

Variabilidad zonal y cambios estacionales en el contenido de glucógeno y glucosa del manto de *Mytilus*

C. A. Crespo* y J. Espinosa

Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
15706 Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 18 de octubre de 1988)

C. A. CRESPO and J. ESPINOSA. *Zonal Variability and Seasonal Changes in the Glycogen and Glucose Content of Mytilus Mantle*. Rev. esp. Fisiol., 45 (2), 117-122, 1989.

Glycogen and free-glucose content in the ventral, central and dorsal parts, as well as glucose-6-phosphate phosphatase activity in mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. were examined. The glycogen content of mantle did not manifest asymmetrical distribution among the three parts. In the period studied, the typical glycogen content profile variation was found, being maximum in July. The tissue free-glucose content was similar in each part, and the obtained seasonal variation profile was opposite to the glycogen content, reaching the minimum in July. For every part of mantle, free-glucose/glycogen ratio showed similar monthly profiles. In each part the 50 % point was found in July. Glucose-6-phosphate phosphatase activity was not found in the mantle tissue.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, Glycogen, Free-glucose.

En la familia Mytilidae, el glucógeno es el principal material de reserva bioenergética que está presente en todas las células del tejido del manto, aunque se han descrito células especializadas en el almacenamiento de dicho polisacárido, las cuales están presentes en gran cantidad en la región del borde del manto (3, 9, 12). Además, el tejido del manto es el lugar donde se produce el desarrollo gonadal, en el cual las reservas de glucógeno muestran una clara periodicidad anual que está relacionada con la actividad reproductora (4-6).

Hasta ahora, la mayoría de los autores

han considerado que las funciones fisiológicas residentes y llevadas a cabo en el manto están distribuidas sobre todo el tejido. Aunque este hecho podría no ser totalmente cierto, así se podría esperar que una distribución asimétrica de las células almacenadoras de glucógeno causara el correspondiente contenido asimétrico del polisacárido en el tejido del manto y viceversa. Además, las variaciones estacionales de las reservas de glucógeno podrían tener lugar de diferente manera en diversas partes del tejido, dado que el crecimiento de la gónada no es uniforme a lo largo del manto y el contenido de glucógeno en los ovocitos es elevado (3). Por tanto, parece

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

estar indicado el estudio de la distribución del contenido de glucógeno, así como su variación estacional en las diferentes partes del manto.

La glucosa libre está siempre en el tejido del manto, por ello se ha investigado la variabilidad del contenido de la misma en diferentes partes del manto, así como su variación estacional.

Una hipótesis que se plantea en este trabajo va dirigida a conocer cuál es la expresión metabólica del sistema efector glucogenolítico existente en el manto de *Mytilus*, realizando una aproximación experimental mediante la determinación de la actividad glucosa-6-fosfato fosfatasa en dicho tejido, para así poder discernir si la glucosa libre existente en el manto podría proceder, en parte, de una degradación del glucógeno existente en el mismo.

Material y Métodos

Animales. — Se han utilizado mejillones (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) (3, 13) de tamaño uniforme (9-10 cm de longitud) procedentes de la ría de Arosa (N. O., España), recogidos semanalmente y mantenidos con alimentación discontinua de una mezcla microalgal en acuarios de agua de mar (SW) a 15-16° C.

Preparación de fragmentos del manto. — En cada experimento se utilizaron unos 20 ejemplares. Los fragmentos de manto se obtuvieron según el método de WHITTLE y GABBOTT (15) modificado como se describe: Los mantos fueron lavados en agua de mar fría (AMF) y divididos a lo largo del eje principal en tres partes: ventral (V), central (C) y dorsal (D). La parte V es una zona de 4 mm de grosor que limita por su área interna con la charnela; la D, de 4 mm de espesor limita externamente con el borde del manto; y, la C es la región del manto entre las partes ventral y dorsal. De cada parte del manto se obtuvieron grupos de fragmentos de 1 mm

de espesor que se sometieron a dos clases de lavado: primeramente, fueron lavados durante 2 min en AMF y filtrados a través de una malla de nylon (200 μ m, diámetro), luego los grupos de fragmentos se introdujeron en placas pettri y se lavaron durante 60 min con AMF, sometidos a agitación. Los fragmentos fueron filtrados nuevamente y enjuagados dos veces.

Determinaciones de glucógeno y glucosa. — El contenido de glucógeno fue determinado enzimáticamente por el método de KEPLER y DECKER (11), con las siguientes modificaciones: 200 mg de cada parte del manto fueron homogeneizados en frío con HClO₄ al 6 % (1:6 p/v) y a 200 μ l del homogenado se le añadieron 100 μ l de HCO₃Na 0,1 M, manteniéndolo 10 min en baño de hielo. Seguidamente, los tubos se centrifugaron durante 1 min a 10 000 rpm (microfuga TM 11 Beckman). Del sobrenadante, 200 μ l fueron tratados durante 120 min a 40° C con 500 μ l de amiloglucosidasa (17,2 U/ml) en tampón acetato sódico 0,2 M, pH 4,8. La reacción fue frenada con 100 μ l de HClO₄ al 6 %, manteniendo los tubos 10 min en baño de hielo y se centrifugaron en las condiciones anteriormente descritas.

Finalmente, la glucosa producida se determinó por el método de la glucosa oxidasa (1) utilizando un kit comercial (Glucinet). Este procedimiento rinde un valor para el *pool* total tisular de glucógeno más glucosa. La glucosa tisular fue determinada por el micrométodo descrito pero sin tratamiento enzimático, y la cantidad de glucógeno se calculó como (glucógeno más glucosa tisulares) - (glucosa tisular). Este micrométodo fue validado con glucógeno estándar, siendo el porcentaje de recuperación del 100 %.

Determinación de glucosa-6-fosfato fosfatasa (EC. 3.1.3.9). — Se determinó por el método de GIEROW y GERGIL (10), modificado como se describe: Los fragmentos tisulares (4 g) se homogeneizaron en frío

con *buffer* cacodilato 50 mM, pH 6,5 (1:4 p/v). La suspensión obtenida se centrifugó de nuevo a 4° C (8.000 × g, 10 min) y 200 µl del sobrenadante se incubaron a 37° C a tiempos de 5, 10, 20 y 30 min en tampón cacodilato 50 mM, pH 6,5, utilizando como sustrato glucosa-6-fosfato (G6P), 5 mM (volumen final, 1 ml). El frenado de la reacción se realizó durante 10 min en baño de hielo con TCA al 7 %, centrifugando posteriormente a 4° C (1.000 × g, 1 min). La glucosa fue determinada en el sobrenadante. La proteína del extracto se determinó por el método de BRADFORD (2).

Cálculos estadísticos. — Todos los resultados se expresan como la media ± SEM junto con el número de determinaciones individuales (n). El análisis significativo de las diferencias estadísticas entre medias se realizó mediante el test t-Student (dos colas) (14).

Resultados

Un estudio comparativo entre las tres partes seleccionadas del tejido del manto muestra que (tabla I), para cada mes, el contenido de glucógeno fue similar en las tres partes del manto. Durante el período mayo-septiembre (1988) la variación de las reservas del polisacárido mostró el mismo perfil en las tres partes, así los valores permanecieron constantes entre junio-julio, aumentando en julio (valor máximo) y comenzaron a disminuir en agosto.

La glucosa libre tisular experimentó un perfil de variación prácticamente igual en las tres partes estudiadas, aunque los niveles en la parte C, no sufrieron apenas variación durante la totalidad del período estudiado. El perfil mostrado por las otras dos partes fue el mismo, alcanzando el mínimo valor en julio, para aumentar seguidamente hasta un valor máximo en agosto.

La relación glucosa libre/glucógeno

Tabla I. Variabilidad zonal en el contenido de glucosa (G) y glucógeno (Glu) (µg/mg peso fresco) del manto de *Mytilus galloprovincialis*, durante el período estacional mayo-septiembre, 1988.

Los resultados se representan como media ± SEM para n = 20. Partes del manto: V = ventral; C = central; D = dorsal.

Mes	Manto	Glucosa	Glucógeno	% G/Glu
Mayo	V	14,3 ± 0,7	18,3 ± 0,9	78,1 ± 3,8
	C	13,0 ± 0,8	18,5 ± 0,5	70,3 ± 3,5
	D	12,6 ± 0,3	12,3 ± 0,3	97,6 ± 3,9
Junio	V	14,1 ± 0,1	14,1 ± 0,1	100,0 ± 6,0
	C	14,6 ± 0,4	18,9 ± 0,8	77,2 ± 3,9
	D	20,1 ± 1,1	22,7 ± 1,4	88,6 ± 5,3
Julio	V	11,2 ± 0,7	33,2 ± 0,6	33,7 ± 1,3
	C	14,1 ± 1,0	31,3 ± 0,9	45,0 ± 2,3
	D	12,7 ± 0,8	38,5 ± 0,1	33,0 ± 1,3
Agosto	V	18,9 ± 0,9	27,3 ± 1,1	69,2 ± 4,2
	C	17,1 ± 1,0	26,1 ± 1,4	65,5 ± 2,6
	D	20,5 ± 1,2	31,4 ± 1,9	65,3 ± 2,0
Septiembre	V	17,1 ± 0,8	25,9 ± 1,2	66,0 ± 2,6
	C	15,5 ± 0,3	23,2 ± 0,5	66,8 ± 3,8
	D	15,2 ± 0,8	27,8 ± 1,0	54,7 ± 2,2

mostró un perfil similar para las tres partes. Esta relación experimentó un fuerte descenso desde mayo a junio, donde se alcanzó el mínimo valor para, posteriormente, aumentar en los meses siguientes. Los valores obtenidos nunca fueron inferiores al 30 %.

La actividad de glucosa-6-fosfato fosfatasa no resultó significativa durante todo el período mayo-septiembre.

Discusión

Cuando se ha estudiado la variación del contenido de glucógeno en el manto de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, se ha considerado el tejido como un todo (2, 8). Con la compartimentalización del manto realizada en este trabajo, se intentó conocer si podría existir una distribución asimétrica del contenido de glucógeno en este tejido dado que, aunque este polisacárido se encuentra almacenado en las células vesiculares (CV) y adipogranulares (3, 12), la gran cantidad de glucógeno almacenado en los ovocitos y su distribución asimétrica podrían variar el contenido de glucógeno en el manto dependiendo de las zonas de mayor densidad de los mismos (3). Según los resultados obtenidos, la existencia de esta distribución asimétrica de ovocitos no es tan importante como para causar una asimetría en el contenido de glucógeno en el tejido del manto.

En las tres partes estudiadas la variación mensual (aumento o descenso) del contenido de glucógeno está prácticamente afectada por el mismo factor. Así, aunque se describió un perfil mensual de variación de las CV en el manto de *M. edulis* (17), los resultados obtenidos soportan que los cambios en el número de CV podrían tener lugar de la misma forma en todo el manto, porque los cambios en el contenido de glucógeno en cada una de las partes estudiadas mantiene el mismo patrón de variación.

Dos hechos merecen especial atención:

A) El contenido de glucosa libre tisular fue similar en las partes V y D del manto, y prácticamente constante en la parte C. El perfil de variación de las partes V y D mostró una correlación opuesta al contenido de glucógeno, alcanzando el valor mínimo cuando el nivel de glucógeno fue máximo, y los valores máximos de glucosa se obtuvieron cuando las reservas de glucógeno comenzaban a descender. Este hecho pone de manifiesto la posible existencia de una glucogenogénesis y una glucogenolisis en el manto de *M. galloprovincialis*, dependiente de la variación estacional, coincidiendo con los resultados obtenidos en *M. edulis* (7, 8). Además, la constancia en los niveles de glucosa libre en la parte central, podría ser un reflejo de la actividad de algún tipo de mecanismo homeostático que regulase los niveles tisulares del monosacárido.

B) La actividad glucosa-6-fosfato fosfatasa no fue significativa durante el período estacional estudiado. Este hecho sugiere que la glucosa que rendiría el sistema efector glucogenolítico no procede de G6P.

Por tanto, los resultados obtenidos conducen a plantear las siguientes cuestiones que requieren posterior desarrollo experimental: a) La posible existencia de un factor regulador de los niveles de glucosa libre tisular; b) si este factor existe, precisar su naturaleza endocrina o no endocrina; y c) la determinación del metabolito que constituye la expresión final del sistema efector glucogenolítico en *Mytilus galloprovincialis*, y la posibilidad de obtener glucosa libre a partir del mismo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por dos ayudas para el fomento de la investigación científica y técnica de la Xunta de Galicia (España): I-30/87 (Consellería de Educación y Ordenación Universitaria) y 1/88 (Consellería de Pesca).

Resumen

Se determina el contenido de glucógeno y glucosa libre en las partes ventral, central y dorsal, y la actividad glucosa-6-fosfato fosfatasa en el manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. durante el período estacional mayo-septiembre. El contenido en glucógeno del manto no manifiesta distribución asimétrica entre las tres partes. En el período estudiado, se encuentra un perfil típico en la variación del contenido de este polisacárido, siendo máximo en julio. El contenido en glucosa libre tisular es similar en las tres partes del manto, y el perfil de variación estacional es opuesto al del contenido de glucógeno, alcanzando el mínimo en julio. Para cada parte del manto la razón de glucosa libre/glucógeno muestra perfiles similares mensualmente, donde el 50 % de la razón se encuentra en julio. En el tejido del manto no se observa actividad glucosa-6-fosfato fosfatasa.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*, Glucógeno, Glucosa-libre.

Bibliografía

1. Bergmeyer, H. U. y Bernt, E.: En «Methods of Enzymatic Analysis» (H. U. Bergmeyer, ed.), Academic Press, Nueva York, 1974, pp. 123-130.
2. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 245-248, 1976.
3. Crespo, C. A.: En «Histofisiología de las reservas bioenergéticas del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.». Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Santiago de Compostela, 1988.
4. DeZwaan, A. y Zandee, D. I.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 43 A, 53-58, 1972.
5. Gabbott, P. A.: *9th Eur. Symp. Mar. Biol.*, University Press, Aberdeen, 1975, pp. 191-211.
6. Gabbott, P. A.: En «The Mollusca» (K. M. Wilbur, ed.). Academic Press, Inc. Nueva York, 1983, vol. 2, pp. 196-201.
7. Gabbott, P. A., Cook, P. A. y Whittle, M. A.: *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 895-898, 1981.
8. Gabbott, P. A. y Whittle, M. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 83 B, 197-207, 1986.
9. Gabbott, P. A., Whittle, M. A., Head, E. J. H. y Runham, N. W.: *3rd Eur. Soc. Comp. Biochem. Physiol. Meet.*, Amsterdam, 1981, pp. 109-110. Abstr.
10. Gierow, P. y Gergil, B.: En «Methods in Enzymology», Academic Press, Inc., Nueva York, 1982, pp. 44-47.
11. Kepler, D. y Decker, K.: En «Methods of Enzymatic Analysis» (H. U. Bergmeyer, ed.). Academic Press, Nueva York, 1974, vol. 3, pp. 1127-1131.
12. Lubet, P., Herlin, G., Mathieu, M. y Collin, F.: *Haliotis*, 7, 59-62, 1976-78.
13. Sanjuán, A., Quesada, H., Zapata, H. y Álvarez, G.: *Acta Cient. Compos.* (en prensa), 1987.
14. Sokal, R. R. y Rolf, F. J.: *Biometry*. Freeman. San Francisco, 1975.
15. Whittle, M. A. y Gabbott, P. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 83 B, 201-214, 1986.
16. Zaba, B. N.: *Mar. Biol. Letters*, 2, 67-74, 1981.
17. Zaba, B. N.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 70 B, 689-695, 1981.

