

Efectos metabólicos de la exposición al aire y respuesta postaérea en el antozoo intermareal *Actinia equina* L.

E. Navarro y M. M. Ortega

Departamento de Biología (Fisiología Animal)
Facultad de Ciencias
Universidad del País Vasco
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 12 de abril de 1985)

E. NAVARRO and M. M. ORTEGA. *Metabolic Effects of Air Exposure and Post-Aerial Response in the Intertidal Anthozoa Actinia equina* L. Rev. esp. Fisiol., 41, 471-478. 1985.

Metabolic adjustments occurring during air exposure have been studied in a population of *Actinia equina* submitted to long-lasting emersion periods. Oxygen consumption upon reimmersion seems to account for the discharge of an oxygen debt related to the accumulation of end-products derived from anaerobic pathways. Incorporation of radioactive labelled glucose into both submerged and air exposed animals has allowed identification of these final products. A correspondence between the length of exposure-time and the amount of oxygen debt is encountered, which parallels the evolution of the rate of radioactivity incorporation into aminoacids. Increasing levels of amino acid synthesis from glucose in the exposed conditions appear as the main metabolic feature.

Key words: *Actinia equina*, Amino acid accumulation, Anthozoal, Oxygen debt, Post-aerial response.

En los antozoos litorales, la fase de emersión se caracteriza por una transición del estado expandido al contraído, con dos finalidades primordiales: retener agua en la cavidad gastrovascular y reducir la superficie de evaporación (6, 21). La pérdida de los tentáculos y la gastrodermis como áreas de intercambio de gases aparece como el principal factor responsable del descenso de la tasa respiratoria en aire característico de este grupo, supuesto que dicho descenso se produce igualmente en ejemplares sumergidos de anémonas en estado contraído (16, 19). Este conjunto de observaciones indica

que la difusión de oxígeno a los tejidos internos puede constituir un factor limitante en la respiración aérea de estas especies, directamente relacionado con el problema de la desecación.

El recurso a la anaerobiosis durante la fase de bajamar es un tema bien establecido en muchos representantes de la fauna intermareal (1, 2, 10, 17, 22, 23). Sin embargo, existen pocos datos que ilustren un fenómeno de esta naturaleza en antozoos. SHICK *et al.* (19) refieren la descarga de una deuda de oxígeno en el período postaéreo de la especie intermareal *Metridium senile*, y SHICK (18)

calcula, en base a comparar estimaciones calorimétricas y respirométricas de la actividad metabólica, que en torno al 20 % de la energía utilizada por *Actinia equina* en los períodos de emersión es de origen anaeróbico.

Al mismo tiempo, la interpretación del papel funcional desempeñado por los productos de la anaerobiosis reviste especiales características en este grupo, donde la desecación constituye el principal factor de estrés (3). La acumulación de aminoácidos durante la exposición al aire ha sido descrita en *A. equina* y otras especies de antozoos (5, 14). El interés de este fenómeno reside en el carácter multifuncional que presenta la síntesis de tales productos cuando se considera asociada al catabolismo de glucosa. Además de servir a la producción anaeróbica de energía (4, 8) puede estar implicada en la constitución de un *pool* activo frente a la desecación e, incluso, servir como mecanismo de desintoxicación del amonio que no puede ser excretado en el período de emersión.

El presente trabajo da cuenta de algunos ajustes metabólicos correspondientes a la exposición al aire del antozoo intermareal *A. equina*. La naturaleza de estos ajustes se ha investigado por una doble vía: estudio de la respuesta respiratoria que sigue a períodos variables de emersión, y análisis de la utilización metabólica de glucosa en dichos períodos por métodos de trazado radiactivo.

Material y Métodos

Los ejemplares de *A. equina* utilizados se recogieron en la zona rocosa de la playa de Sopelana (Vizcaya). El punto de recogida corresponde, aproximadamente, al límite superior de la distribución vertical de la especie en dicha zona, con tiempos de exposición al aire comprendidos entre 12 y 16 h/día. En el laboratorio, se disponían en acuarios con

agua recirculante, donde permanecían aproximadamente 12 h.

Los animales destinados a estimar la respuesta postaérea se exponían al aire durante períodos variables (de 1 a 9 h), dentro de respirómetros individuales de 150 ml, provistos de agitación magnética en la base. Seguidamente se llenaban de agua saturada con aire, se cerraban y se disponían en un baño con termostato. El consumo de oxígeno durante la primera hora de respuesta postaérea se establecía por referencia a un control, valorando la concentración de oxígeno por un método micro-Winkler (7). Los datos individuales de tasa metabólica ($\dot{V}O_2 = \mu\text{l O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se trataban mediante análisis de regresión frente al peso (regresión lineal, previa transformación logarítmica). Las ecuaciones resultantes se sometían a un test de paralelismo, ANCOVA (20), para contrastar la significación estadística de las diferencias entre coeficientes de regresión (13, 15).

Las incubaciones con glucosa radiactiva se efectuaron *in vivo*. Cada animal de peso fresco comprendido entre 0,5 y 1 g, recibía 5 μCi de glucosa- C^{14} [$\text{D-U}^{14}\text{C}$]glucose, sp.act. 2-4 mCi/mM, Amersham], inyectando 50 μl directamente en la cavidad gastrovascular, mediante una jeringa Hamilton. Completada la incubación, los animales eran homogenizados en 2 ml de etanol 80 %, extraídos 2 h a temperatura ambiente y los extractos centrifugados. El precipitado se llevó a peso seco (90°C durante 48 h) y el sobrenadante fue sometido a un proceso de fraccionamiento mediante resinas de intercambio iónico (9). La radiactividad incorporada a las fracciones de aminoácidos y ácidos carboxílicos se determinó en c.p.m., en un contador ABAC-SL 40 Intertechnique.

Resultados

Respuesta respiratoria postaérea. Los parámetros de las ecuaciones de regre-

Tabla I. Resumen de las rectas de regresión para la respiración acuática postaérea. h = horas de exposición al aire; n = número de ejemplares, a = ordenada en el origen; b' = pendiente; r = coeficiente de correlación; \bar{a} = valores de a recalculados según las pendientes ponderadas: controles (o h); \bar{b} = -0,7402 y expuestos al aire \bar{b} = -0,9427.

T (°C)	h	n	a ± (DE)	b' (± DE)	r	\bar{a}
10	0	26	4,16 ± 0,23	-0,76 ± 0,11	-0,81	4,03
	1	8	4,51 ± 0,42	-0,88 ± 0,20	-0,84	4,61
	3	9	4,39 ± 0,37	-0,75 ± 0,19	-0,80	4,77
	6	12	5,86 ± 0,85	-1,45 ± 0,41	-0,71	4,81
	9	10	5,94 ± 0,66	-1,56 ± 0,35	-0,82	4,75
20	0	35	4,35 ± 0,18	-0,69 ± 0,08	-0,81	4,39
	1	10	4,90 ± 0,34	-0,94 ± 0,17	-0,87	4,91
	3	23	5,40 ± 0,48	-1,12 ± 0,23	-0,71	5,03
	6	28	5,45 ± 0,29	-1,16 ± 0,14	-0,84	5,00
	9	17	5,31 ± 0,31	-1,10 ± 0,15	-0,87	4,99
30	0	32	4,41 ± 0,19	-0,63 ± 0,09	-0,77	4,55
	1	12	4,99 ± 0,30	-0,92 ± 0,15	-0,87	5,04
	3	11	4,76 ± 0,38	-0,79 ± 0,19	-0,78	5,08
	6	12	5,22 ± 0,41	-0,98 ± 0,20	-0,81	5,15
	9	10	5,34 ± 0,52	-1,08 ± 0,28	-0,79	5,09

sión para la relación logarítmica entre $\dot{V}O_2$ ($\mu\text{l O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y el tamaño (mg de peso seco) se muestran en la tabla I. En cada serie de ecuaciones para distintos períodos de exposición previa al aire (1 a 9 h), el valor absoluto de la pendiente (b') tiende a incrementarse en relación directa al tiempo de exposición. Sin embargo, el test de paralelismo indica que dicha tendencia carece de significación estadística, incluso cuando se aplica al conjunto de rectas de regresión para animales expuestos (3 temperaturas). Las diferencias entre pendientes resultan, no obstante, significativas ($P < 0,05$) para la totalidad de las ecuaciones de regresión (control + expuestos; tabla II). Los resultados de este análisis autorizan el empleo de un coeficiente ponderado de regresión para el conjunto de datos de respiración postaérea ($\bar{b} = -0,9427$); significativamente distinto del $-0,7184$ calculado para la respiración acuática en animales continuamente sumergidos (11), que será aplicado a los controles.

El cálculo de tasas metabólicas normalizadas se ha realizado, para tres tamaños estándar (30, 100 y 300 mg de peso seco), de acuerdo con la expresión:

$$\log Y_1 = \bar{a} + \bar{b} \log X_1;$$

donde Y_1 representa la tasa metabólica normalizada; X_1 , el peso del animal estándar; y a y b, la ordenada en el origen y pendiente ponderadas, respectivamente (tabla I). El examen de estos datos (tabla III) pone de manifiesto un marcado efecto del tamaño sobre la amplitud de la respuesta respiratoria postaérea, que viene dado por la elevación de las pendientes inversas inducida por la exposición previa al aire. En la figura 1 se muestra este fenómeno al representar la respuesta postaérea, medida a 20°C, como porcentaje de incremento respecto a la tasa metabólica inicial (control). Según se observa no existe proporcionalidad directa entre la magnitud de esta respuesta y el tiempo de exposición,

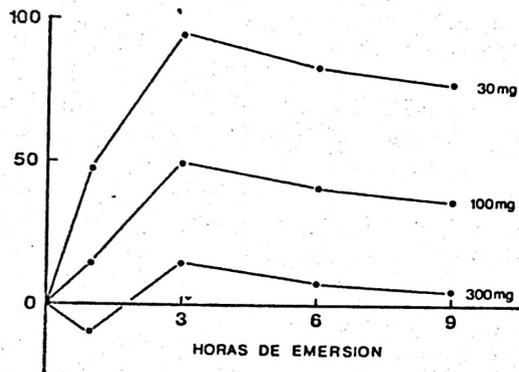


Fig. 1. Respuesta postárea representada como porcentaje de incremento respiratorio respecto de los controles (animales continuamente sumergidos).

Respiración medida a 20°C.

correspondiendo los máximos valores de incremento respiratorio a las fases iniciales (de 1 a 3 h).

La deuda de oxígeno generada durante la emersión se calculó, para los distintos intervalos, como diferencia entre las tasas metabólicas registradas en fase postárea y las correspondientes a los

Tabla II. Análisis de covarianza para contrastar diferencias entre pendientes, dentro de la serie de ecuaciones R-T para ejemplares expuestos al aire y en relación a los controles (continuamente sumergidos) a las mismas temperaturas.

NS = no significativo (significación inferior al 95 %).

Términos	Fs.	g.l.	Significación
Expuestas 10°C	1,23	3:32	NS
Expuestas 20°C	0,16	3:70	NS
Expuestas 30°C	0,09	3:37	NS
Total expuestas (3 temperaturas)	0,67	11:137	NS
Total = expuestas + controles	1,83	14:224	p < 0,05

controles. Las cifras estimadas a distintas temperaturas (10, 20 y 30°C) no difieren significativamente entre sí, procediéndose, en consecuencia, a calcular valores medios de las tres determinaciones (fig. 2).

Acumulación de intermediarios metabólicos. El estudio del catabolismo de glucosa revela importantes diferencias entre animales control y expuestos al aire. De acuerdo con NAVARRO y ORTEGA (14), tras 9 h de incubación, el 68 % de la glucosa utilizada por las actinias sumergidas aparece como CO₂, frente a un 23 % en los ejemplares expuestos. Tales diferencias se corresponden con un proceso de acumulación de intermediarios metabólicos solubles (aminoácidos + ácidos carboxílicos), que se pone de manifiesto por

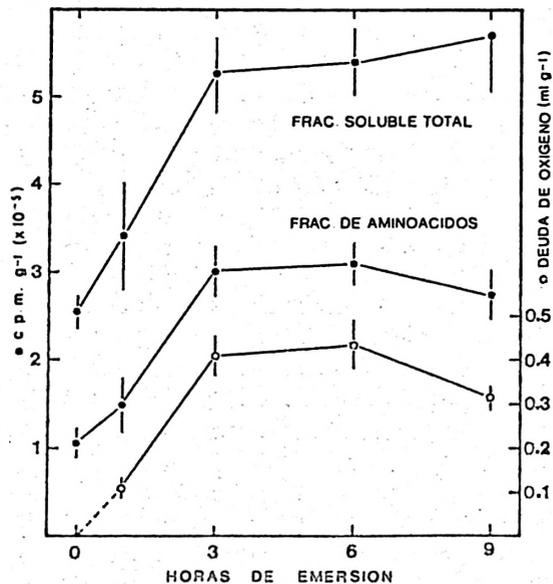


Fig. 2. Evolución conjunta de la deuda de oxígeno y la cifra de radiactividad incorporada a las fracciones soluble total (aminoácidos + ácidos carboxílicos) y de aminoácidos, en función del tiempo de exposición al aire (el tiempo 0 corresponde a los controles). Las líneas verticales representan la desviación estándar.

Tabla III. Valores ($\bar{x} \pm DE$) de la tasa metabólica V_{O_2} ($ml O_2 g^{-1} h^{-1}$), correspondientes a animales de 30, 100 y 300 mg de peso seco. Respiración postaérea.

T (°C)	Peso (mg)	Tiempo de exposición (h)				
		0	1	3	6	9
10	30	0,93 ± 0,15	1,57 ± 0,50	2,25 ± 0,51	2,51 ± 1,53	2,20 ± 0,81
	100	0,41 ± 0,04	0,53 ± 0,05	0,76 ± 0,04	0,85 ± 0,11	0,74 ± 0,11
	300	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,26 ± 0,06	0,29 ± 0,15	0,25 ± 0,15
20	30	2,12 ± 0,24	3,13 ± 0,76	4,13 ± 1,38	3,88 ± 0,78	3,76 ± 0,79
	100	0,93 ± 0,05	1,06 ± 0,06	1,39 ± 0,11	1,31 ± 0,07	1,27 ± 0,08
	300	0,41 ± 0,04	0,37 ± 0,08	0,47 ± 0,12	0,44 ± 0,06	0,43 ± 0,08
30	30	3,04 ± 0,39	4,24 ± 0,88	4,95 ± 1,19	5,46 ± 1,60	4,81 ± 1,33
	100	1,34 ± 0,07	1,43 ± 0,09	1,75 ± 0,08	1,85 ± 0,12	1,62 ± 0,18
	300	0,59 ± 0,07	0,48 ± 0,09	0,53 ± 0,13	0,62 ± 0,16	0,55 ± 0,27

una clara intensificación de la incorporación de C^{14} a estos productos (fig. 2). El porcentaje más elevado de variación entre animales control y expuestos se debe a la fracción de aminoácidos (fig. 2), indicando que su síntesis a partir de glucosa constituye el fenómeno característico de la emersión.

La evolución de la cifra de radiactividad incorporada a los aminoácidos, con el tiempo de exposición al aire, revela una notable similitud con la correspondiente a la deuda de oxígeno (fig. 2).

Discusión

En *A. equina*, la exposición al aire determina una reducción del consumo de oxígeno (6, 13); más intensa en los ejemplares menores, según se desprende de cifras más elevadas del exponente del peso en la respiración aérea (12, 13). Al mismo tiempo, la respuesta postaérea se caracteriza por un incremento respiratorio que, en términos de tasa metabólica, es altamente dependiente del tamaño. El cambio en el exponente del peso —de 0,29 ($b' = -0,71$), en la respiración acuática normal, a 0,06 ($b' = -0,94$),

en la postaérea— implica que dicho incremento es muy acusado en los ejemplares menores, en los que la cifra de respiración en el período inmediato de reinmersión puede llegar a duplicar el valor de rutina para el metabolismo acuático (fig. 1).

Este fenómeno respiratorio presenta las características de una deuda de oxígeno, planteando la existencia de un déficit metabólico durante la emersión. Siendo el resultado de limitaciones para la difusión del oxígeno a los tejidos internos, este déficit aparece intensificado en los ejemplares menores, debido probablemente a una reducción comparativamente más importante de su superficie respiratoria en la adopción del estado contraído: en *Metridium senile*, con un comportamiento respiratorio similar, la fracción de superficie desarrollada por la corona tentacular presenta máximos valores en animales pequeños (19). Consecuentemente, la deuda generada en el período de exposición al aire está en relación inversa con el tamaño.

La acumulación de intermediarios metabólicos, indicativa de la transición parcial a la anaerobiosis durante la emersión, parece consistente con una interpretación

de la respuesta postaérea como deuda de oxígeno de base metabólica. El efecto de la temperatura sobre esta respuesta corrobora lo anterior. Mientras el metabolismo respiratorio es dependiente de la temperatura, la cifra calculada como deuda de oxígeno es termoindependiente, sugiriendo la existencia de una magnitud constante que, obviamente, puede identificarse con el oxígeno adicional requerido en la oxidación de productos finales del metabolismo anaeróbico.

Por otra parte, la respuesta metabólica correspondiente a la exposición al aire se limita aproximadamente a las tres primeras horas (fig. 2), dato de enorme significación en cuanto al papel funcional desempeñado por las vías de síntesis de aminoácidos a partir de glucosa. Se ha destacado, como función prioritaria de dichos procesos, la producción anaeróbica de energía (4, 5), pero tal interpretación resulta difícilmente compatible con una dinámica de acumulación que implica el cese en la producción de aminoácidos, pese a persistir las condiciones de hipoxia. Una interpretación complementaria atribuye a estos productos un papel de gran importancia en su calidad de efectores osmóticos implicados en la retención del agua tisular. El hecho de que se produzca la saturación en las tres primeras horas apoya esta interpretación, al sugerir este período como el tiempo necesario para que los aminoácidos alcancen en los tejidos una concentración que permita mantener la tasa de evaporación dentro de unos niveles aceptables, hasta el momento de la reinmersión.

El conjunto de datos discutidos plantea un mecanismo fisiológico de adaptación, donde las propias condiciones de la exposición al aire, al reducir el grado de intercambio respiratorio, determinan la síntesis de productos de anaerobiosis que, por su carácter, aparecen también asociados a la retención osmótica del agua tisular. Mayores tasas de acumulación en los ejemplares de menor tamaño —como

parece sugerir la existencia de una relación inversa entre la deuda de oxígeno y el peso— servirían para compensar los efectos de una más desfavorable relación superficie/volumen sobre la tasa de evaporación.

Resumen

Se analizan algunos ajustes metabólicos asociados con la exposición al aire, en una población de *Actinia equina* sometida a períodos prolongados de emersión. El tipo de respuesta respiratoria postaérea parece corresponder a la descarga de una deuda de oxígeno de base metabólica. La naturaleza de los metabolitos acumulados en el curso de la emersión se establece comparando el catabolismo de glucosa en animales sumergidos y expuestos al aire, por métodos de trazado radiactivo. La relación entre la magnitud de la deuda de oxígeno y el tiempo previo de emersión muestra un notable paralelismo con la evolución de la cifra de radiactividad incorporada a la fracción de aminoácidos. Se concluye que el incremento de la síntesis de aminoácidos a partir de glucosa constituye el fenómeno metabólico más relevante en los ejemplares de *A. equina* expuestos a la atmósfera.

Bibliografía

1. BARNES, H., FINLAYSON, D. y PIATIGORSKY, J.: *J. Anim. Ecol.*, **32**, 233-252, 1963.
2. BRINKHOFF, W., STOCKMAN, K. y GRISHABER, M.: *Oecologia (Berl.)*, **57**, 151-155, 1983.
3. DAYTON, P. K.: *Ecol. Monogr.*, **41**, 351-389, 1971.
4. DE ZWAAN, A.: *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **15**, 103-187, 1977.
5. ELLINGTON, W. R.: *Mar. Biol. Lett.*, **1**, 255-262, 1980.
6. GRIFFITHS, R. J.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **27**, 141-154, 1977.
7. HOAR, W. S. y HICKMAN, C. P.: *A laboratory companion for general and comparative physiology*. Prentice-Hall, New Jersey, 1975.
8. HOCHACHKA, P. W., FIELDS, J. y MUSTAFÁ, T.: *Amer. Zool.*, **13**, 543-555, 1973.

9. MC MANUS, D. P. y JAMES, B. L.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 51B, 293-297, 1975.
10. MOON, T. W. y PRITCHARD, A. W.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 5, 35-46, 1970.
11. NAVARRO, E.: Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad del País Vasco, 1983.
12. NAVARRO, E., MADARIAGA, J. M. y ORTEGA, M. M.: *Oecologia aquat.*, 5, 53-58, 1981.
13. NAVARRO, E., ORTEGA, M. M. y MADARIAGA, M. M.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 53, 153-162, 1981.
14. NAVARRO, E. y ORTEGA, M. M.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B, 199-202, 1984.
15. ORTEGA, M. M., IGLESIAS, J. I. P. y NAVARRO, E.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 76, 79-87, 1984.
16. ROBBINS, R. E. y SHICK, J. M.: En «Nutrition in the lower metazoa» (D. C. Smith e Y. Tiffon, eds.). Pergamon Press, Oxford, 1980, pp. 101-116.
17. SCHÖTLER, U., SURHOLT, B. y ZEBE, E.: *Mar. Biol.*, 81, 69-73, 1984.
18. SHICK, J. M.: *Mar. Biol. Lett.*, 2, 225-236, 1981.
19. SHICK, J. M., BROWN, W. I., DOLLIVER, E. C. y KAYAR, S. R.: *Physiol. Zool.*, 52, 50-62, 1979.
20. SOKAL, R. R. y ROHLF, F. J.: *Biometry*, Freeman and Co., San Francisco, 1969.
21. STOTZ, W. B.: *Mar. Biol.*, 50, 181-188, 1979.
22. VOOYS, C. G. D. y DE ZWAAN, A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 60A, 343-347, 1978.
23. WIDDOWS, J., BAYNE, B. L., LIVINGSTONE, D. R., NEWELL, R. I. E. y DONKIN, P.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A, 301-308, 1979.

