REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGÍA, 45 (4), 349-356, 1989

Efecto de la hipoxia sobre la glucolisis en músculo aductor y hepatopáncreas del mejillón marino *Mytilus galloprovincialis* Lmk*

I. Ibarguren, J. A. Villamarín, R. Barcia y J. I. Ramos-Martínez**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Farmacia
15780 Santiago de Compostela

(Recibido el 29 de marzo de 1989)

I. IBARGUREN, J. A. VILLAMARÍN, R. BARCIA and J. I. RAMOS-MARTINEZ. *Effects of Hypoxia on the Glycolysis from Adductor Muscle and Hepatopancreas of the Sea Mussel* Mytilus galloprovincialis *Lmk*. Rev. esp. Fisiol., 45 (4), 349-356, 1989.

Concentrations of glycolytic intermediates and adenine nucleotides have been estimated in adductor muscle and hepatopancreas from the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. after various periods of valve closure. Mass action ratios of enzyme steps involved in the metabolism of these components are compared with their equilibrium constants. This reveals hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase and fructose-1,6-bisphosphatase catalyze non-equilibrium reactions. The changes in the concentrations of the glycolytic intermediates and in the rate M.A.R./Keq during hypoxia suggest that the carbon flow after valve closure is first controlled by phophofructokinase, but later on the rate of transformation of phospho*enol*pyruvate regulates this flow.

Key words: Glycolysis, Hypoxia, Hepatopancreas, Adductor muscle, Mytilus.

El glucógeno es la principal fuente de energía en los distintos tejidos del mejillón durante el proceso de cierre de las valvas (3,22); sin embargo, la ruta glucolítica y su regulación en moluscos bivalvos sésiles muestra algunas diferencias respecto a la de otros tejidos animales (14). Las más notables son la ausencia de efecto Pasteur (4, 20), y la acumulación de succinato y propionato en vez de lactato (2), cuando tiene lugar la transición aerobiosis/hipoxia (descenso de la pO_2) que se produce como consecuencia del aislamiento del cuerpo del molusco al descender la marea.

El músculo aductor de mejillón es el responsable del cierre de las valvas, mientras que el hepatopáncreas parece jugar un papel más digestivo que el estrictamente hepático, función aparentemente imitada por el manto. Según STOREY (17), de acuerdo con las variaciones de las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P_2) durante la hipoxia, debería pro-

* Trabajo realizado con ayuda de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (C.I.C.Y.T. nº PB 86/0437).

** A quien debe dirigirse la correspondencia: Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago. 27080 Lugo.

ducirse una ralentización del flujo a través de la ruta glucolítica en todos los tejidos que no fuesen el músculo aductor, mientras que en éste debería producirse una aceleración.

La determinación de las concentraciones de los intermediarios glucolíticos con el tiempo de hipoxia, así como la medida de las actividades de las enzimas de la ruta, han sido los criterios utilizados en este trabajo, con el fin de conocer los puntos de control, y discutir el comportamiento de la glucolisis en los dos tejidos durante la transición aerobiosis/hipoxia.

Material y Métodos

Animales. — Se utilizaron mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk. procedentes de la Ría de Arosa (Pontevedra, España), que fueron recogidos durante los meses de octubre y noviembre de 1988. Se seleccionaron animales con longitudes de concha entre 7 y 9 cm en su eje mayor. Los moluscos se mantuvieron durante 3 días en acuarios de agua de mar estéril y en la proporción de un animal por litro de agua. La hipoxia fue provocada mediante la retirada del agua de mar. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 15° C.

Preparación de los homogenados. — Los tejidos fueron rápidamente extraídos, pesados e introducidos en nitrógeno líquido, cuidando que el tiempo consumido en el conjunto de operaciones no excediese de 20 segundos. Los tejidos congelados fueron homogenizados con dos volúmenes de ácido perclórico al 5 % conteniendo etanol al 20 %. La homogenización se realizó en un potter de vidrio-teflón previamente enfriado. El precipitado obtenido fue eliminado mediante centrifugación a 30.000 *g* durante 15 min, y a continuación, el sobrenadante fue neutralizado con carbono potásico 5 M.

Para la determinación de Fru-2,6-P_2, los tejidos se homogenizaron con 10 volúmenes de una solución caliente (80° C) de NaOH 50 mM. Después de una incubación de 10 min a 80° C, las muestras fueron neutralizadas y centrifugadas. Alícuotas del sobrenadante se utilizaron para la determinación de Fru-2,6-P_2.

Para la determinación de las actividades enzimáticas, los tejidos frescos fueron homogenizados con 9 volúmenes de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7.5), conteniendo EDTA 2 mM y ditiotreitol 1 mM. Después de una centrifugación de 30 min a 30.000 *g* los sobrenadantes fueron usados para los distintos ensayos de determinación de la actividad enzimática.

Determinación de los intermediarios metabólicos. — Las concentraciones de glucosa-6-fosfato (G-6-P), fructosa-6-P (Fru-6-P), fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-P_2), dihidroxiacetona fosfato (DAP) y D-gliceraldehido-3-fosfato (G-3-P) fueron determinadas por los métodos de Michal (12,13) las de fosfo*enol*piruvato (PEP) y piruvato (PYR) por los de Lamprecht y Heinz (10,11), y las ATP, ADP y AMP fueron determinados según las técnicas de Jaworek y Welsch (8, 9).

La concentración de Fru-2,6-P_2 fue determinada mediante el método descrito por Van Schaftingen (18).

Determinación de las actividades enzimáticas. — Todas las actividades fueron valoradas espectrofotométricamente siguiendo los cambios de absorbancia de NADH o NADPH a 340 nm. El tampón usado en todos los ensayos fue trietanolamina-ClH 50 mM (pH 7.5). Otros componentes de las distintas mezclas de reacción fueron:

Hexoquinasa (HK) (EC 2.7.1.1): glucosa 200 mM, ATP 1 mM, Cl_2Mg 2 mM, $NADP^+$ 0,3 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Glucosa fosfato isomerasa (PGI) (EC 5.3.1.9): fructosa-6-fosfato 1,5 mM, $NADP^+$ 0,6 mM, Cl_2Mg 6,8 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Fosfofructoquinasa (PFK) (EC 2.7.1.11): ATP 0,5 mM, fructosa-6-fosfato 4 mM, NADH 0,1 mM, Cl_2Mg 5 mM y aldolasa, triosafosfato isomerasa y glicerofosfato deshidrogenasa.

Fructosa bisfosfato aldolasa (ALD) (EC 4.1.2.13): fructosa-1,6-bisfosfato 1,2 mM, NADH 0,12 mM, triosafosfato isomerasa y glicerofosfato deshidrogenasa.

Tiosafosfato isomerasa (TIM) (EC 5.3.1.1): gliceraldehido-3-fosfato 0,5 mM, NADH 0,12 mM y glicerofosfato deshidrogenasa.

Piruvato quinasa (PK) (EC 2.7.1.40): ADP 1,5 mM, SO_4Mg 10 mM, CIK 100 mM, NADH 0,2 mM, fosfo*enol*piruvato 1,4 mM y lactato deshidrogenasa.

Fructosa bisfosfatasa (FBPasa) (EC 3.1.3.11): $NADP^+$ 0,2 mM. fructosa-1,6-bisfosfato 0,02 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Las enzimas auxiliares (Sigma), fueron añadidas en exceso a las distintas mezclas de reacción.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de sustrato por minuto, en las condiciones de ensayo anteriormente indicadas.

Cálculos estadísticos. — Los resultados se expresan como media y desviación estándar para el número de determinaciones realizadas (n). Las diferencias significativas entre medias fueron verificadas con el test de la *t* de Student.

Resultados y Discusión

Las concentraciones de los distintos intermediarios glucolíticos en músculo aductor y hepatopáncreas de *Mytilus galloprovincialis* Lmk., cuando el molusco se encuentra sumergido (tiempo 0), son mayores que los detectados en manto del mismo animal (resultados no publicados), en músculo aductor de *M. edulis* L. (5), y de la misma magnitud que los obtenidos en hepatopáncreas (1) de *M. edulis* L. (figura 1).

En la tabla I se muestran las velocidades máximas y los valores de las relaciones entre los cocientes de acción de masas y las constantes de equilibrio (M.A.R./Keq), de las enzimas ensayadas en ambos tejidos, en situación de aerobiosis (sumergidos). Las reducidas actividades HK, PFK, PK, FBPasa sugieren que estas enzimas deben constituirse en los puntos de control de la ruta glucolítica. Según ROLLESTON (15), cuando el cociente M.A.R./Keq, para una determinada reacción, es menor de 0,05, la reacción se encuentra alejada del equilibrio, y por tanto la enzima que la cataliza es susceptible de poseer carácter regulador. Este parece ser el caso de las reacciones catalizadas por la PFK y PK en ambos tejidos. Por contra, cuando el cociente M.A.R./Keq es mayor de 0,2, el dato es indicativo de que la enzima cataliza una reacción próxima al equilibrio.

No se han determinado las concentraciones de glucosa libre y Pi en ambos tejidos, por lo que, en la tabla I, los cocientes de M.A.R/Keq se muestran dependientes de las concentraciones de dichos compuestos. Este hecho, sin embargo, no afecta a la consideración que tanto FBPasa como HK, catalizan reacciones alejadas del equilibrio. Respecto a la FBPasa, la obtención de cocientes M.A.R./Keq menores de 0,05 requeriría concentraciones de Pi menores de 153 y 53 µM para el músculo aductor y hepatopáncreas, respectivamente; mientras que respecto a la HK, las concentraciones requeridas de glucosa libre serían mayores de 1,57 y 6,7 µM respectivamente, para músculo aductor y hepatopáncreas.

Los valores de los cocientes M.A.R/Keq para la TIM, parecen sugerir que la enzima cataliza una reacción alejada del equilibrio; sin embargo, la elevada actividad enzimática detectada en los dos tejidos, así como las altas concentraciones de DAP y G-3-P parecen oponerse a la ad-

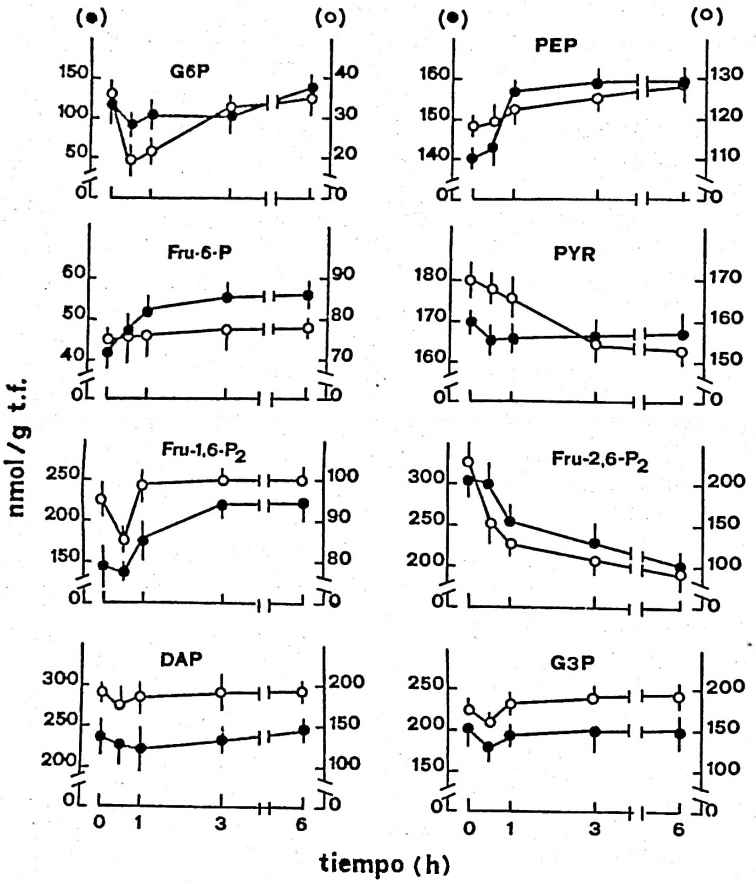

Fig. 1. *Cambios de las concentraciones de los intermediarios glucolíticos durante 6 horas de cierre de las valvas.*

Se representan la media y la desviación estándar (barra) de 12 ensayos (n = 12). Los valores se muestran en nmoles por gramo de peso fresco, con excepción de la Fru-2,6-P_2 que son pmoles/g p.f. (●) Músculo aductor. (○) Hepatopáncreas.

judicación a la enzima del carácter regulador, que, sin embargo posee la TIM de hígado de rata (6,19).

La figura 1 muestra la variación de las concentraciones de los distintos intermediarios glucolíticos con el tiempo de cierre de las valvas (6 horas, tiempo máximo de exposición al aire del molusco). En ambos tejidos y durante los primeros treinta minutos posteriores al cierre de las valvas, se produce un descenso de las concentraciones de G-6-P, Fru-1,6-P_2, DAP y G-3-P, para posteriormente, a medida que aumenta el tiempo de hipoxia, recuperar, e incluso superar (Fru-1,6-P_2 en músculo aductor), los valores obtenidos en tiempo cero; por contra las concentraciones de Fru-6-P y PEP incrementan su concentración a lo largo del tiempo de cierre de las valvas. Las concentraciones de PYR y Fru-2,6-P_2 descienden paulatinamente a medida que aumenta el tiempo de hipoxia. En conjunto, el comportamiento de la ruta es compatible con una inhibición de la PFK durante los instantes iniciales posteriores al cierre de las valvas y una recuperación de la actividad al proseguir el estado de hipoxia. Respecto a la PK, se pro-

Tabla I. *Actividades máximas y cocientes M.A.R./Keq de las enzimas estudiadas.*
Las actividades enzimáticas se presentan como la media de 4 determinaciones, y se expresan en U.I. por gramo de peso fresco a pH 7,5 y 20 °C. M.A.R. se obtuvo a partir de los valores que se muestran en la figura 1 (tiempo 0). Las constantes de equilibrio (Keq) fueron tomadas de CAMESELLE *et al.* (1).

Enzimas	Keq	MAR/Keq		Actividad enzimática	
		M	H	M	H
HK	322	0,076/GLU*	0,33/GLU*	0,86	0,93
PGI	0,43	0,813	4,98	8,81	5,87
PFK	312	$2,3 \times 10^{-3}$	0,012	3,89	3,50
ALD	63×10^{-6}(M)	$5,3 \times 10^{6}$(M)	$5,5 \times 10^{6}$(M)	5,55	2,80
TIM	22	0,057	0,049	15,58	72,21
PK	$1,57 \times 10^{4}$	$3,7 \times 10^{-4}$	$0,29 \times 10^{-4}$	17,69	10,34
FBPasa	859	$3,6 \times 10^{-4} \times Pi^{\#}$	$9,2 \times 10^{-4} \times Pi^{\#}$	0,40	0,47

* Expresado en función de la concentración de glucosa libre (GLU) (No determinada). # Expresado en función de la concentración no determinada de Pi. (M) es músculo aductor; (H) es hepatopáncreas. KH = Hexoquinasa; PGI = Glucosa fosfato isomerasa; PFK = Fosfoructokinasa: ALD = Fructosa bisfosfato aldolasa; TIM = Triosafosfato isomerasa: PK = Piruvato kinasa; FBPasa = Fructosa bisfosfatasa.

duce una progresiva inhibición de la enzima con el tiempo de cierre de las valvas. Esta misma sugerencia se deduce de los datos que se muestran en la figura 2 en la cual se observa que a medida que transcurre el tiempo de hipoxia se produce un acercamiento al valor de 0,05 del cociente M.A.R./Keq para la PFK, y una disminución de dicho cociente para PK.

La disminución de las concentraciones de Fru-2,6-P_2 detectadas en los dos tejidos, no es incompatible con la recuperación del flujo a través de la PFK, puesto que el fosfoester fluctúa a lo largo del tiempo de hipoxia entre concentraciones, que en unión con el AMP, muestran un notable poder activador sobre la PFK (20). La PFK se encuentra inhibida durante los primeros instantes posteriores al cierre de las valvas debido al descenso del pH del medio (20,21). La reactivación posterior tiene lugar mediante la acción sinérgica de la Fru-2,6-P_2 y el AMP, el cual incrementa su concentración con el tiempo de cierre de las valvas (figura 3) alcanzando rápidamente la capacidad saturante de activación (20).

La inhibición progresiva de la PK a lo

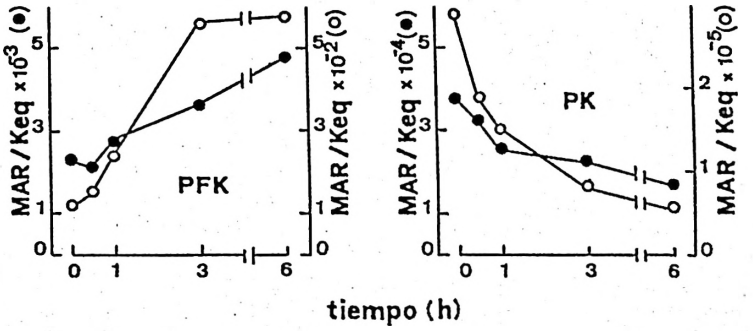

Fig. 2. *Variación de los cocientes M.A.R./Keq correspondientes a fosfofructoquinasa y piruvato quinasa con el tiempo de cierre de las valvas.*
Los valores de M.A.R. se calcularon a partir de los datos de la figura 1. Las constantes de equilibrio (Keq) fueron tomadas de CAMESELLE *et al.* (1). (●) Músculo aductor. (○) Hepatopáncreas.

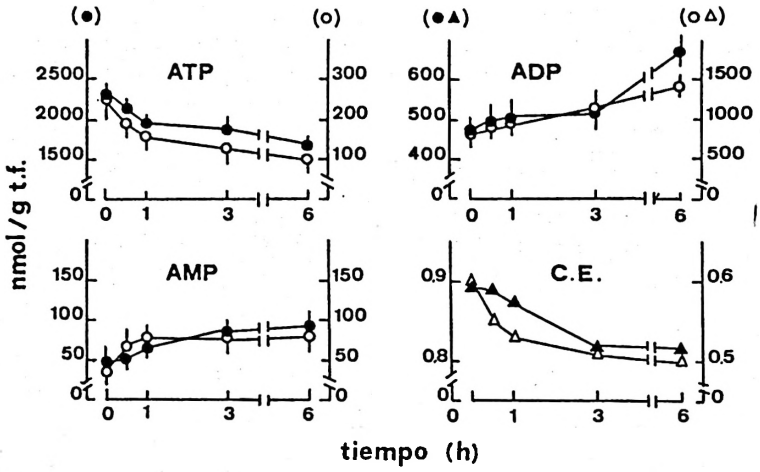

Fig. 3 *Variación de la Carga Energética (C.E.) y las concentraciones de nucleótidos de adenina con el tiempo de cierre de las valvas.*
Se presenta la media y desviación estándar (barra) de 12 determinaciones (n = 12). Los valores se muestran en nmoles/g p.f. (●) Músculo aductor. (○) Hepatopáncreas.

largo del tiempo de hipoxia, es similar a la detectada en otros tejidos del mejillón *M. edulis* L. que es adjudicada a un proceso de fosforilación de la enzima (7,16) y a la acción inhibitoria de la alanina que se genera por transaminación a partir del PYR y aspartato (3).

El conjunto de resultados obtenidos parecen indicar que la ruta glucolítica en hepatopáncreas y músculo aductor del mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk. durante el tiempo de cierre de las valvas, está controlada por las actividades PFK y PK, sin embargo dicho papel regulador debe ser confirmado con estudios sobre la capacidad de modulación de ambas enzimas, investigaciones ya iniciadas en nuestro laboratorio (20).

Resumen

Después de varios períodos de cierre de las valvas, se valoraron las concentraciones de intermediarios glucolíticos y nucleótidos de adenina en músculo aductor y hepatopáncreas del mejillón marino *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Se comparan las constantes de equilibrio de las enzimas implicadas con sus correspondientes cocientes de acción de masas, resultando que hexoquinasa, fosfofructoquinasa, piruvato-quinasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa catalizan reacciones alejadas del equilibrio. Los cambios de las concentraciones de los intermediarios glucolíticos, así como la variación de los cocientes M.A.R./Keq con el tiempo de hipoxia, sugieren que, durante los primeros instantes posteriores al cierre de las valvas, el flujo es controlado por la fosfofructoquinasa, mientras que en hipoxia prolongada este papel es verificado por la velocidad de conversión del fosfoenolpiruvato.

Palabras clave: Glucolisis, *Mytilus*.

Bibliografía

1. Cameselle, J. C., Sánchez, J. L. y Carrión, A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B, 95-102, 1980.
2. De Zwaan, A.: En «The Mollusca» (Hochachka, P. W. ed.) Academic Press. Nueva York, 1983, vol. 1, pp 137-174.
3. De Zwaan, A. y Zandee, D. I.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 43B, 47-54, 1972.
4. Ebberink, R. H. M.: *Mol. Physiol.*, 2, 345-355, 1982.
5. Ebberink, R. H. M. y De Zwaan, A.: *J. Comp. Physiol.*, 137, 165-171, 1980.
6. Greembaum, A. L., Gumaa, K. A. y McLean, P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 617-663, 1971.

7. Holwerda, D. A. y Veenhof, P. R.: *Abstr. 3th. Congr. Eur. Soc. Comp. Physiol. and Biochem.* Noordwijkerhout, Pergamon Press, 1981, pp 120-121.
8. Jaworek, D. y Welsch, J.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 7, pp 340-358.
9. Jaworek, D. y Welsch, J.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 7, pp 365-378.
10. Lamprecht, W. y Heinz, F.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 6, pp 555-561.
11. Lamprecht, W y Heinz, F.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 6, pp 555-561.
12. Michal, G.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 6, pp 191-198.
13. Michal, G.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 6, pp 570-577.
14. Newsholme, E. A. y Start, C.: Regulation in metabolism. Wiley. Nueva York, 1973.
15. Rolleston, F. S.: *Curr. Top. Cell. Reg.*, 5, 47-75, 1972.
16. Storey, K. B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 235, 665-672, 1984.
17. Storey, K. B.: *FEBS Lett.*, 181, 245-248, 1985.
18. Van Schaftingen, E.: En «Methods of enzymatic analysis» (Bergmeyer, H. U. ed.) Verlag Chemie, Basilea, 1984, vol. 6, pp 335-341.
19. Veech, R. L., Raijman, L., Dalziel, K. y Krebs, H. A.: *Biochem. J.*, 115, 836-842, 1969.
20. Villamarín, J. A.: «Fosfofructoquinasa en *Mytilus galloprovincialis* Lmk.» Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela, 1989.
21. Wijsman, T. C. M.: *Proc 9th Europ. Mar. Biol. Symp.* (Barnes, H. ed.) Aberdeen University Press, Aberdeen, 1975, pp 139-149.
22. Zurburg, W. y Kluytmans, J. H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B, 317-322, 1980.