

METABOLISMO DE LA FRUCTOSA 1-6 DIFOSFATO EN  
MUSCULO DE CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS  
(LOCO DE MAR)

P O R

MORAN, A.; GONZALEZ, R.; PUCHI, M. (\*)

R E S U M E N

Se estudia el consumo de fructosa difosfato por cortes y extractos en distintas condiciones ambientales. Como productos finales de la glicolisis aparecen fosfoglicerol y piruvato. El fluoruro inhibe la aparición de piruvato, sin modificar el consumo de fructosa difosfato ni la producción de fosfoglicerol. El arseniato estimula el consumo de fructosa difosfato y la producción de fosfoglicerol y piruvato.

A B S T R A C T

The FDP consumption in slices-homogeneized and supernatants ( $23.000 \times g$  and  $105.000 \times g$ ) of muscle of Concholepas Concholepas are studied. The final products of the glycolysis are phosphoglycerol and pyruvate. The Fluoride inhibits the appearance of Pyruvate and does not modified the FDP consumption and the phosphoglycerol production. The arsenate stimulate the FDP consumption and increase the production of phosphoglycerol and pyruvate.

(\*) Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciencias Médico Biológicas. Universidad de Concepción.

## INTRODUCCION .

El presente estudio está relacionado con la glicolisis en el tejido muscular de un molusco marino; *Concholepas Concholepas* (Bruguiera), 1789. Se trata de un gastrópodo (1) familia muricidas. Especie autóctona de las costas del sur del Perú y de toda la costa de Chile, donde es popularmente conocido con el nombre de "loco de mar". Tiene una abundante masa muscular, pie, de un peso aproximado a 90 g. en los especímenes adultos, con 25 a 30 g. de vísceras. Peso de la concha 120 g. a 160 g.

Hemos explorado parcialmente las etapas relacionadas con la utilización de la fructosa 1-6 difosfato en diversas condiciones experimentales (2, 3, 4). Escogimos este sustrato como punto de partida para superar problemas de regulación por participación de hexoquinasa (ATP:D) hexosa-6-fosfotransferasa) (5, 6, 7) y especialmente la fosfofructokinasa (ATP:D) fructosa 6-fosfato 1 fosfotransferasa) (8, 9, 10). En este molusco hay una producción mínima de lactato, menos del 10% de la fructosa utilizada, sin embargo se encuentra fosfoglicerol (11) y piruvato. La liberación de ambos puede modificarse por la presencia de fluoruro y arseniato, dos aniones con una acción bien definida a este nivel y; por lo tanto, herramientas muy útiles para abordar problemas relacionados con estos metabolitos (12, 13).

En esta comunicación, se analizarán los resultados obtenidos al medir el consumo de fructosa 1-6 difosfato, la aparición de fosfoglicerol, de piruvato y de lactato. Los dos primeros por cortes, homogenizado al 33%, sobrenadantes de  $23.000 \times g$  y de  $105.000 \times g$ . La liberación de lactato se midió en homogenizado y sobrenadante de  $105.000 \times g$  de músculo de *Concholepas Concholepas* y la influencia que sobre éstos tienen el fluoruro y el arseniato.

Este trabajo fue realizado con ayuda de la Fundación Otero y Conicyt.

## MATERIALES Y METODOS

Reactivos: Nicotinamida. E. Merck, Damstadt, Germany. ATP, ADP, NAD, FDP. Alfa glicerol fosfato deshidrogenasa, Láctico deshidrogenasa, Sigma Chemical Co. St. Louis Mo., U.S.A.

Los ejemplares utilizados provienen de la bahía de San Vicente, los experimentos se realizan inmediatamente recibidos en el Laboratorio.

Los cortes se obtuvieron con un "tissue Slicer" colocando en el medio de incubación 100 mg con un espesor promedio de 0,5 mm.

La preparación del homogenizado se hace al 33% en KCl 0.025 M en un homogenizado Bühler (Karl Kold, N° 279950) por dos minutos a 0°C. Por centrifugación en una centrífuga Sorvall de una fracción de este homogenizado a 23.000 g durante 20 minutos se obtiene el primer sobrenadante y a su vez por centrifugación de una alícuota de éste a 105.000 × g en una centrífuga Spinco modelo L durante 20 minutos se obtiene el segundo sobrenadante (ambas centrifugaciones se realizan a 0°C).

La composición del medio de incubación se fue variando hasta obtener el mejor consumo de fructosa difosfato quedando definitivamente compuesto por: nicotinamida 20 mM, fosfato de potasio 16 mM pH 7.2, buffer de TRIS 33 mM pH 7.2, Cloruro de Magnesio 0.33 mM, NAD 0.33 mM, fructosa difosfato 6.6 mM, Arseniato de Sodio 16 mM y ADP 3 mM. Estas son concentraciones finales. El volumen final de 1.5 ml conteniendo 0.4 ml de homogenizado o de uno de los sobrenadantes, o 100 mg de cortes de tejido.

Las incubaciones se hicieron en un respirómetro de Warburg. La fase gaseosa del interior de los manómetros fue aire, con el medio previamente oxigenado durante 10 minutos. La fructosa difosfato se determinó con cisteína-carbazol (14), el alfa glicerofosfato se determinó enzimáticamente (15), el piruvato enzimáticamente (16) y químicamente con 2-4 dinitrofenil hidrazina (17) y el fósforo inorgánico por el método de Fiske y Subbarow (18).

Los resultados están expresados en micromoles por 100 mg. de tejido húmedo incubado 30 minutos a 30°C.

Fosfogliceraldehido dehidrogenasa requiere cisteína para su actividad máxima. Es inhibida en más de un 90% por 1,5 mM mono-yodoacetato. (Cori.O. Resultados no publicados).

Las actividades enzimáticas fueron medidas a pH 7.2 (de la hemolinfa en buffer TRIS-HCl 50 mm, como se indica en la tabla bajo las condiciones de concentración de cofactor y de sustrato especificadas para cada enzima en particular. Colowick y Kaplan, 1955 (19).

RESULTADOS Y DISCUSION.

T A B L A I

CONTENIDO DE ENZIMAS GLICOLITICAS DETERMINADAS DE UN EXTRACTO AGUOSO DE MUSCULO DE CONCHOLEPAS

ENZIMA	Componentes del medio de ensayo además de extracto y buffer	Cambio observado	Actividad en unidades/g tej. húmedo
Hexoquinasa	Glucosa, ATP, Mg <sup>++</sup> , N+ADP Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa	NADPH (+)	0.45
Glucosa 6 fosfato Dehidrogenasa	Glucosa 6 fosfato NADP	NADPH (+)	0.28
Aldolasa	Fructosa 1-6 Difosfato	Fosfato alcalilábil	4.3
Fosfogliceraldehido dehidrogenasa	d-1- Fosfogliceraldehido cisteína. Arseniato N+AD	NADH (+)	3.2
Fosfogliceromutasa	Acido 3 Fosfoglicérico, Mg <sup>++</sup> , enolasa	Fosfoenolpiruvato (+)	3.0
Enolasa	Acido 2 Fosfoglicérico, Mg <sup>++</sup> 2 Fosfoglicérico	Fosfoenolpiruvato (+)	3.0
Láctico dehidrogenasa	NADH, piruvato	NADH (-)	0.36
Alfa glicerol fosfato dehidrogenasa	NAD, Fosfoglicerol	NADH (+)	0.72

(+) Indica aparición y (-) desaparición del compuesto indicado.

T A B L A 11

CONSUMO DE FDP Y ACUMULACION DE FOSFOGLICEROL, PIRUVATO  
Y LACTATO EN CORTES, HOMOGENIZADO Y SOBRENADANTES  
DE 23.000 × g Y DE 105.000 × g

	Cons-FDP u mol/100 mg tej.	Alfa glic. P prod/umol 100 mg tej.	Piruv. Prod umol/100 mg tej.	Lactato prod. nmol 100/ mg tej
Cortes	5.03±0.25	1.98±0.17	1.89±0.45	—
Homogenizado	4.53±0.49	3.84±0.31	2.86±0.67	0.23±0.04
S-23.000 × g	2.08±0.37	2.75±0.13	1.31±0.13	—
S-105.000 × g	2.50±0.15	2.10±0.18	0.84±0.06	0.10±0.02

Los resultados corresponden al término medio ± el error standard.

FDP = Fructosa difosfato

Alfa Glic. P = Alfa Glicerol fosfato

Piruv. = Piruvato

S-23.000 × g = sobrenadante de 23.000 × g

S-105.000 × g = sobrenadante de 105.000 × g

El músculo de Concholepas Concholepas presenta un consumo de FDP distinto, según se trate de cortes u homogenizado total, o bien de sobrenadante de 23.000 × g o de 105.000 × g. Llama la atención el consumo de fructosa difosfato por cortes de tejido; hecho que se mantiene en forma constante en las diversas condiciones experimentales ensayadas. Este mayor consumo en los cortes coincide con una baja acumulación de alfa glicerol fosfato y piruvato junto a una disminución del fósforo inorgánico del medio (1,5 umoles/100 mg tejido). Esto se debería a que en estas condiciones, de tejido relativamente intacto hay buena utilización de estos productos metabólicos.

La acumulación de alfa glicerol fosfato y piruvato es ligeramente superior cuando se emplea homogenizado y disminuye con ambos sobrenadantes.

El lactato tiene una liberación mínima al medio de incubación que no alcanza a ser ni el 10% de la fructosa difosfato consumida.

TABLA III

## EFECTO DEL FLUORURO

La concentración del fluoruro fue de 60 mM final.

	Cons-FDP u mol/100 mg tej	Alfa Glic. P Prod. u moles 100 mg tej.	Piruv. Prod. u mol/100 mg tej.
Cortes	5.26±0.49	1.93±0.26	0.17±0.11
Homogenizado	4.30±0.25	3.85±0.04	0.17±0.06
S-23.000 × g	3.30±0.25	2.64±0.26	0.74±0.16
S-105.000 × g	2.37±0.13	2.04±0.10	0.90±0.05

Este ión no modifica marcadamente el consumo de fructosa difosfato en las diferentes condiciones experimentales; tampoco afecta la producción de fosfoglicerol. La acumulación de piruvato está notablemente disminuida a excepción de la que se obtiene en los experimentos hechos con sobrenadantes de 105.000 × g, en los cuales dicha acumulación no sufre modificaciones.

La acción del fluoruro se ejercería sobre la enolasa manifestándose preferentemente en cortes y homogenizado. La acumulación de piruvato en presencia de fluoruro con el sobrenadante de 105.000 × g es mejor que en cortes y homogenizados.

TABLA IV

## ACCION DEL ARSENIATO

El arseniato reemplaza al fosfato en el medio de incubación al mismo pH 7.2 y concentración 16 mM final.

	Cons-FDP u mol/100 mg tej.	Alfa Glic. P u moles 100 mg tej	Piruv. prod u moles 100 mg tej.	Piruv. Prod. u moles 100 mg tej.
Cortes	4.27±0.27	1.60±0.23	2.25±0.18	—
Homogenizado	5.28±0.34	4.35±0.08	2.29±0.90	0.15±0.035
S-23.000 × g	3.82±0.32	4.42±0.06	5.19±0.34	—
S-105.000 × g	4.99±0.26	3.47±0.13	5.07±0.25	0.18±0.0015

En estos experimentos se reemplaza el fósforo inorgánico del medio de incubación por arseniato al mismo pH y concentración, permaneciendo sin alteración las concentraciones de fosfato endógeno que son más o menos 3 micro moles por 100 mg. tej., expresado como

fósforo total. Podemos observar que la acción del arseniato estimula el consumo de fructosa difosfato en los sobrenadantes. El mismo efecto se mantiene en la producción de fosfoglicerol. En relación con el piruvato, la acción del arseniato estimula notablemente su acumulación, tanto en el sobrenadante de  $23.000 \times g$  como en el de  $105.000 \times g$  (Ver Tabla II).

Este aumento en la producción de piruvato coincide con una liberación de fosfato al medio de incubación ( $5.6 \pm 0.15$  u moles/100 mg. tej.) en ambos sobrenadantes. La acción del arseniato estaría principalmente a nivel del sistema gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (D-glicero-aldehido 3 fosfato; NAD- oxidoreductasa) (fosfoglicerato kinasa ATP: 3-fosfo D-glicerato 1-fosfotransferasa), dando lugar a la formación de 3 fosfoglicerato con consumo de fósforo inorgánico dependiente de ADP. La falta de consumo de fósforo inorgánico puede dar lugar a la acumulación del que se libere por fosfatasa, liberación que normalmente (en ausencia de arseniato) tiende a ser contrarrestada por la fijación a este nivel (18, 20, 21, 22).

El aumento de fosfoglicerol en presencia de arseniato se debería a una mayor disponibilidad de  $NADH + H^+$  para reaccionar con dihidroxi acetona fosfato consecuencia a su vez, de la facilitación a nivel del sistema gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa-fosfoglicerato kinasa.

TABLA V

EFFECTO DE ARSENIATO Y FLUORURO

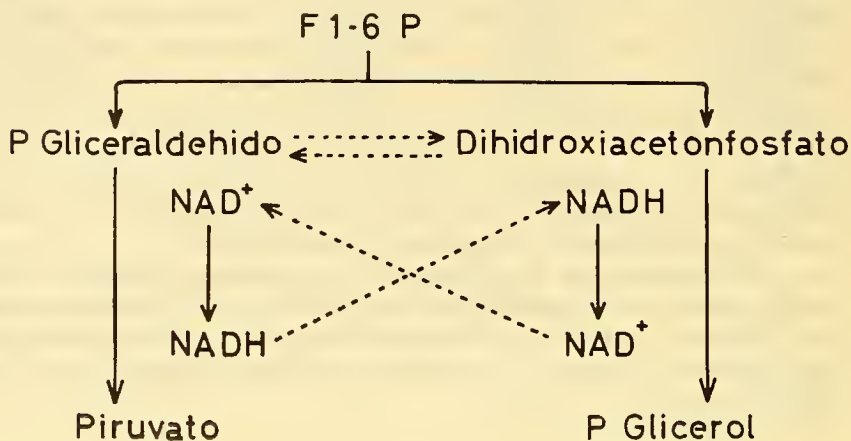
Las concentraciones de los aniones son las descritas en las Tablas III y IV.

	Cons FDP u moles 100 mg tej.	Alfa Glic. P Prod. u moles 100 mg tej.	Piruv. prod. u moles 100 mg tej
Cortes	$5.25 \pm 0.15$	$2.54 \pm 0.26$	$0.06 \pm 0.008$
Homogenizado	$5.32 \pm 0.14$	$5.20 \pm 0.19$	$0.07 \pm 0.003$
S-23.000 $\times g$	$4.38 \pm 0.31$	$5.49 \pm 0.18$	$0.06 \pm 0.01$
S-105.000 $\times g$	$4.64 \pm 0.23$	$4.72 \pm 0.14$	$0.09 \pm 0.001$

Aquí de nuevo el arseniato reemplaza al fosfato en el medio de incubación al cual se le agrega además fluoruro en la concentración indicada anteriormente.

De estos resultados se puede concluir que la acción estimulante del arseniato sobre el consumo de fructosa difosfato se mantiene en los sobrenadantes. También persiste la producción aumentada de fosfoglicerol, en cambio la producción de piruvato se encuentra disminuida debido a la acción del fluoruro.

#### ESQUEMA DEL METABOLISMO DE LA F 1-6 P



Con estos resultados experimentales proponemos el siguiente esquema metabólico para la F 1-6 P.

Agradecemos a la Srta. Diana Inostroza, su asistencia técnica.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- SANCHEZ, P.; HUAQUIN, L.  
1966 Anatomía del Concholepas Concholepas. Universidad Católica de Chile. Santiago. (Conferencia).
- 2.- MORAN, A.; GONZALEZ, R.  
1969 IX Congreso Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas. Belo Horizonte. Brasil 28.
- 3.- MORAN, A.; GONZALEZ, R.; PUCHI, M.  
1970 Archivos de Biología y Medicina Experimental 7. R. 7.
- 4.- TAKESHI SHIBATA  
1964 Chem. Abstract. 60. 9653 H.
- 5.- CRANE, K. R. SOLS, A.  
1953 J. Biol. Chem. 203. 273.



- 6.— NIEMEYER H.  
1966 International Symposium Enzimatic Aspect of Metabolic Regulation (M. P. Stulberg. M co City, Mexico) 29.
- 7.— UYEDA, K. RACKER, E.  
1965 J. Biol. Chem/240. 4682.
- 8.— VIÑUELA, E. SALAS, M. L. SOLS, A.  
1963 Biochem. Biophys. Res. Comm 12. 140.
- 9.— RAMAIAH, A. HATHAWAY, J. A. ATKINSON  
1964 J. Biol. Chem/239. 3619.
- 10.— STADMAN, E. R.  
1965 Advances in Enzymology 28. 41.
- 11.— MASSONE, R.; GARCES, E.  
1970 Archivos de Biología y Medicina Experimental 7. R 26.
- 12.— CHANCE, B. SCHOEWER, B. ELSAESSER, S.  
1965 J. Biol. Chem. 240. 3170.
- 13.— YASNO KAGAWA, AIKO KAGAWA  
1969 J. Biochem. 65. 105.
- 14.— HANES e ISHERWOOD  
1965 Methods in Enzymology Vol. III, pg. 77. Academic Press. Inc. Publishers, N. Y.
- 15.— HANS-JÜERGEN ILOHORST  
1965 Methods of Enzymology Analysis (H. M. Bermeyer). Pg. 215. Academic Press.
- 16.— BÜCHER, T.; CZOK, R; LAMPRECHT, W; LATZKO EWIN  
1965 Methods of Enzymology Analysis (H. M. Bergmeyer). Pg. 253. Academic Press.
- 17.— UMBREIT, W.; BURRIS, E. H.; STAUFFER, F.  
1957 Manometric Techniques 239 (1957) Burges Publishing Co.
- 18.— FISKE, C. H. SUBBAROW  
1925 J. Biol. Chem. 66 375.
- 19.— COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O.  
1955 Methods in Enzymology Vol. I and II. Academic Press Inc. Publishers N. Y.
- 20.— DEAL, W. C.  
1969 Biochemistry 8 2795.
- 21.— SHIH, TZY YANG; DEAL W. C.  
1969 Biochemistry 8 2806.
- 22.— BOYER, P. D.  
1962 The Enzymes 6 95. Academic Press. New York and London.