL.

APROBADA POR:



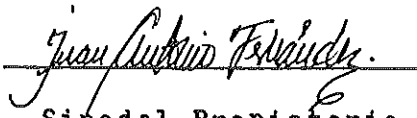
Presidente.

Q.F.B. Graciela Guerra Rivas.



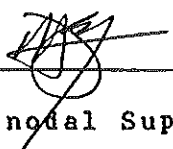
Sinodal Propietario.

Dr. Jorge de la Rosa
Velez.



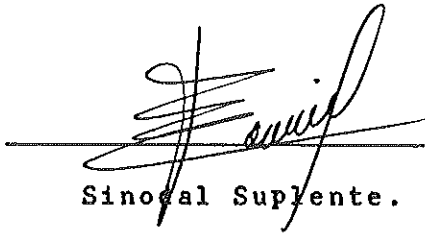
Sinodal Propietario.

Oc. Juan A. Fernández
Apango.



Sinodal Suplente.

Oc. Héctor Bustos Serrano.



Sinodal Suplente.

Quim. Irma E. Soria
Mercado.

El presente trabajo se llevo a cabo dentro del convenio # 8410 de la Secretaría de Educación Publica (SEP), con el proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de las especies marinas de las costas de B.C." perteneciente a la Facultad de Ciencias Marinas, de la U.A.B.C.

POR QUE ESTOY AQUI PARA APRENDER A ESPERAR
POR QUE ESTOY AQUI PARA APRENDER A AMAR

POR QUE DESPUES DE TODO, TIEMPO Y AMOR ES
LO UNICO QUE PUEDO DEJAR.

D E D I C A T O R I A .

- > A "EL" QUE ME A DADO TODO POR SER TODO.

- > AL CALA Y MARIQUITA, por que es un padre bien padre y una madre a toda madre; por caminar conmigo, apoyarme, aconsejarme, finan\$iarne y no cambiarme.

- > AL CHORRO, LA RANA, EL CANCAS Y LA BRUJA, que ademas de hermanos, amigos y compa\$eros, han compartido mis loqueras y por que simplemente los amo.

- > A JORGE Y BIBIANA, por ser hermanos.

- > A MI CHAPARRITA MARY LOLI, por aceptarme como soy, por haber llegado cuando m\$as necesitaba, por que ahora todo es luz. Simplemente por ser TU.
AAAAH.....por tu paciencia.

- > A LA ñora PINEDA Y FAMILIA, por hacerme de la familia.

- > A MIS AMIGOS Y AMIGAS, por que si ellos no soy nada.

A G R A D E C I M I E N T O S .

> A la Facultad de Ciencias Marinas que siempre ha apoyado económica y moralmente al proyecto y a esta tesis

> A Mauricio (viejito) por el cafecito, la computadora, los consejos, simplemente por ser un muy buen amigo.

> A Graciela, por brindarme su amistad y conocimientos.

> A los miembros del CASTILLO DE LA PUREZA: Ana María, Carmen, Marc y los Germanes, por su amistad y compartir tantos momentos juntos dentro y fuera del laboratorio.

> A todas las personas que de una u otra manera ayudaron a que "POR FIN TERMINARA".

INDICE:

Introducción.....	pág.	1.
Antecedentes.....	pág.	7.
Objetivo.....	pág.	10.
Materiales y Métodos.....	pág.	11.
Descripción del área de colecta.....	pág.	11.
Captura de los organismos y obtención del principio activo.....	pág.	11.
Obtención de la enzima.....	pág.	13.
Ensayo enzimático.....	pág.	14.
Cuantificación de fósforo inorgánico....	pág.	16.
Cuantificación de proteínas.....	pág.	16.
Selección del rango de actividad de la enzima.....	pág.	17.
Tratamiento de datos.....	pág.	18.
Resultados.....	pág.	18.
Discusiones.....	pág.	25.
Conclusiones.....	pág.	37.
Recomendaciones.....	pág.	38.
Bibliografía.....	pág.	39.

INDICE DE TABLAS:

- Tabla I.- Comportamiento de la producción de fósforo inorgánico (Pi) por hora (en $\mu\text{g Pi/h}$) para la enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$, de acuerdo al aumento de proteínas con su respectiva desviación estándar de las muestras analizadas.....pág. 20.
- Tabla II.- Porcentaje de inhibición de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ por efecto del principio activo del pepino de mar Stichopus parvimensis...pág. 20.
- Tabla III.- Comportamiento de las proteínas durante el ensayo enzimático.....pág. 23.
- Tabla IV.- Valores Z de la actividad y proteínas del ensayo enzimático.....pág. 24.

INDICE DE FIGURAS:

- Figura 1.- Ciclopentanoperhidrofenantreno.....pág. 5.
- Figura 2.- Localización de la zona de colecta....pág. 12.
- Figura 3.- Comportamiento de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$
según el aumento de proteínas.....pág. 19.
- Figura 4.- Comportamiento de las proteínas presentes
en el ensayo enzimático, con y sin efecto
del principio activo del pepino de mar
Stichopus parvimensis.....pág. 22.

INTRODUCCION:

Muchos poetas han escrito sobre el papel del corazón en la vida sentimental de las personas, considerándolo como el órgano fundamental. Aunque se hable metafóricamente puesto que no se conoce el órgano que detecte los sentimientos, biológicamente esto es cierto, ya que el corazón es el encargado de llevar oxígeno y otros metabolitos a todas las células del cuerpo por medio del bombeo sanguíneo (Ville, 1981).

Dentro de los diferentes procesos que se relacionan con el transporte sanguíneo, nos enfocaremos a un sistema en especial de bombeo, el sistema de la sodio-potasio adenosintrifosfatasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$). Este se encuentra formando parte del proceso denominado transporte activo, que se lleva a cabo en casi todas las células del organismo. El transporte funciona mediante un gradiente de concentraciones de la membrana celular, transportando glucosa y otros azúcares, aminoácidos y los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana. De éstos, el de mayor importancia es el de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, ya que es el más común en las células (Lehninger, 1980) y el transporte de los otros se encuentran íntimamente ligados a él (Dahl y Hoxin, 1974).

Algunas características generales de esta enzima son:

a) Su función consiste en utilizar el ATP existente para transportar el sodio al exterior de la

membrana mientras que el potasio es llevado al interior, asegurándose de esta manera su presencia en la membrana. Esto es debido a que el K^+ se encuentra en menor cantidad en los fluidos del cuerpo que el Na^+ . El K^+ es necesario para algunos procesos de biosíntesis de proteínas, actividad de algunas enzimas y el mantenimiento del potencial de membrana de los tejidos excitables, que está relacionado con el gradiente de las concentraciones del sodio y potasio en la membrana.

b) La $Na^+-K^+-ATPasa$ es una proteína dimérica consistente en una unidad alfa con 100 000 daltones (Da) y una unidad beta con 55 000 Da de masa. Las unidades alfa contienen el sitio de hidrólisis del ATP (ATP forma adenosindifosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi)), mientras que la unidad beta son glicoproteínas con aproximadamente 20% de masa de carbohidrato. Su función no está realmente clara, pero existe una estrecha asociación con las unidades alfa, y la disociación ocurre sólo cuando se lleva a cabo la pérdida irreversible de la actividad de la ATPasa (Cantley, 1986).

c) Utiliza solamente ATP para llevar a cabo el transporte; otros generadores de energía como el guanidosintrifosfato (GTP), Inosintrifosfato (ITP) y el uridintrifosfato (UTP), no pueden ser utilizados por la enzima para el transporte del Na^+ y K^+ (Skou, 1965).

d) La enzima en presencia de glucósidos cardíacos es inhibida en el transporte de Na^+ y K^+ .

El primer estudio sobre el transporte del Na^+ y K^+ en la membrana lo realizó Skou (1957) en Dinamarca con un homogenizado de cangrejo. Encontró que la actividad máxima de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ la obtuvo al agregar Na^+ , K^+ y Mg^{++} , en presencia de adenosintrifosfato (ATP); lo interesante fué que otras enzimas que son dependientes de K^+ son inhibidas por el Na^+ y viceversa. Sin embargo, el hecho que llamo más su atención fué que al colocar la enzima en presencia de la Ouabaina, que es un glucósido cardíaco o digitálico, la enzima se inhibía en el transporte del Na^+ y el K^+ (Lehninger, 1980).

A partir del descubrimiento de Skou, son numerosos los estudios que se han realizado para tratar de comprender el efecto de los glucósidos cardíacos sobre la ATPasa. Como el de Akera (1971) y el de Repke et al. (1984), quienes analizaron la interacción entre los glucósidos cardíacos y la ATPasa; Akera et al. en 1985 observaron el efecto del ion K^+ entre la enzima y los glucósidos cardiotónicos; Yoda y Yoda en 1974, quienes trataron de establecer las relaciones estructura-actividad entre los esteroides cardíacos en la inhibición de la enzima.

El estudio más amplio sobre la ATPasa se ha llevado a cabo en membranas de eritrocitos, donde se ha encontrado que se transportan tres moles de sodio al exterior de la membrana por dos moles de potasio al interior, por cada mol de ATP hidrolizado (Post, 1961; Glunn, 1962; en Bonting y Carvaggio, 1963; Stryer, 1976; Lehninger, 1980). Por otra parte, se han realizado estudios sobre la ATPasa encontrada en tejido de rata (Aldridge, 1962; Hess, 1962; Skou, 1962; en Gibbs et al., 1965), en pulmón de conejillo de indias, cerebro de res (Deul, 1961; Schwartz, 1962; en Gibbs et al., 1965) y en diferentes tejidos de conejo (Nakao et al., 1965). Estos dejaron ver que la ATPasa de cualquier tejido requería Na^+ y K^+ y eran inhibidas por glucósidos cardíacos (Bonting y Carvaggio, 1963; Stryer, 1976; Lehninger, 1980; Gorshkov et al., 1982).

Existen muchos otros estudios de la acción de los glucósidos en la enzima reforzando así su papel como digitálico. Sin embargo, es probable que exista más de un mecanismo relacionado con la acción del digitálico sobre la inhibición de la enzima (Repke y Schonfeld, 1984) señalando de esta manera la complejidad del efecto.

Los glucósidos cardiotónicos o digitálicos derivan su nombre de la acción que ejercen sobre el corazón (Domínguez, 1973), alterando la excitabilidad del músculo, función que depende del equilibrio de Na^+ y K^+ en la

membrana (Lehninger, 1980). Goodman y Gilman (1978) señalan que existe una relación directa entre la fuerza de contracción del corazón (efecto inotrópico) y la inhibición de la ATPasa por el glucósido, por lo que se observa una mayor eficiencia en el trabajo del músculo cardíaco al efectuarse la inhibición (Fullerton, 1980; tomado de Doerge, 1982).

Los glucósidos han sido utilizados desde hace aproximadamente 1500 años A.C., como veneno por los africanos, como diurético, emético, en el tratamiento de muelas y padecimientos cardíacos. Los egipcios y chinos realizaban extractos de plantas y animales que los contienen con fines similares (Goodman y Gilman, 1978; Fullerton, 1980; de Doerge, 1982).

Los glucósidos cardiotónicos poseen como estructura fundamental el ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig.-1), lo que los relaciona con los esteroides, saponinas y sapogeninas por ser parte fundamental también de ellos (Domínguez, 1973).

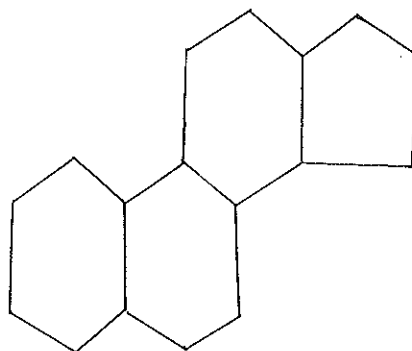


Fig 1: Ciclopentanoperhidrofenantreno.

A pesar de que los digitálicos son el fármaco más utilizado para el tratamiento de paros cardíacos, su rango terapéutico es muy pequeño, siendo en ocasiones muy arriesgado su empleo. Por esta razón es necesario encontrar nuevos compuestos que permitan ampliar el rango terapéutico (Repke y Schonfeld, 1984).

Para esta búsqueda se utiliza la quimiotaxonomía, la cual basa su estudio en la existencia de sustancia semejantes dentro de organismos del mismo taxón (Domínguez, 1973), por lo que es posible encontrar sustancias muy semejantes en "parientes" cercanos. Debido a que las especies terrestres han sido investigadas ampliamente (Domínguez, 1973), se debe expandir la investigación a especies marinas que puedan tener la posibilidad de explotación farmacológica comercial. Basándonos en el hecho de que las adaptaciones bioquímicas para los organismos marinos son diferentes a las de los organismos terrestres (Hochachka y Somero, 1984), se pueden llegar a encontrar sustancias en los organismos marinos, que logren ampliar el rango terapéutico conocido para las sustancias de especies terrestres.

ANTECEDENTES:

En el medio ambiente marino se ha demostrado la existencia de esteroides y saponinas, principalmente en las familias holoturoidea y asteroidea, teniendo sus representantes en los pepinos de mar (de los cuales se extrae la holoturina) y en las estrellas de mar (donde se encuentran las asterosaponinas).

Estas sustancias han despertado un gran interés debido a que se les han encontrado diferentes propiedades, como su poder hemolítico (Yamanouchi, 1955; Hashimoto y Yasumoto, 1960; Owelln et al., 1973; en Sheuer, 1983), actividad como fungicida (Ruggieri y Nigrelli, 1974; de Baslow, 1977), actividad antitumoral e interrupción en la transmisión de impulsos en el sistema nervioso (Friess y Standert, 1960; Rio, 1965) efecto en la reproducción y crecimiento del plancton y organismos marinos (Nigrelli y Jokowska, 1960; Baslow, 1977; Hashimoto, 1979) entre otros efectos farmacológicos.

Tanto las holoturinas como las asterosaponinas poseen como esqueleto el ciclopentanoperhidrofenantreno al igual que los glucósidos cardiotónicos y las saponinas; sin embargo, varía en la composición de los monosacáridos que componen la cadena lateral (Domínguez, 1973).

Baslow (1977) reporta un listado de especies de asteroideos en los cuales se han encontrado sustancias

tóxicas de este tipo. Las más importantes son:

Aphelesteris japonica

Asterias forbesi

Asterias rubens

Henricia sanguinolenta

Pycnopodia helianthoides

Hashimoto (1979) menciona entre los holoturoideos más estudiados con presencia de holoturina:

Actinopyga agassizi

Actinopyga mauritiana

Holoturia astra

Holoturia cubana

Holoturia edulis

Holoturia gracilis

Holoturia mexicana

Holoturia vagabunda

Estos compuestos poseen la característica de romper la tensión superficial produciendo espuma (las saponinas deben su nombre a esta propiedad : Sapon = jabón) por lo que su presencia dentro de un extracto es apreciada fácilmente (Domínguez, 1973).

Gorshkov et al. (1982) relacionaron la posible acción de las sustancias encontradas en los pepinos y estrellas de mar con los glucósidos cardiotónicos. Estos investigadores realizaron experimentos sobre la actividad

de la ATPasa extraída de la corteza de cerebro de rata en presencia de holoturinas y asterosaponinas, encontraron que el grado de inhibición está relacionado con la estructura total del glucósido así como de su concentración. Observaron que la parte fundamental de la estructura, la aglicona, es la que realiza la principal acción inhibitoria. Por otra parte, hacen notar que si existen en la estructura grupos polares o monosacáridos (cadena lateral) no afectan significativamente la inhibición de la enzima; mientras que la ausencia de un grupo sulfato en la molécula ayuda a una mayor inhibición. Así mismo resaltan que la ATPasa es más sensible a la acción de los glucósidos triterpénicos de la holoturina y menos sensible a los glucósidos esteroidales de las asterosaponinas.

A lo largo de la Península de Baja California existen varias especies de estrellas y pepinos de mar. En particular, dentro y fuera de la Bahía de Todos Santos B.C., se encuentra en abundancia el pepino de mar Stichopus parvimensis. Basándonos en los estudios de Gorshkov et al. (1982), existe la posibilidad que dentro de este pepino se encuentren sustancias con características semejantes a la de los glucósidos de otros pepinos. De ser así, se le puede considerar con posibilidades de explotación comercial farmacológica, sobre todo si esta sustancia llega a

poseer características semejantes a la de los glucósidos de otros pepinos sobre la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$.

OBJETIVO:

Medir el efecto del principio activo del extracto obtenido del pepino de mar Stichopus parvimensis, sobre la actividad de la bomba $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{ATPasa}$.

MATERIALES Y METODOS:

DESCRIPCION DEL AREA DE COLECTA :

Se realizó la colecta en el Ejido Arbolitos, localizado en la parte sur de Punta Banda, la cual está formada por un cordón montañoso localizado entre los meridianos $116^{\circ} 45'$ y $116^{\circ} 40' W$ y los paralelos $31^{\circ} 41'$ y $31^{\circ} 45' N$, al sur de la Bahía de Todos Santos Baja California Norte, México. (Fig.-2) (Secretaría de Marina, 1974). La zona es de acantilados con playa rocosa, teniendo principalmente alta energía en el lugar de colecta de los organismos. Estos se distribuyen entre los 3 y 8 metros de profundidad, y su sustrato es arenoso.

CAPTURA DE LOS ORGANISMOS Y OBTENCION DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Los organismos fueron capturados por buceo autónomo, colectándolos mediante una jaba y transportándolos a la playa. Fueron pesados y enjuagados para ser colocados en bidones con agua destilada, dejándolos a extracción durante aproximadamente cuatro horas y sacándolos antes de la evisceración de acuerdo al método de Apsimon (1972).

El extracto obtenido fué filtrado, ajustado su pH a 4 y añadido 50g de NaCl por cada litro de extracto. Posteriormente se extrajo con butanol en proporción 1:1. La fase butanólica se concentró mediante destilación a presión reducida con un rotavapor Yamato RE-51 con baño de

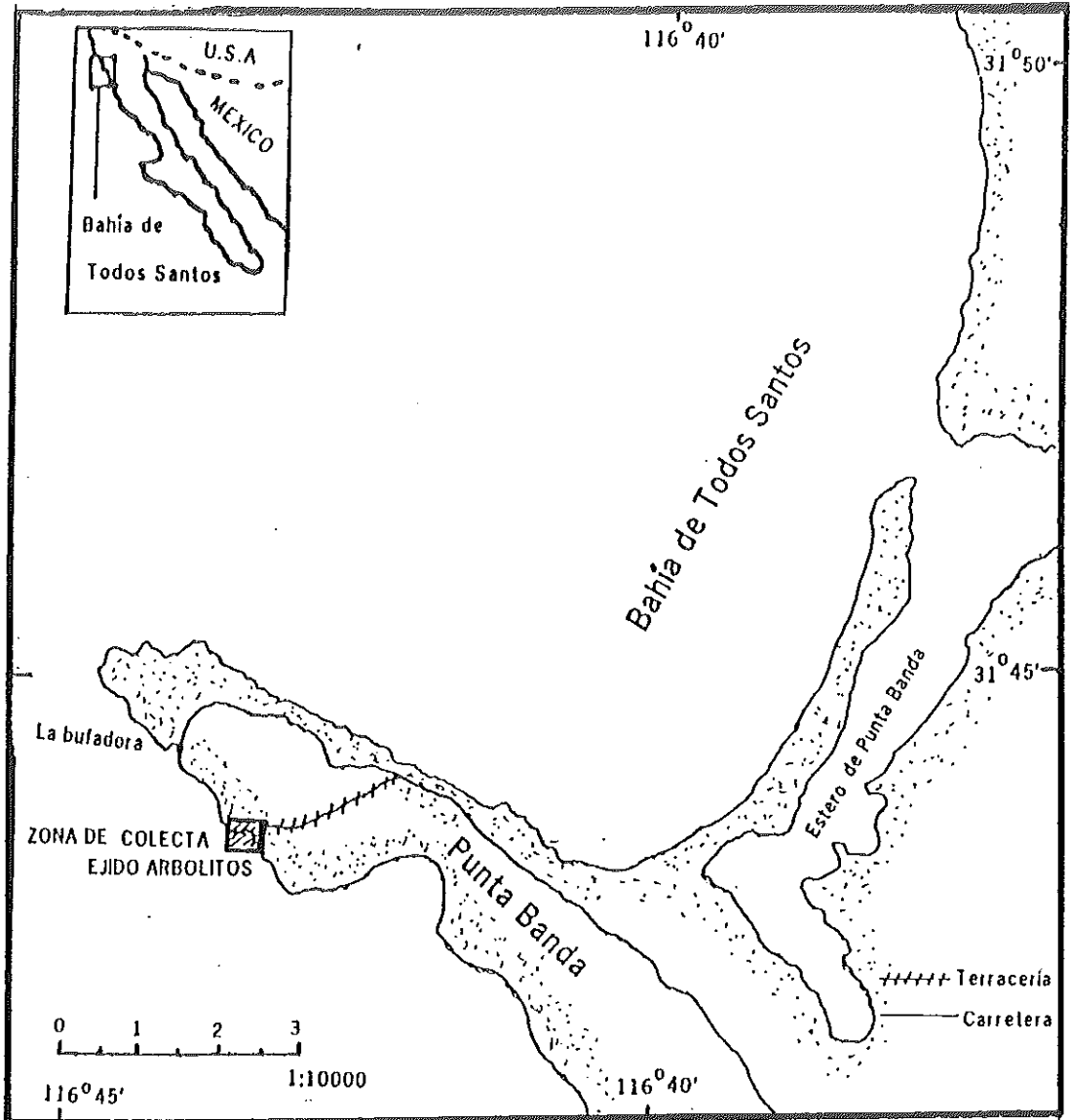


Figura #2. Localización de la Zona de Colecta Ejido Arbolitos, Punta Banda B.C. Nte. México

agua a temperatura controlada Yamato BM-51 a 40°C; obteniéndose un polvo de color blanco cremoso, el cual fué lavado tres veces con acetona y posteriormente con benceno. Seco el polvo, estuvo listo para su utilización. A éste se le denominó principio activo del pepino de mar, conteniendo tres fracciones con capacidad hemolítica y fluorescencia al revelarse con sulfato cérico en presencia de luz ultravioleta (Iñiguez-Martínez, 1990).

OBTENCION DE LA ENZIMA:

La enzima se preparó a partir de sangre de conejo que se obtuvo mediante una punción en la oreja, colectándose en un tubo de ensaye con 0.5 ml de heparina como anticoagulante (500 unidades/ml) llevando el volumen hasta 18 ml.

La sangre fué centrifugada a 3000 rpm durante 5 min. en una centrífuga refrigerada DAMON/IEC DIVISION IEC-B-20A, y posteriormente, separado el suero sanguíneo mediante una pipeta Pasteur (sobrenadante). El material restante (precipitado) se colocó en un amortiguador de Tris(1mM/l)-EDTA(0.1mM/l) pH 7.5 durante 15 min a 2° C. Posteriormente se centrifugó durante 8 min a 4500 rpm y una temperatura de 2° C, luego se separó el precipitado del sobrenadante. El precipitado se lavó con un amortiguador de 0.986g NaCl en Tris (1mM/l)-EDTA(0.1mM/l) pH 7.5 por seis veces a las

mismas condiciones de velocidad, tiempo y temperatura. Una vez obtenidas las membranas de los eritrocitos limpias de hemoglobina y otras proteínas citoplásmicas, se guardaron en refrigeración para ser utilizados al día siguiente, ya que en ellas se encuentra embebida la ATPasa (Bonting y Carvaggio, 1963). Estas membranas son llamadas comúnmente "fantasmas" (Lehninger, 1980).

ENSAYO ENZIMATICO.

Se utilizó la metodología descrita por Dunn y Arditti(1968), utilizando el siguiente cuadro como base:

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
FANTASMAS (ml)	--	1.0	1.0	--	1.0	1.0	1.0
ATP 0.1M (ml)	0.5	--	0.5	0.5	--	0.5	0.5
MgCl ₂ 0.01M (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
IHB 0.1M pH 7.1 (ml)	3.0	2.0	1.5	1.5	1.0	0.5	--
Na ⁺ 0.14M, K ⁺ 0.14M en IHB 0.1 M pH 7.1 (ml)	--	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PRINCIPIO ACTIVO 6.24 mg/ml (ml)	--	--	--	1.0	1.0	1.0	1.5

IHB = Amortiguador Imidazol (6.2816g/l)-Histidina
(1.572g/l) 0.1M pH 7.1

CARACTERISTICAS DE LOS TUBOS:

- 1) Blanco de fantasmas; todo el fósforo inorgánico (Pi) que se produzca es debido a la degradación del ATP por temperatura durante la incubación.
- 2) Blanco de ATP, todo el Pi que se produzca es producto de la hidrólisis del ATP existente en la membrana.
- 3) Actividad normal de la enzima.
- 4) Blanco de fantasmas con principio activo de pepino de mar; el Pi que se produzca es debido a la hidrólisis de ATP provocada por el efecto del principio activo.
- 5) Blanco de ATP, el Pi que se produzca es por hidrólisis del ATP contenido en la membrana y por el Pi que contiene el principio activo.
- 6,7) Actividad de la enzima con inhibición del principio activo de pepino de mar.

Una vez preparados cada uno de los tubos con sus características, se colocaron en un baño maría con temperatura controlada a 40°C durante una hora (Dunn y Arditti, 1968). La reacción fué detenida mediante la adición de 1 ml de ácido perclórico al 8%. Las proteínas precipitadas fueron centrifugadas a 3 000 rpm por 5 minutos

en una centrifuga clínica DAMON/IEC DIVISION IEC-HN-SII. De aquí se separó el precipitado para la medición de proteínas y el sobrenadante para la cuantificación de fósforo liberado.

CUANTIFICACION DE Pi:

Al sobrenadante se le midió el Pi mediante el método Fiske-SubbaRow (en Dunn y Arditti, 1968), tomando una alícuota de 2 ml, agregándole 2.2 ml de agua destilada, 0.2 ml de H_2SO_4 10N, 0.4 ml de Molibdato amónico al 2.5% y 0.2 ml de reactivo reductor (0.25 g de p-metilaminofenol + 0.75 g de bisulfito de sodio en 25 ml de agua destilada, esta solución es estable por una semana). El producto coloreado azul, fué leído a 660 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 21; y determinada su concentración mediante una curva estándar de monofosfato de potasio. El estándar primario se preparó colocando 0.439 g de monofosfato de potasio/l, este estándar contiene 100 µg/ml de fósforo. Fué diluido 5 veces para su utilización. El rango empleado de concentraciones fué de 0 a 5 µg/ml.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS:

Del precipitado se midieron las proteínas, mediante el método de Lowry et al.(1951) modificado, solubilizando las proteínas en 2 ml de hidróxido de sodio 1N, diluyendo esto

con 1 ml de agua destilada. De esta muestra se tomó una alícuota de 1 ml y se diluyó 5 veces con agua destilada. La medición se realizó al añadir 1 ml del reactivo D (50 ml de carbonato de sodio al 2% + 1 ml de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en EDTA sódico al 1.0% (se cambió el tartrato de sodio-potasio por el EDTA, debido a la formación de precipitado constante en la solución, de acuerdo a Alemany-Lamana y Font-Sebarroja (1983))). Una vez agregado el reactivo D, se dejó reposar 10 min., y se le añadieron 0.1ml del reactivo de Folin 2N (elaborado por Sigma) agitándolo inmediatamente. El complejo de color azul se lee a 750 nm. La concentración se determinó con base en una curva de calibración de albúmina de bovino. El estándar utilizado contenía 500 µg/ml de albúmina de bovino. El rango de concentraciones usado en la curva fue de 0 a 110 µg/ml.

SELECCION DEL RANGO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA:

Se determinó el comportamiento de la enzima, aumentando la cantidad de proteína en el medio y manteniendo las mismas concentraciones iónicas. De esta manera se encontraron las condiciones más propicias del ensayo enzimático, para probar el principio activo del polvo obtenido del pepino de mar Stichopus parvimensis.

TRATAMIENTO DE DATOS:

La normalidad de los datos fué determinada por medio de una prueba de Ji-cuadrada. Su diferencia significativa se calculó por medio de un análisis de varianza para los valores normales (más de 6 observaciones) (Zuwaulif, 1977) y la prueba de Kruskal-Wallis para los valores no normales (tres observaciones) (Siegel, 1972).

Los datos fueron convertidos a valores Z de acuerdo a Johnson y Bhattachochargya (1985) para poder comparar el comportamiento de los valores de proteínas y actividad en la gráfica.

RESULTADOS:

La actividad de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ se calculó de acuerdo a la cantidad de fósforo inorgánico (Pi) producido por hora ($\mu\text{g Pi/h}$) por la enzima, al realizar la hidrólisis de ATP. El comportamiento de la enzima se determinó al aumentar la cantidad de proteínas en el medio, manteniendo las condiciones iónicas constantes. Los valores encontrados para el comportamiento de la enzima se muestran en la tabla I. Estos valores fueron convertidos a valor Z para poder comparar la actividad de la enzima y la cantidad de proteínas dentro del ensayo enzimático (tabla IV) y se muestran en la fig. 3. La actividad de la enzima experimentó un aumento en la producción de Pi de acuerdo al

TABLA 1.- Comportamiento de la producción de fósforo inorgánico (Pi) por hora (µg de Pi/h) para la enzima Na⁺-K⁺-ATPasa, de acuerdo al aumento de proteínas (µg), con su respectiva desviación estándar para el número de muestras analizadas.

Número de dato	Número de observaciones	Actividad de la enzima en µg de Pi/h.	Desviación estándar de la actividad de la enzima (µg de Pi/h).	Proteínas del ensayo enzimático en miligramos (mg)	Desviación estándar de las proteínas del ensayo enzimático	Actividad de la enzima como: µg de Pi/mg prot/h
1	3	7.57	1.48	0.29	0.030	26.10
2	3	15.71	0.70	0.39	0.010	40.28
3	18	19.91 ± 0.79	1.71	0.45 ± 0.01	0.010	44.24
4	6	21.85 ± 1.48	1.52	0.59 ± 0.02	0.030	37.03
5	3	26.69	0.44	0.74	0.010	36.07
6	3	64.55	0.97	0.79	0.007	81.71
7	3	55.61	3.42	0.81	0.030	68.65
8	3	56.74	2.93	0.81	0.050	70.05
9	9	18.24 ± 1.15	1.77	1.11 ± 0.03	0.050	16.43
10	6	25.39 ± 1.37	1.72	1.19 ± 0.02	0.040	21.34
11	6	33.27 ± 1.48	1.76	1.64 ± 0.02	0.040	20.29

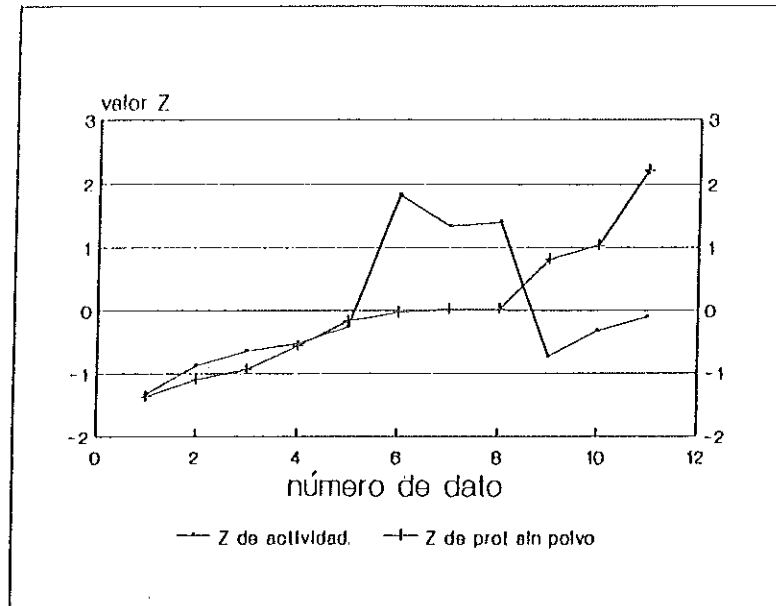


Fig. 3.- Comportamiento de la actividad de la enzima respecto al aumento de proteínas.

TABLE II.- Porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima ($\mu\text{g Pi/h}$) por efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvirostris* a las diferentes concentraciones, con su respectivo valor de proteínas.

Número de observaciones	Actividad de la enzima sin principio activo ($\mu\text{g Pi/h}$)	Proteínas de la enzima sin principio activo (mg)	Actividad de la enzima con 1.5 mg/ml del principio activo ($\mu\text{g Pi/h}$)	Proteínas de la enzima con 1.5 mg/ml del principio activo (mg)	Actividad de la enzima con 2.5 mg/ml del principio activo ($\mu\text{g Pi/h}$)	Proteínas de la enzima con 2.5 mg/ml del principio activo (mg)
18	19.91 ± 0.79	0.45 ± 0.01	16.36 ± 0.58	0.13 ± 0.05	13.17 ± 0.39	0.031
	Porcentaje de inhibición de la enzima por el polvo	=	$17.0 \pm 2.89\%$		$33.02 \pm 2\%$	

aumento de las proteínas en el medio, con una alta correlación ($\emptyset.94$ a un nivel de significancia de 95%), hasta alcanzar un rango máximo de actividad de 55.61 a 64.55 $\mu\text{g Pi/h}$ en un rango de concentración de proteínas de $\emptyset.79$ a $\emptyset.81$ mg. Después del punto máximo, la actividad decrece bruscamente al seguir aumentando la cantidad de proteínas, para después aumentar ligeramente con una correlación de $\emptyset.93$ a un nivel de significancia del 87.5%.

En la tabla II se muestran los valores encontrados para la inhibición de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ a causa del efecto de las diferentes concentraciones del principio activo del pepino de mar S. parvimensis; el cual fué probado en una concentración de proteínas de $\emptyset.45 \pm \emptyset.01$ mg con una actividad de la enzima de $19.91 \pm \emptyset.79$ $\mu\text{g Pi/h}$.

En la fig. 4 se representan las proteínas encontradas en los tubos del ensayo enzimático. Se observa que las proteínas de los tubos donde se probó el principio activo del pepino de mar experimentaron una disminución significativa (al 95% de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis) respecto a las proteínas contenidas en los tubos donde no se agregó el principio activo. Los valores encontrados se muestran en la tabla III, mientras que el valor Z que se empleó para la fig. 4 se muestra en la tabla IV.

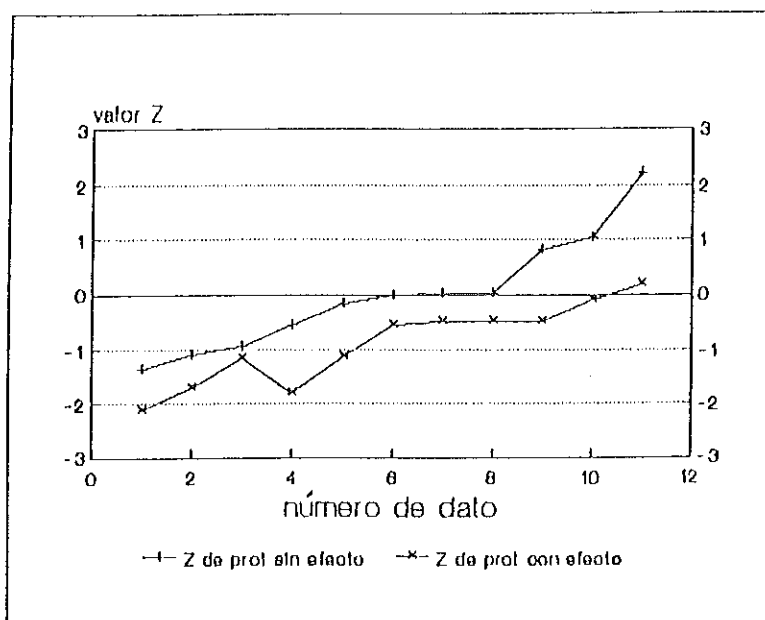


Fig. 4.- Valor Z de las proteínas del ensayo enzimático sin efecto y con efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*.

TABLA III.- Comportamiento de las proteínas durante el ensayo enzimático sin principio activo y con 1.5 mg/ml del pepino de mar *Stichopus parvirens*.

Número de dato	Número de observaciones	Proteínas del ensayo enzimático sin efecto del principio activo (mg)	Desviación estándar de las proteínas del ensayo enzimático sin principio activo	Proteínas del ensayo enzimático con efecto de 1.5 mg/ml del principio activo (mg)	Desviación estándar de las proteínas del ensayo enzimático con 1.5 mg/ml del principio activo
1	3	0.29	0.060	0.16	0.02
2	3	0.39	0.018	0.37	0.02
3	18	0.40	0.010	0.13	0.02
4	6	0.59	0.030	0.38	0.03
5	3	0.74	0.018	0.59	0.01
6	3	0.79	0.007	0.61	0.01
7	3	0.81	0.030	0.61	0.01
8	3	0.81	0.050	0.62	0.03
9	9	1.11	0.050	0.76	0.03
10	6	1.19	0.040	0.87	0.02
11	6	1.64	0.040	1.54	0.1

TABLA IV.- Actividad de la enzima, proteínas sin efecto del principio activo y proteínas con efecto del principio activo del pepino *Stichopus parvinensis*, expresados como valor Z. (Z = valor - desviación SID / promedio). Nota: Los valores Z son adimensionales, las unidades de la tabla expresan al grupo de datos de donde provienen los valores Z.

Número de dato.	Valor Z de la actividad de la enzima. ($\mu\text{g Pi/h}$)	Valor Z de la actividad de la enzima. ($\mu\text{g Pi/mg prot/h}$)	Valor Z de las proteínas sin efecto del principio activo (mg)	Valor Z de las proteínas con 1.5 mg/ml del polvo de principio activo (mg)
1	-1.32	-0.75	-1.36	-2.13
2	-0.87	-0.88	-1.89	-1.71
3	-0.64	0.10	-0.93	-1.15
4	-0.53	-0.24	-0.56	-1.79
5	-0.26	-0.28	-0.16	-1.12
6	1.83	1.87	-0.83	-0.56
7	1.34	1.26	0.02	-0.51
8	1.40	1.32	0.02	-0.51
9	-0.73	-0.21	0.02	-0.48
10	-0.33	-0.98	1.04	-0.11
11	0.10	-1.02	2.23	0.10

DISCUSIONES:

La ATPasa de cualquier tejido necesita que existan ciertas características dentro del medio para que pueda trabajar, como un buen gradiente de membrana entre el Na^+ y K^+ (Skou, 1965; Repke y Schofeld, 1984), concentración adecuada de K^+ (Skou, 1957; Post et al., 1960; Dunham y Glynn, 1961; Auditore y Murray, 1962; Chan et al., 1964; Chan y Sanslone, 1969; Kracke, 1983; Akera et al., 1985), la relación de concentraciones entre ambos iones (Dunham y Glynn, 1961), y buen estado de la membrana del "fantasma". Si alguno de estos factores variara, puede ocasionar que exista un aumento o descenso en la producción de Pi y por lo tanto en el transporte del Na^+ y K^+ por la enzima.

Debido a esto se determinó experimentalmente el comportamiento de la enzima según el aumento de proteínas (fig. 3), para poder encontrar el lugar de la curva donde existan las mejores condiciones iónicas y ahí poder probar el efecto del principio activo.

Podríamos hablar de tres zonas principales en la Fig. 3 en el comportamiento encontrado para la enzima. La primera zona se encontró entre los 0.25 y 0.74 mg de proteínas, produciendo de 7.57 a 26.69 μg de Pi/mg. Aquí la enzima aumentó la producción de Pi conforme se aumentó la concentración de proteínas con una alta correlación (94%), a un nivel de significancia mayor del 95%. Al probar aquí el

principio activo extraído del pepino de mar S. parvimensis, la enzima contaría con un rango iónico considerable para poder trabajar, ya que todos los iones necesarios para la enzima se encuentran en abundancia. En la segunda zona se encontraron las actividades máximas para la enzima, siendo de 55 a 64.5 μg de Pi/h en un rango de proteínas de 0.79 a 0.81 mg, si utilizáramos esta zona para probar el principio activo del pepino, el rango sería muy pequeño, dificultando trabajar en él. De la misma manera las características iónicas del medio están al límite para la enzima por lo que si llegara a necesitar una mayor cantidad de algún ión éste estaría muy limitado. A partir de este punto la enzima decrece en su producción de Pi. Es aquí donde consideramos la tercera zona para el comportamiento de la enzima. Debido a que las condiciones iónicas se mantienen constantes mientras que las proteínas siguen aumentando, es que se observa esta disminución en la actividad de la enzima. Los valores encontrados para esta zona muestran un comportamiento ascendente después de descender bruscamente, con una correlación del 93% a un nivel de significancia de 87.5%. Sin embargo, no podemos hacer ninguna predicción posible sobre el comportamiento posterior de la enzima en esta zona, ya que sólo contamos con tres puntos en la Fig. 3. Si se probara el principio activo en esta tercera zona, el efecto encontrado se vería

acompañado de condiciones iónicas deficientes, por lo que de encontrar un efecto inhibitorio no se podría considerar como "real".

Al comparar nuestros datos experimentales de la máxima actividad para la ATPasa de eritrocitos de conejo (68.65 a 81.71 μg de Pi/mg de proteína/h) con los reportados para eritrocitos de otros organismos, como el humano (de 15.5 a 80.6 μg Pi/mg proteína/h (Post et al., 1960; Chan et al., 1964; Nakao et al., 1965)), la rata (11 a 39.06 μg Pi/mg proteína/h (Chan et al., 1964; Chan y Sanslone, 1969)) y el gato (7.93 a 8.37 μg Pi/mg proteínas/h (Bonting et al., 1961; chan et al., 1964)), se puede observar que los valores reportados para la actividad de eritrocitos muestran un rango muy amplio. Esto puede atribuirse a factores de tipo biológico que determinan las características de los "fantasmas" obtenidos, como son: tipo de alimentación de los organismos de prueba, estrés, hora de la toma de muestra, si el organismo se encontraba o no en ayunas y el estado de salud del mismo (Menzer, 1987). También pueden deberse a variaciones metodológicas como es el tipo de toma de la muestra de sangre (punción o inyección) y la persona que la obtiene, ya que esto puede ocasionar que el número de "fantasmas" en buen estado varíe de un investigador a otro (Menzer, 1987). No obstante, los valores encontrados para eritrocitos de conejo se pueden

comparar con un rango general para los diferentes tipos de eritrocitos de otros organismos..

Los valores del efecto inhibitorio del polvo sobre la ATPasa se probaron en una concentración de 0.45 ± 0.01 mg de proteína y donde se producen 19.91 ± 0.79 μ g de Pi/h, localizada en la zona ascendente de la curva. Mostrando que el principio activo actúa inhibiendo la enzima en un $17.8 \pm 2.8\%$ a una concentración de 1.5 mg/ml y de $33.8 \pm 2\%$ a 2.3 mg/ml.

La inhibición de la ATPasa no está restringida a la acción de los glucósidos cardiotónicos. Esta puede ser causada por muy diversos agentes, como por ejemplo metales tales como el cobre (Bonting et al., 1961), zinc, aluminio y vanadio (Kracke, 1983); iones libres como Li^+ , Ca^{++} , NH_4^+ , Rb^{++} y Cs^{++} (Skou, 1965); yodo acetato o arsenato de sodio (Bonting et al., 1961), lisofosfatidil colina (fosfoglicérido) y ácidos grasos como el mirístico, el palmítico, el esteárico y el elaídico (Karli, 1979).

Sin embargo, todos estos factores pueden ser descartados como inhibidores en nuestro experimento ya que los métodos utilizados antes y durante el ensayo enzimático previenen su influencia. El principio activo, que pudiera tener residuos lipídicos dentro del extracto acuoso, es lavado con benceno y acetona antes de ser secado para su

utilización por lo que éstos son eliminados. Los posibles iones metálicos como Ca^{++} y Mg^{++} que pudiera tener la enzima durante su extracción, son eliminados por el EDTA presente en el amortiguador de obtención de "fantasmas". De la misma manera, aquellos iones libres provenientes del agua de mar contenida en los organismos, como el Zn^{++} , Cu^{++} o Al^{+++} , son atrapados por la histidina presente en el mismo amortiguador, ya que es conocida como un poderoso agente quelante (Kracke, 1983).

Gorshkov et al., (1982) mostraron el efecto de los diferentes glucósidos obtenidos de algunas especies de pepinos y estrellas de mar sobre la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$. Los valores de inhibición muestran que los glucósidos de los pepinos de mar poseen un mayor poder inhibitorio sobre la enzima ($28 \pm 3\%$ a $77 \pm 5\%$) que los glucósido de las entrelas de mar ($2.0 \pm 2\%$ a $58 \pm 3\%$). Las inhibiciones encontradas para el principio activo de S. parvimensis son comparables con las obtenidas por Gorshkov et al. (1982) por los glucósidos de diferentes pepinos de mar sobre la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$.

Además del efecto inhibitorio encontrado para el principio activo, existen otras características que lo relacionan con los glucósidos de los pepinos de mar. Su método de extracción es realizado en solución acuosa a partir de un pepino de mar, presentando abundante espuma,

características que lo relacionan a su vez con las saponinas. Posteriormente el extracto acuoso es colocado a extracción con butanol, el cual al saturarse con agua forma un medio donde los glucósidos son altamente solubles. Por otra parte el extracto acuoso así como el principio activo, mostraron toxicidad sobre los peces de fosas de entremareas Girella nigricans comúnmente llamados chopas, presentando el comportamiento reportado por Nigrelli y Jakowska (1960) para la holoturina A de Actinopyga agassizi. Además produce hemólisis de los eritrocitos en solución salina (Iñiguez-Martínez, 1990).

Por otra parte el hecho que el principio activo esté causando un efecto inhibitorio sobre la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, no quiere decir que posea la capacidad de alterar la fuerza del latido cardíaco (efecto inotrópico) y por lo tanto ser utilizado como cardiotónico. Existen diferentes sustancias que no causan efecto inotrópico aunque sean capaces de inhibir a la ATPasa. Entre estas sustancias podemos citar a los ácidos grasos, el diisopropilfluorofosfato y los esteroides con agentes alquilantes (Doerge, 1982). Es por esto que no obstante que existen muchas características que relacionan al principio activo obtenido del pepino de mar S. parvimensis, con los glucósidos obtenidos de otras especies

de holoturoideos, no podemos asegurar que este sea un cardiotónico.

Respecto a la disminución de proteínas durante el ensayo enzimático se observó, que aquellas proteínas que se encontraban en presencia del principio activo del pepino de mar, experimentaron una disminución en comparación con aquéllas que no lo contenían. Los mecanismos propuestos como probables para esta disminución así como sus consecuencias se enumeran a continuación:

a) Dentro del principio activo pueda existir algún compuesto que esté provocando la hidrólisis parcial de las proteínas. Este fenómeno afectaría directamente a la ATPasa presente en la incubación, ocasionando que la inhibición observada no sea debida al efecto del polvo; sino a la disminución de la enzima productora de Pi.

La hidrólisis de proteínas está principalmente ligada a la acción de un agente, ácido o base fuerte. Estos actúan provocando la ruptura del enlace peptídico de las proteínas total o parcialmente, según su concentración requiriendo para ello calor (Lehninger, 1980). Sin embargo durante la obtención de la enzima y el principio activo, no existe la posible contaminación de este tipo de agentes ni el aumento de la temperatura, por lo que la hidrólisis por este medio es descartada. Por otra parte la toxina del

pepino de mar se encuentra alojada principalmente en los túbulos de Cuvier, que se encuentran unidos al tracto digestivo (Baslow, 1977). El pepino de mar, al ser sometido a un estrés prolongado, eviscera estos túbulos, junto con parte del tracto digestivo. Dentro de éste existen enzimas del tipo proteasas (ej: pepsina) las cuales pueden romper los extremos de la cadena peptídica sin requerir un incremento de temperatura (Lehninger, 1980). Debido a esto es que la hidrólisis de proteínas observado pudiera deberse a algunas enzimas de este tipo presentes en el principio activo por la evisceración de los organismos.

b) Además del principio activo del polvo existan otras sustancias de naturaleza semejante, que puedan interferir directamente con el método de Folin al formar el complejo coloreado de cobre.

El método de Folin se basa en la formación de un complejo mediante la reacción de un ión cúprico con dos cadenas peptídicas contiguas, que contengan al menos dos enlaces peptídicos sucesivos, además de reaccionar con los grupos tirosil presentes (Alemani-Lamana y Font-Sebarroja, 1983). La mala formación del complejo coloreado podría derivarse de la presencia de algún ión que este compitiendo con el Cu^{++} para la formación del complejo; sin embargo, el único ión divalente existente en cantidad suficiente que

podría interferir en este sentido es el Mg^{++} . No obstante, la afinidad de los acomplejantes hacia el ión Cu^{++} es mucho mayor que para el Mg^{++} (Doerge, 1982). Por otra parte el principio activo del polvo o las sustancias de naturaleza semejante que lo acompañan, podrían contener algún ión metálico divalente en su estructura que compita con el Cu^{++} , impidiendo así la formación del complejo coloreado con la proteína. De manera semejante, si la sustancia posee en su estructura el grupo fenol, éste puede competir con los grupos tirosil (que también posee el grupo fenólico) para la formación del complejo coloreado.

c) Las proteínas se llegaran a conjugar con el principio activo, provocando que ésta no sea cuantificada por el método de proteínas.

Las proteínas presentes en la sangre son principalmente del tipo de las lipoproteínas (acarreadoras de lípidos en el sistema sanguíneo). Aunque la mayoría de ellas sólo son sedimentables a altas velocidades, existen algunas lipoproteínas de mayor densidad (Lehninger, 1980) que podrían haberse sedimentado junto con los eritrocitos durante la formación de los "fantasmas". Gorshkov et al. (1982) señala la posible formación de un complejo glucósido-colesterol (glucósido-lípido) que actúa sobre la ATPasa, provocando la inhibición de la enzima. En caso

que este acomplejamiento se realizara, el glucósido tiene la opción de obtener el colesterol a partir de dos fuentes; la primera rompiendo la lipoproteína presente en el medio, ocasionando que ésta no sea cuantificada por el método de Folin. O bien a partir de la membrana del "fantasma", el cual posee hasta un 40% de lípidos de los cuales la mitad es colesterol (De Robertis et al., 1975). De ocurrir esto provocaría la ruptura de la membrana (hemólisis) y por lo tanto una disminución en la producción de Pi por la enzima, debido a la destrucción parcial de la misma. Además, hay que recordar que la ATPasa necesita membranas intactas de eritrocitos para poder realizar el transporte (Post et al., 1960; Skuo, 1965), ya que de lo contrario los iones pueden "entrar" y "salir" libremente de la membrana.

d) Al agregar el principio activo, esto pueda provocar la destrucción de la membrana del "fantasma".

Debido a que el principio activo presenta actividad hemolítica de los eritrocitos (Iñiguez-Martínez, 1990), es probable que pueda actuar de la misma manera sobre la membrana del "fantasma". Existen bioquímicamente dos tipos de hemólisis, la primera es una hemólisis parcial donde las membranas pueden ser hinchadas mediante un medio hipotónico para extraer la hemoglobina, y posteriormente ser regresadas a su estado original. En este procedimiento la

membrana permanece intacta, este es el procedimiento de obtención de los "fantasmas". La otra hemólisis es más drástica y no permite la restitución de la membrana, ya que el medio utilizado provoca la ruptura de la membrana, dejando salir su contenido (De Robertis et al., 1975). La hemólisis provocada por el principio activo del pepino de mar S. parvimensis, sería drástica actuando directamente sobre la membrana y destruyendo la enzima y por lo tanto presentando una baja producción de Pi. Esto provocaría que el efecto inhibitorio observado no sea debido al principio activo del pepino de mar sino a la hemólisis en sí.

Para finalizar hay que señalar que la disminución de proteínas por el polvo, puede llegar a estar muy ligado a otros efectos encontrados para extractos crudos de pepinos y estrellas de mar. Por ejemplo Baslow (1977) reporta la actividad antifungal del extracto separado de Stichopus japonicus, menciona además los resultados encontrados por Helibrumm para los extractos de estrellas de mar, de actuar inhibiendo la división de los huevos de anélidos y erizos de mar, y la licuefacción de la corteza de las células. También señala que Ruggieri encontró la inmovilización del esperma, la modificación de la envoltura de los huevos fertilizados y la detención de algunos estados de desarrollo para los erizos de mar, por parte de extractos de estrellas de mar. Hashimoto (1979) señala como

características de este tipo de extractos el efecto en movimientos amiboideos de los leucocitos, y la inhibición de la fertilización de huevos de larvas de organismos marinos. La holoturina extraída de Actinopyga agassizi (pepino de mar) se le encontró efecto en la reproducción, partición y formación del plancton, así como disminución del crecimiento de sarcoma (Nigrelli y Jokowska, 1960). Estos fenómenos se pudieran llegar a explicar por medio de la disminución de proteínas causada por el principio activo de pepino de mar, posiblemente ligados con la hidrólisis de la proteína.

CONCLUSIONES:

> El principio activo obtenido del pepino de mar Stichopus parvimensis, presentó inhibiciones de $17.8 \pm 2.8\%$ a una concentración de 1.5 mg/ml y de $33.8 \pm 2\%$ a una concentración de 2.3 mg/ml, sobre la actividad de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$.

> El principio activo ocasiona una disminución significativa de las proteínas presentes dentro del ensayo enzimático.

> Se proponen cuatro causas de la disminución de proteínas:

- a) Hidrólisis por proteasas.
- b) Interferencia sobre el método de medición de proteínas.
- c) Conjugación de las proteínas con el principio activo del pepino de mar S. parvimensis.
- d) Hemólisis de la membrana del "fantasma".

RECOMENDACIONES:

> Realizar pruebas fisiológicas del principio activo del pepino de mar sobre el latido cardíaco, para observar si posee la capacidad de producir efecto inotrópico positivo y así poder llegarse a considerar como un cardiotónico potencial.

> Probar el principio activo purificado del pepino de mar sobre la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$, para tratar de determinar si es él el causante de la disminución encontrada para las proteínas, en el principio activo sin purificación.

> Utilizar varios métodos de cuantificación de proteínas y compararlos.

BIBLIOGRAFIA:

Alemany-Lamana M. y S. Font-Sebarroja, 1983. Prácticas De Bioquímica. Primera Edición. Ed. Alhambra España. pp.250

Akera Tai, 1971. Quantitative Aspects of the Interaction Between Ouabain and (Na⁺-K⁺)-Activated ATPase in vitro. Biochimica et Biophysica Acta. 249: 53-62.

Akera T, Y-C. NG, I-S Shieh, E. Bero, T.M. Brody and W.E. Braselton, 1985. Effects of K⁺ on the Interaction Between Cardiac Glycosides and Na,K-ATPase. European Journal of Pharmacology. 11:147-157.

ApSimon J.W., J.A. Buccini and S. Badripersand, 1972. Marine Organic Chemistry isolation of 3,6-dihydroxy-5-pregn-9(11)-en-20-one from the Saponins of the Starfish Asterias forbesi; a rapid method for extracting starfish saponins. Foods drugs from the sea.

Auditore J.V. and L. Murray, 1962. Cardiac (microsomal) Na⁺-K⁺-Adenosinetriphosphatase and its Possible Relationship to the Active Na⁺-K⁺ Transport System. Arch. Biochem. Biophys. 99, 372-382.

Baslow M.H., 1977. Marine Pharmacology. Ed. Robert E. Krieger publishing company. U.S.A. pp. 327.

Bonting S.L., K.A. Simon and N.M. Hawkins, 1961. Studies on Sodium-Potassium Activated Adenosine Triphosphatase. I.- Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochim. Biophys. 95, 416-423.

Bonting S. and L.L. Carvaggio, 1963. Studies on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase V. Correlation of enzyme activity with flux in six tissues. Arch. Biochem. Biophys. 101: 37-46.

Cantley L., 1986. Ion Transport Systems Sequenced. Trends in Neurosciences. Vol. 9 Ed. ELSEVIER. pp: 1-3.

Chan P.C., V. Celebrese and T.S. Theil, 1964. Species Differences in the Effect of Sodium and Potassium Ions on the ATPase of Erythrocyte Membranes. Biochim. Biophys. Acta. 79, 424-426.

Chan P.C. and W.R. Sanslone, 1969. The Influence of a Low-Potassium Diet on Rat-Erythrocyte Membrane Adenosine Triphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 134, 48-52.

Dahl J.L. and L.E. Hokin, 1974. The sodium-potassium adenosinetriphosphatase. Ann. Rev. Biochem. 43:327-356.

De Robertis E.D.P., F.A. Saez and E.M.F. De Robertis, 1975. Cell Biology. Sixth edition. W.B. Saunders company. U.S.A. pp. 615

Doerge R.F., 1982. Wilson and Gisvold's textbook of organic medical and Pharmaceutical chemistry. Eighth edition. cap. 18. Ed. J.P. Lippincott company. U.S.A.

Domínguez X.A., 1973. Métodos De Investigación Fitoquímica. Primera Edición. Ed. Limusa. México.

Dunham E.T. and I.M. Glynn, 1961. Adenosinetriphosphatase Activity and the Active Movements of Alkali Metal Ions. J. Physiol. 156, 274-293.

Dunn A. y J. Arditti, 1968. Experimental Physiology Experiment in Celular, General an Plant Physiology. Ed. Holt, Rinehart and Winston, Inc. U.S.A.

Friess S.L. and F.G. Standaert, 1960. Some pharmacologic properties of Holoturin A a Glycosidic mixture of the sea cucumber. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 90.

Gibbs R., P.M. Roddey and E. Titus, 1965. Preparation, assay and properties of an Na⁺ and K⁺ requiring adenosine triphosphatase from beef brain. J. of Biol. Chem. 240(5) pp. 2181-2187.

Goodman L.S. y A. Gilman, 1978. Bases Farmacológicas De La Terapéutica. Quinta Edición. Ed. Interamericana. México. pp. 1412

Gorshkov B.A., I.A. Gorshkova, V.A. Stonik and B. Elyakov, 1982. Effect of the glycosid marine in the adenosinetriphosphatase activity. *Toxicon*. 20(3) pp.655-658.

Hashimoto Y., 1979. Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites. Ed. Japan Scientific Societies Press. Japon. pp. 369.

Hochachka P.W. and G.N. Somero, 1984. Biochemical Adaptation. Princeton University Press. 537 pag. U.S.A.

Iñiguez-Martínez A.M., 1990. Comunicación personal. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ap. Postal 453 Ensenada, B.C. México.

Johnson R. and G. Bhattacharya, 1985. Statistics Principles and Methods. pp.209.

Karli J.N., G.A. Karikas, P.K. Hatzipavlou, G.M. Levis and S.N. Mouloupulos, 1979. The Inhibition of Na⁺ and K⁺ Stimulates ATPase Activity of Rabbit and Dog Heart Sarcolemma by Lysophosphatidil Choline. *Life Sciences* 24, 1869-1876.

Kracke G.R., 1983. Na, K,-ATPase Inhibitor From Guinea Pig Brain is not Ouabain-Like. *J. Lab. Clin. Med.* 101, 105-113

Lehninger A.L., 1980. BIOQUIMICA. Segunda edición. Ed. Omega. España. pp. 1117.

Lowry O.H., J. Rosembrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Menzer R.E., 1987. Selection of animal models for data interpretation; en Toxic Substances and Human Risk. (ED) R.G. Tardiff and J.V. Rodricks. Plenum press inc. N.Y. Cap 8.

Nakao t., K. Nagano, K Adachi and M. Nakao, 1963. Separation of Two Adenositriphosphatase From Erythrocyte Membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol 13. No.-6.

Nakao T., Tashima Y., Nagano K., and Nakao M., 1965. Higly specific sodium-potassium-activated Adenosine Triphosphatase from various tissues of rabbit. Biochemical and Biophysical Research communic. vol.19 No.6 pp:755-758.

Nigrelli R.F. and S. Jokowska, 1960. Effects of Holoturin A Steroid Saponin from the Bahamian Sea Cucumber (Actinopyga agassizi) on Various Biological Systems. Ann. NY aca. sci. Vol. 90.

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. 6,1796.

Repke K.R.H., I. Herrman and J. Portius, 1984. Interaction of cardiac glycosides and Na, K- ATPase is regulated by effector-controlled equilibrium between two limit enzyme conformers. Biochem. Pharm. Vol.33 No.13. pp: 2089-2099.

Repke K.R.H. and W. Schonfeld, 1984. Na⁺/K⁺ -ATPase as the digitalis receptor. Trends in pharmacological Sciences. Vol.5 Ed. ELSEVIER. pp.393-396.

Rio G.J., 1965. Some biochemical and physiological properties of toxins from several sp. of asteroidea. Toxicol. vol.3 pp:147-155.

Scheuer P.J., 1983. Marine Natural Products Chemical and Biological Perspectives. Ed. Academic Press. Vol.5 U.S.A.

Secretaría de Marina, 1974. Estudio geográfico de la región de Ensenada, B.C. Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. México D.F.

Siegel S., 1972. Estadística no Paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta. Segunda edición. Ed. Trillas. pp. 344. México.

Skou J.C., 1957. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase From Periphethial Nerves. Biochim. Biophys Acta. 23, 394-401.

Skou J.C., 1965. Enzymatic Basis from Active Transport of Na^+ and K^+ Across Cell Membrane. Physiol. Rev. 45, 597-617.

Stryer L., 1976. Bioquímica. Ed. Reverte S.A. España. pp. 875.

Ville C.A., 1985. Biología. Septima edición. Ed. Interamericana. México. pp. 803.

Yoda A. and Yoda S., 1974. Structure- Activity Relationship of Cardiotonic Steroids for the Inhibition of Sodium-and Potassium-Dependent Adenosine Triphosphatase. Molecular Pharm. 10:494-500.

Zuwalif F.N., 1977. Estadística General Aplicada. Ed. Fondo Educativo Interamericano. pp. 433 México.