

Fase oxidativa de la ruta de las pentosas en diversos tejidos de mejillón, *Mytilus edulis* L. *

A. Carrión-Angosto, M. Silva Pando ¹, S. Rodríguez-Segade y M. Ruiz-Amil ²

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago de Compostela
Santiago de Compostela

(Recibido el 28 de julio de 1976)

A. CARRION-ANGOSTO, M. SILVA-PANDO, S. RODRIGUEZ-SEGADE and M. RUIZ-AMIL. *Oxidative Phase of Pentose-phosphate Cycle in Sea Mussel (Mytilus edulis L.) Tissues*. Rev. esp. Fisiol., 33, 265-272. 1977.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.49) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.44) activities measured in tissue extracts from sea mussel exhibit a potential unbalance which could cause an accumulation of 6-phosphogluconate. Nevertheless elevated levels of this metabolite are not detected in mussel tissues.

The Entner-Doudoroff pathway has not been found in hepatopancreas, adductor muscle and gill tissues.

Hepatopancreas glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase apparent kinetic parameters at 25° C, were determined. The enzymes are competitively inhibited by NADPH with respect to NADP⁺. Oxidized Glutathione at nearly physiological concentrations counteracts NADPH inhibition.

La fase oxidativa de la ruta de las pentosas, derivación de la ruta central de la glucólisis, íntimamente relacionada con la obtención del NADPH necesario para las

reducciones biosintéticas, puede tener un importante significado cuantitativo en el metabolismo glucídico de los moluscos. Experimentos realizados en cortes de tejidos de lamelibranquios (1) indican un mayor desprendimiento de C¹⁴O₂ al incubarse con glucosa-1-C¹⁴ que cuando se usa glucosa-6-C¹⁴, lo que parece indicar el funcionamiento del ciclo de las pentosas. Las enzimas de la ruta de las pentosas se han estudiado en el caracol *Limnaea stagnalis* (9). BENNET y NAKADA (1) han determinado las actividades específicas de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato-deshidro-

* Trabajo subvencionado en parte con una beca de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno.

¹ Becario del M.E.C.

² Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid - 3.

genasa (6PGDH) de hepatopáncreas de mejillón encontrando valores varias veces superiores a las actividades catalíticas de algunas de las enzimas de la glucólisis.

Los mismos autores han detectado actividades transcetolasa y transaldolasa confirmando así la operatividad de la ruta de las pentosas en los lamelibranquios. ENGEL y NEAT (4) han determinado actividades de G6PDH en varios órganos de la almeja *Mercenaria mercenaria*. En el presente trabajo se investiga la distribución de las actividades de las enzimas de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas en diferentes órganos del mejillón del NO. de España (Rías Bajas, Galicia). Asimismo, se determinan algunas propiedades cinéticas de la G6PDH y la 6PGDH de hepatopáncreas, con el propósito de averiguar la posible función reguladora de estas enzimas en condiciones fisiológicas del mejillón.

Material y métodos

Reactivos. Los productos químicos que se han utilizado procedían de diferentes firmas comerciales, Merck, Probus y similares, siendo la calidad reactivo de análisis; coenzimas, sustratos y enzimas purificadas procedían de Sigma.

Material biológico. Se han utilizado mejillones procedentes de las rías gallegas suministrados por una depuradora industrial de moluscos. Este material se ha mantenido dos días en el laboratorio en acuarios con agua de mar, provistos de un circuito de aireación y filtración constante.

Disección de los moluscos y preparación de los extractos. Primeramente se corta el músculo aductor, separando las valvas y arrancando el pie con unas pinzas. Se cortan a continuación las dos tiras musculares superpuestas al hepatopáncreas, separando éste de las branquias con la punta de unas pinzas finas; se extrae

por último del hepatopáncreas el estilo cristalino y se desprende el músculo de las valvas. Los tejidos, hepatopáncreas y branquias, se homogenizan añadiendo por cada gramo de tejido 3 ml de tampón de extracción (imidazol 10 mM, pH 7, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM) al hepatopáncreas y 1 ml a las branquias. La preparación del extracto enzimático del músculo se realiza en un mortero de mano con alúmina; por cada gramo de tejido se añaden 2-4 ml de tampón. Se centrifuga a 27.000 g durante 30 minutos a 4° C. El sobrenadante se desengrasa por filtración usándose éste directamente para medir las actividades enzimáticas expresadas en U/g de peso fresco de tejido o en U/mg de proteína. Los extractos se pasan a través de una columna de Sephadex G-25 cuando se utilizan en experiencias de cinética enzimática. Las proteínas se valoran por el método de LOWRY *et al.* (12).

Determinación de actividades enzimáticas. La actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49) se valora por el método de LANGDON (10), comprobándose la reducción del NADP⁺ por el aumento de densidad óptica a 340 nm; la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44) se determina según PONTREMOLI y GRAZI (15); la glutation reductasa (E.C. 1.6.4.2) se valora por la técnica descrita por RACKER (16); para la determinación de la 6-fosfogluconato-deshidratasa (E.C. 1.2.14) la mezcla de reacción usada fue la descrita por MELOCHE y WOOD (13); asimismo se detecta la acción conjunta de ambas enzimas por el método de FRIEDEMANN y HAUGEN (6).

Experiencias de cinética enzimática. Las constantes de Michaelis aparentes para el sustrato y coenzimas de la G6PDH y la 6PGDH y las constantes de inhibición del NADPH se determinan a pH 7 en condiciones de temperatura controlada, entre unos límites de concentración

de 5 a 200 μM de glucosa-6-fosfato (G6P), 6-fosfo-gluconato (6PG) y NADP^+ . Los resultados se expresan gráficamente por el método de los dobles recíprocos de LINEWEAVER-BURK (11).

Interacción del glutatión oxidado y el NADPH sobre la actividad de la G6PDH. La acción reversora del glutatión oxidado (GSSG) con respecto a la inhibición que ejerce el NADHP sobre la G6PDH se ha determinado por el método descrito por EGGLESTON y KREBS (3).

Resultados

Determinación de las actividades de G6PDH y 6PGDH de distintos órganos de mejillón. Se observa un amplio desbalance entre las actividades de ambas enzimas, más acusado en branquias (tabla I).

No se han detectado concentraciones celulares altas de 6PG en hepatopáncreas. Los valores encontrados anteriormente (J. C. CAMESELLE, resultados no publicados) eran de 12 ± 4 nmoles/g, por lo que se ha investigado la presencia de la ruta de Entner-Doudoroff en distintos tejidos del mejillón. En ningún caso se ha podido

demostrar la presencia de 6-fosfogluconato deshidratasa y de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa en extractos crudos preparados a partir de hepatopáncreas, branquias y músculo aductor de mejillones mantenidos en el laboratorio en presencia de glucosa o ácido glucónico, sustancias descritas como inductoras de la ruta de ENTNER-DOUDOROFF en microorganismos (5).

Determinación de las constantes de Michaelis aparentes de la G6PDH y la 6PGDH. Se ha estudiado la influencia que ejercen sobre la velocidad de reacción de la G6PDH y 6PGDH de hepatopáncreas, concentraciones crecientes de sustrato o de coenzima en mejillones mantenidos en ayuno durante 2-3 días (tabla II).

Acción inhibidora del NADPH sobre las actividades de la G6PDH y la 6PGDH. Se ha determinado la K_i para el NADPH respecto a la G6P. Se observa (fig. 1) una inhibición de tipo no competitivo con un valor de K_i 0,2 mM. La K_i aparente para el NADPH respecto al NADP^+ en la G6PDH da un valor medio de K_i 10 ± 1 μM a partir de 4 experiencias (fig. 2). El

Tabla I. Actividades de la G6PDH y de la 6PGDH en distintos órganos de mejillón. Entre paréntesis, el número de determinaciones. La mezcla de reacción para las determinaciones enzimáticas contiene: G6PDH Imidazol 50 mM, pH 7, Cl_2Mg 10 mM, G6P 0,5 mM, NADP^+ 0,3 mM. 6PGDH Imidazol 50 mM, pH 7, Cl_2Mg 10 mM, 6PG 0,5 mM, NADP^+ 0,3 mM. Se ha usado una cantidad de extracto enzimático correspondiente a 0,5-3 mg de proteína dependiendo de los órganos. La reacción se pone en marcha por adición de los respectivos sustratos glucídicos registrándose el cambio de densidad óptica a 340 nm frente a un testigo sin sustrato.

Órgano	U.I./mg proteína			U.I./g peso fresco		
	G6PDH	6PGDH	G6PDH/ 6PGDH	G6PDH	6PGDH	G6PDH/ 6PGDH
Hepatopáncreas	$0,031 \pm 0,016$ (44)	$0,006 \pm 0,005$ (47)	5,1	$1,58 \pm 0,58$ (53)	$0,378 \pm 0,140$ (47)	4,2
Branquias	$0,127 \pm 0,040$ (14)	$0,0136 \pm 0,0090$ (16)	9,3	$1,33 \pm 0,15$ (19)	$0,122 \pm 0,064$ (20)	19,0
Músculo	$0,0027 \pm 0,0010$ (10)	—	—	$0,064 \pm 0,026$ (10)	—	—

valor $K_i(\text{NADPH})/K_m(\text{NADP}^+) = 1$ está de acuerdo con el resultado obtenido por SAPAG-HAGAR *et al.* (18) en hígado de rata en condiciones de ayuno.

Tabla II. Constantes de Michaelis aparentes de la G6PDH y la 6PGDH de hepatopáncreas de mejillón.

Entre paréntesis, el número de determinaciones. La mezcla de reacción contiene: G6PDH-Imidazol 50 mM, pH 7, Cl_2Mg 10 mM, NADP^+ 0,3 mM o G6P 0,5 mM ante concentraciones variables de los sustratos respectivos. 6PGDH-Imidazol 50 mM, pH 7, Cl_2Mg 10 mM, NADP^+ 0,3 mM o 6PG 0,5 mM ante concentraciones variables de los sustratos respectivos.

	K_m (μM)	
	G6PDH	6PGDH
Sustrato glucídico	22 ± 5 (5)	11 ± 2 (5)
Coenzima	10 ± 1 (7)	25 ± 3 (6)

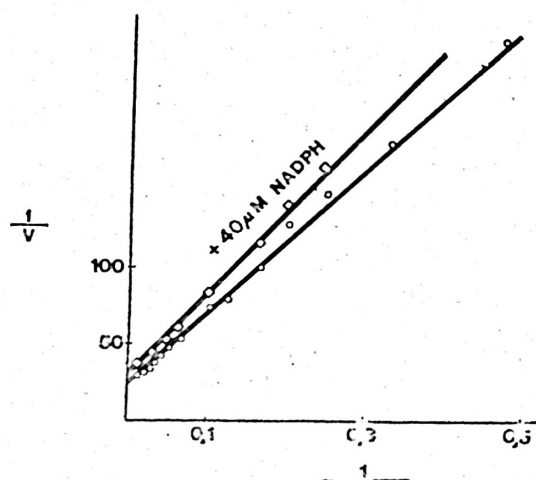


Fig. 1. Acción inhibitoria del NADPH sobre la actividad de la G6PDH, respecto a la G6P. La mezcla de reacción contiene en un vol de 2 ml: imidazol 50 mM, pH 7, Cl_2Mg 10 mM, NADP^+ 0,3 mM, concentraciones variables de G6P entre 5-200 μM y extracto enzimático purificado a través de una columna de Sephadex G-25 (0,35-1,6 mg de proteína). La reacción se pone en marcha por adición de G6P registrándose el cambio de densidad óptica a 340 nm frente a un testigo sin sustrato.

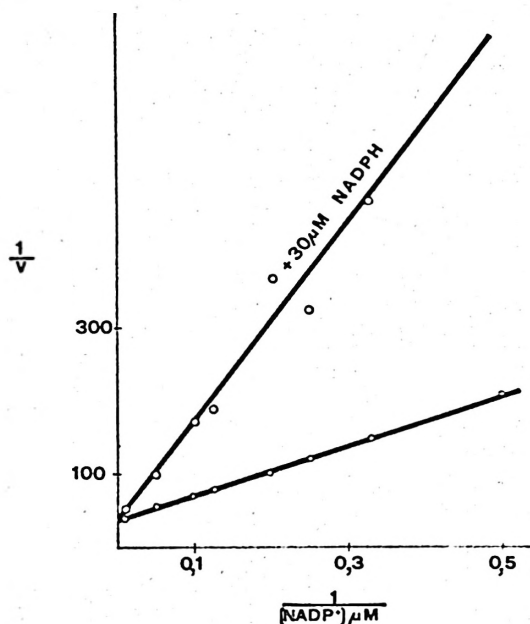


Fig. 2. Acción inhibitoria del NADPH sobre la actividad de la G6PDH, respecto al NADP^+ . Condiciones de los ensayos: G6P 0,5 mM y NADP^+ 5-200 μM . El resto de los componentes son los descritos en la figura 1.

Las constantes de inhibición de la 6PGDH para el NADPH respecto al 6PG y al NADP^+ (fig. 3) dan una inhibición de tipo no competitivo ante el sustrato 6PG. Se ha encontrado un valor medio de K_i 80 ± 14 μM (4 determinaciones). En la figura 4 se observa la inhibición competitiva que el NADPH ejerce respecto al NADP^+ con un valor de K_i 14 ± 3 μM . El valor $K_i(\text{NADPH})/K_m(\text{NADP}^+) = 0,56$ resulta próximo al obtenido por otros autores en hígado de rata en ayuno (18) y en eritrocitos humanos (14).

Interacción del glutatión oxidado y el NADPH sobre la actividad de la G6PDH. Para comprobar si en el hepatopáncreas de mejillón el glutatión oxidado (GSSG) ejerce la acción reversora sobre la inhibición de la G6PDH por el NADPH halla-

da en hígado de rata y otros tejidos animales (4), se han realizado las siguientes experiencias: a) Medida de la actividad de la G6PDH con G6P a saturación y una concentración de NADP⁺ próxima a la K_m. b) Determinación de la inhibición

que ejerce el NADPH a una concentración cuatro veces superior a la de NADP⁺ sobre la actividad de G6PDH en las condiciones del apartado anterior. c) Determinación de la acción conjunta del NADPH y del GSSG, en las condiciones del apartado a).

En algunos casos se han realizado determinaciones enzimáticas en los extractos sin preincubar y en otros se han realizado preincubando previamente el extracto. En la tabla III se resumen los resultados obtenidos.

Discusión

Las células de mamíferos se comportan como células muy especializadas respecto a la actividad específica de las enzimas de la ruta de las pentosas-fosfato encontrándose grandes diferencias entre unos y otros tejidos. Por el contrario, en la presente investigación, se comprueba que las actividades específicas de la G6PDH y la 6PGDH resultan muy próximas en los diferentes tejidos del mejillón, organismo

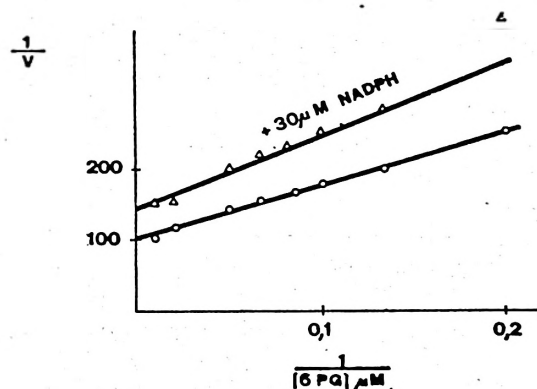


Fig. 3. Acción inhibitoria del NADPH sobre la actividad de la 6PGDH, respecto al sustrato 6PG.

Condiciones de los ensayos: NADP⁺ 0,3 mM, 6PG 5-200 μM. El resto de los componentes son los descritos en la figura 1.

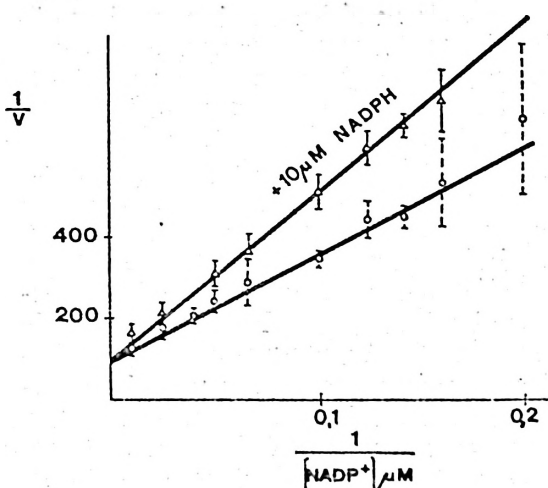


Fig. 4. Acción inhibitoria del NADPH sobre la actividad de la 6PGDH, respecto al NADP⁺. Las desviaciones estándares se han calculado a partir de los valores obtenidos en 6 determinaciones. Mezcla de reacción: 6PG 0,5 mM, NADP⁺ 5-200 μM. Las restantes condiciones son las descritas en la figura 1.

Tabla III. Efecto del GSSG sobre la inhibición de la G6PDH por el NADPH en extractos sin preincubar y preincubados.

Las preincubaciones de los extractos se realizan a 25° C en ausencia de G6P y NADPH. Número de animales por grupo, 5. El porcentaje de reversión se calcula a partir de los porcentajes de inhibición ejercidos por el NADPH en ausencia y en presencia de GSSG 0,1 mM. Mezcla de reacción: Tampón Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, Cl₂Mg 3,3 mM, Cl₂Zn 33 μM, NADP⁺ 16 μM (cociente 0,20) y 20 μM (cociente 0,25) NADPH 80 μM y extracto enzimático 0,05 mg de proteína, en un volumen de 2 ml.

Cociente (NADP ⁺)/ (NADPH)	Tiempo de preincubación min	Reversión por GSSG
0,25	0	33,3 ± 12,3
0,25	30	54,9 ± 18,6
0,20	0	42,2 ± 9,5
0,20	30	63,5 ± 16,7

evolutivamente muy distanciado de los mamíferos.

En la determinación de las actividades específicas de G6PDH y 6PGDH en tejidos de mejillón se ha observado un patente desbalance (más acusado en branquias) que está de acuerdo con el obtenido por otros autores en distintos organismos y en diversas condiciones fisiológicas (7, 18). Este desbalance, a pH fisiológico, implicaría en una ruta no bifurcada como la de las pentosas-fosfato en animales, una acumulación de 6PG; sin embargo, a pesar de los numerosos ensayos realizados, no se ha conseguido detectar concentraciones celulares altas de 6PG que evidencien el desbalance entre ambas actividades. Asimismo no parece existir en los tejidos de mejillón la encrucijada a nivel de 6PG encontrada en algunos microorganismos por ENTNER-DOUDOROFF (6).

La exploración realizada de la ruta de ENTNER-DOUDOROFF en extractos de los tejidos de mejillones incubados con 6PG se puede resumir de la siguiente manera: a) Valoración del piruvato en la mezcla de reacción a partir del 6PG mediante la determinación colorimétrica de las dinitrofenilhidrazonas del piruvato en medio alcalino (6). b) Demostración de la actividad de la 6-fosfogluconato deshidratasa valorando la formación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato a partir de 6PG (13).

Se ha descrito que, en condiciones fisiológicas, el desbalance entre las actividades de la G6PDH y la 6PGDH debe acentuarse, puesto que se admite que la fase oxidativa de la ruta de las pentosas-fosfato está controlada por las formas oxidada y reducida del NADP^+ actuando el NADPH como inhibidor competitivo de ambas enzimas, con menor constante de inhibición para la 6PGDH, dato reseñado por otros autores (18, 19) y confirmado en esta investigación sobre las enzimas del hepatopáncreas de mejillón. Sin embargo, la concentración intracelu-

lar de G6P en el hepatopáncreas de mejillón determinada en este laboratorio (17) resulta $45 \mu\text{Moles/kg}$ de peso fresco, próxima a la K_m para la G6P, por lo que no puede descartarse la posibilidad de un control a nivel de sustrato glucídico.

EGGLESTON y KREBS (3) han investigado los factores que modifican la actividad de la G6PDH hepática, en particular la acción inhibidora del NADPH, confirmando que el NADPH es un inhibidor competitivo respecto al NADP^+ , aproximándose a un 100 % de inhibición cuando el valor del cociente $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ es aproximadamente 0,1. Basándose en los valores teóricos calculados para este cociente, VEECH *et al.* (19) deducen que *in vivo* algún factor desconocido debe revertir la inhibición por el NADPH para permitir el funcionamiento de la enzima.

En el hepatopáncreas de mejillón el GSSG actúa de manera similar a la descrita para el hígado de rata (3), contrarrestando la acción inhibidora del NADPH. La concentración de equilibrio encontrada en el hepatopáncreas de mejillón (J. C. CAMESELLE, resultados no publicados) para el GSSG varía desde $49 \pm 11 \mu\text{M}$ en ayuno a $25 \pm 5 \mu\text{M}$ en condiciones de lipogénesis, por lo que puede considerarse de importancia fisiológica la acción reversora demostrada para una concentración de GSSG $100 \mu\text{M}$. Se ha comprobado en este laboratorio que el GSSG contrarresta también la acción inhibidora del NADPH sobre la 6PGDH (S. RODRÍGUEZ-SEGADE, resultados no publicados). Los resultados obtenidos parecen indicar un mayor efecto reversor sobre esta última enzima que sobre la G6PDH, lo cual podría considerarse un mecanismo compensador del desbalance entre las actividades *in vivo* de ambas deshidrogenasas.

Teniendo en cuenta la posible función fisiológica del GSSG señalada anteriormente, sustratos capaces de originar H_2O_2 , como la alanina, que se acumula en el

metabolismo anaeróbico del mejillón (2), podrían causar una estimulación de la ruta de las pentosas-fosfato durante el metabolismo aerobio. En presencia de O_2 las $NADP^+$ -oxidasas del sistema retículo endoplasmático pueden producir H_2O_2 a expensas de la oxidación de la alanina, y el H_2O_2 mediante la glutatión peroxidasa transforma el glutatión reducido en GSSG (3).

Agradecimientos

A D. L. Losada Lago, que nos ha proporcionado el material biológico empleado. A D. M. Torre Cervigón, D. A. Pérez Camacho y D. G. Román Caballero por su constante asesoramiento para el mantenimiento de los mejillones en el laboratorio.

Resumen

Las actividades específicas de la G6PDH y la 6PGDH en diversos órganos de mejillón muestran un desbalance (5 a 1 en hepatopáncreas y 10 a 1 en branquias) que podría ocasionar una acumulación de 6PG; sin embargo, no han podido detectarse concentraciones celulares altas de este metabolito en el mejillón. Asimismo, se han investigado con resultado negativo la ruta de Entner-Doudoroff en hepatopáncrea, músculo aductor y branquias de mejillón.

Se han caracterizado cinéticamente la G6PDH y 6PGDH de hepatopáncreas determinándose las constantes cinéticas aparentes a $25^\circ C$ y pH 7. El NADPH inhibe competitivamente a las dos enzimas respecto al $NADP^+$ (la razón K_i/K_m para la G6PDH es 1 y para la 6PGDH 0,56). El glutatión oxidado a concentraciones próximas a las fisiológicas ejerce un efecto reversor de la inhibición del NADPH sobre la G6PDH.

Bibliografía

1. BENNET, R. y NAKADA, H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 787-797, 1968.
2. DE ZWANN, A. y ZANDEE, D. I.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **43**, 47-54, 1972.
3. EGGLESTON, L. V. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **138**, 425-435, 1974.
4. ENGEL, R. H. y NEAT, M. J.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **37**, 397-403, 1970.
5. ENTNER, N. y DOUDOROFF, M.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 853-862, 1952.
6. FRIEDEMANN, T. E. y HAUGEN, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415, 1943.
7. GLOCK, G. E. y MCLEAN, P.: *Biochem. J.*, **61**, 390, 1955.
8. GUMAA, K. A., MCLEAN, P. y GREENBAUM, A. L.: En «*Essays in Biochemistry*» (P. N. Campbell y F. Dickens, eds.), Vol. 7. Academic Press, Nueva York, 1971, pp. 39-86.
9. HORSTMANN, H. J.: *Z. Physiol. Chem.*, **319**, 120-125, 1960.
10. LANGDON, R. G.: En «*Methods in Enzymology*» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), Vol. IX, Academic Press, Nueva York, 1966, pp. 126-131.
11. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. I.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
13. MELOCHE, H. P. y WOOD, W. A.: En «*Methods in Enzymology*» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), Vol. IX, Academic Press, Nueva York, 1966, pp. 653-656.
14. PEARSE, M. F. y ROSEMEYER, M. A.: *Eur. J. Biochem.*, **42**, 225-235, 1974.
15. PONTREMOLI, S. y GRAZI, E.: En «*Methods in Enzymology*» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), Vol. IX, Academic Press, Nueva York, 1966, pp. 137-141.
16. RACKER, E.: En «*Methods in Enzymology*» (S. I. Colowich y N. O. Kaplan, eds.), Vol. II, Academic Press, Nueva York, 1955, pp. 722-725.
17. RODRÍGUEZ-SEGADE, S., CAMESELLE, J. C. y CARRIÓN-ANGOSTO, A.: *Abst. X FEBS Meeting*, 1482, 1975.
18. SAPAG-HAGAR, M., LAGUNAS, R. y SOLS, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 179-185, 1973.
19. VEECH, R. L., EGGLESTON, L. V. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **115**, 609-619, 1969.

