

Piruvato quinasa muscular de *Perumytilus purpuratus*: evidencias de la presencia de la enzima fosforilada en terreno durante todo el ciclo de marea

Adductor muscle pyruvate kinase from *Perumytilus purpuratus*: phosphorylated form of the enzyme during the entire tidal cycle

Robert Simpfendörfer, M. Victoria Vial, Alejandra Monsalve y M. Luisa González

Departamento de Acuicultura, Universidad de Los Lagos, Casilla 933, Osorno, Chile.

RESUMEN

Se estudió en terreno la participación del mecanismo de fosforilación-desfosforilación de la quinasa pirúvica (PK), en la regulación de la transición aerobiosis-anaerobiosis en músculo aductor del bivalvo intermareal *Perumytilus purpuratus*. Se midió paralelamente en terreno la actividad y características cinéticas de la PK y la producción del metabolito anaeróbico succinato. La experiencia se llevó a cabo en la localidad de Punta Metri, Seno de Reloncaví, X Región, en ejemplares de *P. purpuratus* ubicados en la zona media de su distribución natural en el intermareal y comparativamente, en ejemplares previamente trasplantados al límite superior e inferior de la distribución intermareal natural del bivalvo en Punta Metri. Se tomaron en todos los grupos muestras seriadas durante el ciclo de marea, dos veces durante cada estación del año, durante un año y medio. Pudo visualizarse la presencia de una sola forma de la PK, en todas las condiciones de muestreo en terreno y en todos los grupos, utilizando parámetros cinéticos. La forma de la enzima presente se denominó inhibida y presentó un $S_{0.5}$ para el sustrato fosfoenolpiruvato (PEP) de 0,86 mM y una razón entre las velocidades máximas en presencia y ausencia de fructosa-1,6-bisfosfato (FDP) ($V_{max, FDP}/V_{max}$) igual a 2,59. Sin embargo, la forma activa de la enzima sí pudo ser observada *in vivo*, al mantener ejemplares en el laboratorio por 1-2 días en inmersión continua, con aireación, a 10 °C. La forma activa de la enzima presentó un $S_{0.5}$ (PEP) de 0,144 mM y una razón $V_{max, FDP}/V_{max}$ de 1,69. También fue posible revertir *in vivo* la PK desde su forma activa a la forma inhibida, al someter los ejemplares posteriormente en el laboratorio, a emersión continua por 1 a 2 días. La enzima en su forma inhibida fue parcialmente purificada pudiendo ser revertida a la forma activa después de ser tratada con fosfatasa alcalina (AP). Paralelamente se determinó en terreno la concentración de succinato en el músculo aductor durante el ciclo de mareas, observando claras diferencias en el patrón de producción de succinato entre ejemplares provenientes de trasplantes de la zona inferior y superior del intermareal.

Palabras clave: piruvato quinasa, succinato, ciclo de mareas, *P. purpuratus*, fosforilación enzimática, Chile

ABSTRACT

The covalent modification by phosphorylation-dephosphorylation of the pyruvate kinase (PK) was evaluated in field experiments, in relation to the regulation of the aerobic-anaerobic metabolic transition in the adductor muscle of the intertidal mussel *P. purpuratus*. The PK kinetic characteristics and the production of the anaerobic metabolite succinate were evaluated simultaneously in the field, during the tidal cycle. The experimental procedures were carried out in Metri Bay, Reloncaví Estuary, in southern Chile, with *P. purpuratus* specimens located in the middle zone of their natural intertidal distribution, and comparatively in specimens previously transplanted from this intertidal height, to the upper and lower intertidal margins of the natural distribution of this mussel in Metri Bay. In all groups, specimens were sampled during increasing periods of emersion in the tidal cycle, twice at each season (during 1.5 years). The presence of only one form of the PK under all experimental conditions in the field was identified, determined by kinetic parameters. The PK form present was the inhibited form and presented a $S_{0.5}$ value for phosphoenolpyruvate (PEP) of 0.86 mM, and a ratio between the V_{max} in the presence and absence of 0.1 mM fructose-1,6-bisphosphate (FDP) ($V_{max, FDP}/V_{max}$), of 2.59. Nevertheless, the inhibited PK could be converted into the active PK form *in vivo* in the laboratory, maintaining specimens of the bivalve in immersion constantly, with aeration, during at least 1-2 days (10 °C). The active PK presented a $S_{0.5}$ for PEP of 0.144 mM and a ratio $V_{max, FDP}/V_{max}$ of 1.69. The inhibited PK could be obtained again *in vivo*

exposing the immersed specimens to continuous emersion (13-15 °C), for a period of at least 1-2 days. The inhibited enzyme was partially purified and treated with exogenous alkaline phosphatase (AP), obtaining a rapid interconversion into the active form of the PK. In parallel, the succinate concentration in the adductor muscle during the tidal cycle differed between specimens from the upper and lower intertidal transplantations.

Key words: pyruvate kinase, succinate, tidal cycle, *P. purpuratus*, enzyme phosphorylation, Chile.

INTRODUCCION

Los organismos invertebrados que habitan la zona intermareal poseen rutas metabólicas especiales para suplir períodos de carencia de oxígeno propios de los ciclos de emersión-inmersión de esta área tales como la vía del succinato-propionato. Esta ruta aportaría más ATP que la clásica fermentación láctica de los vertebrados (Hochachka & Somero 1984; Fields 1983). La producción de succinato por un tejido es indicativa de la utilización de esta vía metabólica y se correlaciona con el período o la intensidad de la hipoxia.

La piruvato quinasa (PK) es una enzima alostérica en bivalvos intermareales, similar a la PK tipo L de hígado de animales superiores (Munday *et al.* 1980 ; Simpfindörfer *et al.* 1994, 1997). La inhibición de la PK por el inhibidor alostérico alanina y por el descenso en el pH intracelular observado en períodos de anoxia, originaría el ingreso de derivados de la glucosa a la vía del succinato (Zandee *et al.* 1986; Holwerda *et al.* 1989). Se ha demostrado que esta enzima en moluscos intermareales puede ser fosforilada y desfosforilada, cambiando con ello la actividad y las características alostéricas de la enzima, modificación covalente que sería controlada por segundos mensajeros como AMP cíclico (AMPC) y Ca^{2+} /calmodulina (Plaxton & Storey 1984 a,b; Hakim *et al.* 1985; Holwerda *et al.* 1989). Se postula que esta modificación covalente de la PK controlaría la transición aerobiosis-anaerobiosis a la que están naturalmente expuestos estos organismos, producto de los ciclos de emersión-inmersión propios del intermareal. Sin embargo se desconoce si este mecanismo de regulación covalente efectivamente opera en la transición metabólica aerobiosis-anaerobio-

sis durante el ciclo de mareas en terreno, como también se desconocen los mecanismos bioquímicos que desencadenan el aumento de segundos mensajeros que controlan la fosforilación (menos aún la desfosforilación) de la PK (Brooks & Storey 1991).

En este trabajo se estudió la actividad PK y su grado de fosforilación durante el ciclo de mareas en trasplantes del bivalvo chileno *Perumytilus purpuratus* a dos alturas intermareales, para someter a este invertebrado a los períodos extremos de emersión que sufre durante los ciclos naturales de marea en bahía Metri, X Región, Chile. Al mismo tiempo, se determinó la concentración de succinato en el músculo aductor durante la emersión en organismos de ambos trasplantes para correlacionar la actividad PK con la utilización del metabolismo anaeróbico por parte de este invertebrado intermareal.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS: Los reactivos orgánicos, las columnas para cromatografía, la lactato dehidrogenasa (LDH) y la fosfatasa alcalina (AP) (E:C: 3.1.3.1) de mucosa intestinal de bovino tipo VII-G eran de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO). Los reactivos inorgánicos eran de Merck (Darmstadt).

TRASPLANTES DEL BIVALVO EN TERRENO: Se utilizaron ejemplares de 3,0-3,5 cm de largo de *Perumytilus purpuratus*, los cuales fueron transportados al laboratorio o trasplantados en terreno. Los trasplantes se realizaron utilizando organismos fijados a piedras pequeñas las cuales fueron trasladadas desde la zona media de su distribución natural en bahía Metri (4 m sobre el nivel 0 de marea) a los márgenes superior (4,8-5,2 m sobre el nivel 0 de marea)

e inferior (2,8-3,2 m sobre el nivel 0 de marea) de distribución del bivalvo en la intermarea de esta playa. Los organismos fueron aclimatizados por un mínimo de 1 mes y las mediciones de actividad PK y concentración de succinato (ambos en músculo aductor) fueron realizadas entre 1-3 meses después de los trasplantes. Con los trasplantes realizados se consiguieron emersiones de 8 h y 5 h (zona superior e inferior respectivamente) como promedio en cada ciclo de marea. Como características bióticas principales en cada hábitat, se observó arriba mayor abundancia de *Jehlius cirratus* y *Littorina* sp.; abajo se observó muy poca presencia de *J. cirratus* y abundante presencia del gastrópodo depredador de bivalvos *Nucella* sp. (cobertura de aprox. 15-25 ind./m²), además de *Mytilus chilensis*. En el trasplante superior no se observaron ejemplares de *Nucella* sp. El decápodo *Petrolystes* sp. fue más abundante en la zona baja.

DISEÑOS EXPERIMENTALES EN TERRENO Y EN EL LABORATORIO: Se tomaron muestras en terreno de músculo aductor de ejemplares de *P. purpuratus* al comenzar y finalizar la emersión en cada trasplante y por tiempos crecientes de emersión, dos o más veces en cada estación del año. Para cada muestra, se extrajo el músculo aductor de 10-20 organismos y se colocó inmediatamente en nitrógeno líquido siendo luego transportado hasta el laboratorio, para la posterior determinación de succinato y actividad PK. La PK no sufre cambios en su actividad durante varios meses guardando el tejido de esta forma.

Para las experiencias *in vivo*, ejemplares de *P. purpuratus* se recolectaron desde la zona media del intermareal en bahía Metri y se transportaron al laboratorio vivos (en emersión) para estudiar las condiciones experimentales bajo las cuales se expresan las formas activa e inhibida de la PK *in vivo*. Para ello, se sometieron ejemplares del bivalvo a inmersión en agua de mar con aireación continua (10 °C) y paralelamente a emersión a temperatura

ambiente (13° - 15 °C, 70-80% H.R.). También fueron expuestos a emersión ejemplares mantenidos previamente por 3 o más días en inmersión continua a 10°C. Se extrajo el músculo aductor de 5-10 individuos aproximadamente cada 12 h de tratamiento (emersión o inmersión en el laboratorio) y se analizó la actividad PK al igual que en las experiencias de terreno.

PURIFICACION Y MEDICION DE ACTIVIDAD DE LA PK: El músculo aductor de *P. purpuratus* (tejido almacenado en N₂ líquido o extraído en el laboratorio) fue homogeneizado 1:5 (p/v) en amortiguador HEPES 50 mM (pH 7,0), EDTA 5 mM, ditiotreitól (DTT) 1 mM, sacarosa 0,25 M, PMSF 0,1 mM. El sobrenadante obtenido por centrifugación (18.000 g, 30 min, 0-2 °C) fue tratado con sulfato de amonio sólido al 65% de saturación (1h, en frío). El precipitado obtenido luego de centrifugar fue resuspendido en amortiguador HEPES 10 mM (pH7,0), EDTA 1 mM y DTT 1 mM y fue aplicado a una columna de Sephadex G-100 (1,5 x 30 cm) preequilibrada en el mismo amortiguador. A las fracciones obtenidas de la cromatografía de filtración se les midió actividad PK y concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). Utilizando la fracción eluida de la columna de filtración de mayor actividad PK, se realizaron curvas de saturación para el sustrato fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia y ausencia de fructosa 1,6 bis fosfato (FDP) 0,1 mM.

La actividad PK fue medida como se describió antes (Vial *et al.* 1992), según el método de Bücher & Pfeleiderer (1955), con algunas modificaciones en el medio de reacción: amortiguador HEPES 50 mM (pH 7,0), KCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM, ADP 0,5 mM, NADH 0,2 mg/ml, 5,5 U de la enzima acoplada lactato dehidrogenasa (LDH). Se monitoreó la actividad PK siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. Una unidad de actividad PK corresponde a la oxidación de 1 µmol de NADH min. a 25 °C.

TRATAMIENTO DE LA PK CON FOSFATASA ALCALINA: La PK obtenida en la fracción Sephadex G-100 de mayor actividad (forma activa obtenida desde ejemplares aclimatados al laboratorio o forma inhibida obtenida en terreno desde organismos trasplantados) fue tratada con 5-10 U de fosfatasa alcalina (AP) y $MgSO_4$ 10 mM, incubando esta mezcla a 30°C durante 1 h. Un control de PK fue incubado paralelamente en presencia de $MgSO_4$ 10 mM, pero en ausencia de la AP. Luego se midió en cada caso, la actividad PK en presencia y ausencia de FDP 0,1 mM, realizando curvas de saturación para PEP. El mismo tratamiento con AP y $MgSO_4$ fue realizado con la enzima purificada aproximadamente 100 veces desde organismos mantenidos en el laboratorio en emersión e inmersión (según se describe en Simpfendorfer *et al.* 1994).

DETERMINACION DE SUCCINATO EN EL MUSCULO ADUCTOR: Se extrajo el músculo aductor inmediatamente después de obtenidos los ejemplares en terreno. El tejido se almacenó en N_2 líquido para ser transportado al laboratorio y determinar posteriormente succinato por método enzimático utilizando succinodeshidrogenasa aislada de hígado de bovino, según se describe en Vial *et al.* (1992).

RESULTADOS

DETERMINACION DE SUCCINATO EN *P. purpuratus* TRASPLANTADO EN EL INTERMAREAL.

Se determinó contenido de succinato en el músculo aductor de *P. purpuratus* durante la emersión producida por los ciclos de marea en bahía Metri. Las muestras de músculo aductor fueron obtenidas en terreno de ejemplares ubicados en el trasplante superior e inferior en diferentes estaciones del año: primavera (Fig. 1, a-b); verano (Fig. 1, c); otoño (Fig. 1, d-e).

Los ejemplares fueron muestreados al bajar la marea, por tiempos crecientes de emersión y el tiempo 0 de emersión correspondió al momento en que la marea comenzó a descender en cada trasplante. Se observa en la Fig. 1 que este metabolito anaeróbico aumenta rápidamente en concentración una vez iniciada la emersión en el trasplante inferior, para descender luego de aproximadamente 2 h. En el trasplante superior en cambio, el succinato aumentó lentamente aunque al final de la emersión alcanzó una mayor concentración, para luego descender igualmente poco antes de la reinmersión.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PK EN EL BIVALVO TRASPLANTADO, DURANTE EL CICLO DE MAREAS.

Se midió la actividad PK de músculo aductor de *P. purpuratus* extraídos durante el ciclo de mareas, al comienzo y al final de la emersión en ambos trasplantes a las dos alturas intermareales, durante un período de 1,5 años. En todos los casos, la PK fue parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía en Sephadex G-100.

Al estudiar la actividad PK se observó en todas las muestras obtenidas en terreno (en ambos trasplantes y durante todo el período de muestreo) sólo una forma de la enzima, que correspondió a la forma inhibida (Fig. 2), caracterizada según dos parámetros cinéticos: la afinidad por el sustrato PEP, determinada como el $S_{0,5}$ en gráficos de Hill, y por la relación de la velocidad máxima en presencia y ausencia de FDP 0,1 mM (razón $V_{máx, FDP}/V_{máx}$) (Tabla 1). Estos parámetros cambiaron notablemente entre la forma "activa" e "inhibida" de la PK, en cambio el n_H (cercano a 1) fue similar en ambos casos y la Km aparente para PEP en presencia de FDP cambió levemente entre ambas formas de la PK (Tabla 1).

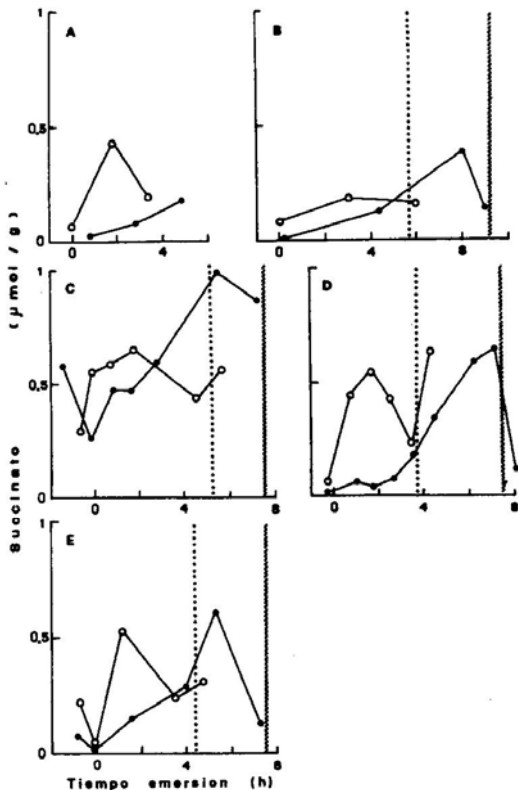


Figura 1. Determinación de succinato en músculo aductor de *P. purpuratus* trasplantado a los límites superior (●) e inferior (○) de su distribución natural en Punta Metri. Las líneas punteadas y achuradas corresponden al fin de la emersión en el trasplante inferior y superior, respectivamente. Las figuras A y B corresponden a las determinaciones de succinato realizadas en época de primavera (septiembre), la figura C en verano (diciembre) y las figuras D y E en otoño (marzo - mayo).

Figure 1. Succinate production on the adductor muscle of *P. purpuratus* transplanted from the middle zone of their natural intertidal distribution, to the upper (●) and lower (○) intertidal margins of the natural distribution of this mussel in Metri Bay. The dotted and dashed lines correspond to the end of the emersion period in the upper and lower intertidal transplantations. The figures A and B correspond to the succinate production in spring (September), the figure C in summer (December) and the figures D and E in autumn (March-May).

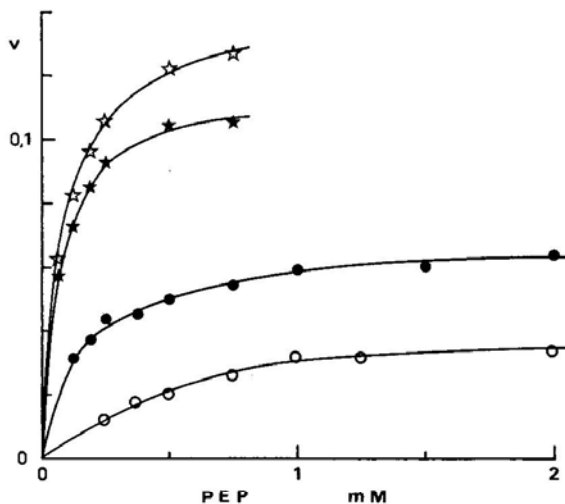


Figura 2. Curvas de saturación para el sustrato PEP (mM) de las formas "inhibida" (fosforilada) (○, ☆) y "activa" (desfosforilada) (●, ★) de la PK de músculo aductor de *P. purpuratus*, luego de la cromatografía en Sephadex G-100. Se muestran las curvas de saturación en ausencia ("control") (○, ●) y en presencia (☆, ★) de FDP 0,1 mM. La velocidad corresponde a $\Delta E_{340}/\text{min}$.

Figure 2. Saturation curves for the substrate PEP (mM), for the inhibited (phosphorylated) (○, ☆) and active (dephosphorylated) (●, ★) forms of the *P. purpuratus* muscle PK (partially purified by filtration chromatography in Sephadex G-100). The figure shows the saturations curves in the absence (control) (○, ●) and in the presence (☆, ★) of 0.1mM FDP. v corresponds to $\Delta E_{340}/\text{min}$.

Tabla 1. Parámetros de las formas inhibida y activa de la PK de músculo aductor de *P. purpuratus* (curvas de la Fig. 2). La razón $V_{\text{máx}+\text{FDP}}/V_{\text{máx}}$ fue calculada de gráficos de Lineweaver-Burk; el $S_{0.5}$ (mM) y el coeficiente de Hill (n_H) para PEP fueron estimados de los gráficos de Hill correspondientes a las respectivas curvas de saturación de la Fig. 2.

Table 1. Kinetic parameters of the inhibited and active forms of the *P. purpuratus* adductor muscle PK (obtained from figure 2) $V_{\text{máx}+\text{FDP}}/V_{\text{máx}}$ was calculated from the Lineweaver-Burk plot; $S_{0.5}$ (mM) and the Hill coefficient (n_H) for PEP were determined using Hill plot of the figure 2.

	PK fosforilada	PK desfosforilada
$V_{\text{máx}+\text{FDP}}/V_{\text{máx}}$	2,59	1,69
$S_{0.5}$ (PEP)	0,86	0,14
n_H	0,91	1,02
K_m (PEP+FDP 0,1 mM)	0,086	0,060

INTERCONVERSION DE LAS FORMAS INHIBIDA Y ACTIVA DE LA PK EN EL LABORATORIO

Ejemplares llevados al laboratorio y expuestos a inmersión constante (con aireación, 10°C, sin alimento) presentaron la forma activa de la PK luego de un mínimo de 1 ó 2 días de aclimatación (Fig. 2). Sin embargo, la forma inhibida encontrada en terreno, pudo ser obtenida nuevamente exponiendo ejemplares aclimatados en inmersión continua en el laboratorio, a emersión (13-15°C) por un mínimo de 1 ó 2 días. Las formas inhibida y activa de la PK fueron tratadas con AP y $MgSO_4$ obteniéndose con este tratamiento, una rápida interconversión *in vitro* de la forma inhibida en la forma activa de la PK observada en la Fig. 2; en cambio, no se observó modificación en la cinética de la PK activa (enzima presente en inmersión continua, con aireación) luego de este tratamiento. Para confirmar estos resultados se procedió a purificar la fracción Sephadex G-100 de la PK obtenida desde organismos mantenidos en emersión o inmersión continua en el laboratorio (PK inhibida y activa, respectivamente), según protocolo descrito previamente (Simpfendörfer *et al.* 1994): precipitación con sulfato de amonio, filtración en Sephadex G-100, intercambio iónico en DEAE-Sephadex y cromatografía de afinidad en Cibacron Blue. Ambas formas de la PK fueron purificadas alrededor de 100 veces y al ser tratadas con AP/ Mg^{2+} , la forma inhibida de la PK se convirtió en la forma enzimática activa, al igual que lo observado en la fracción menos purificada obtenida directamente de la cromatografía de filtración en Sephadex G-100. La forma activa de la PK purificada de organismos mantenidos en inmersión continua con aireación, no fue afectada en su cinética por el tratamiento con AP/ Mg^{2+} , al igual que lo observado en la fracción Sephadex-G-100.

DISCUSION

En el presente trabajo se midió actividad PK en fracciones parcialmente purificadas de músculo aductor de ejemplares de *P. purpuratus* trasplantados a dos alturas intermareales, durante el ciclo de marea por un período experimental de 1,5 años. En terreno se observó sólo la forma inhibida de la PK, igual a la observada en el laboratorio en ejemplares sometidos a emersión prolongada (hipoxia): en ambos trasplantes, durante todo el ciclo de marea y durante todo el período de muestreo, se observó la misma forma inhibida de la PK.

Sin embargo, una forma activa de la PK fue detectada luego de aclimatar ejemplares por 1-2 días en inmersión continua con aireación en el laboratorio; las dos formas de PK difieren claramente en sus características cinéticas: cambia drásticamente la afinidad por el sustrato PEP ($S_{0.5}$) y la razón $V_{máx, FDP}/V_{máx}$. Este último resultado se debió principalmente a que la $V_{máx}$ para la curva control (en ausencia de FDP) (Fig. 2) cambió notoriamente entre ambas formas de la enzima, mientras que la $V_{máx}$ en presencia de FDP varió poco; no cambió el n_H entre la PK inhibida y activa (Tabla 1), al igual que lo observado previamente entre PK fosforilada y desfosforilada de otros invertebrados marinos (Plaxton & Storey 1984 a).

Los resultados sugieren que la forma inhibida estaría modificada covalentemente por fosforilación (Plaxton & Storey 1984 a,b; Michaelidis *et al.* 1988; Simpfendörfer *et al.* 1997), como se deduce al tratar la PK inhibida con fosfatasa alcalina y $MgSO_4$, tratamiento que provocó un rápido cambio de la PK a la forma activa. Las formas activa e inhibida de la PK pudieron ser interconvertidas *in vivo* en el laboratorio, al exponer bivalvos mantenidos en inmersión con aireación por 1-2 días (forma

activa de la PK) a emersión por 1-2 días, detectándose después de este período, la forma inhibida de la PK, similar a la encontrada en terreno. Este período de entre 27 y 48 h requerido para lograr la interconversión entre las dos formas de la PK, resulta ser notablemente superior al período de emersión-inmersión del ciclo natural de mareas en el intermareal (5-8 h).

Los resultados permiten sugerir que la PK se encuentra durante todo el ciclo de marea sólo en la forma fosforilada (inhibida) al igual que lo observado en el mitilido *Mytilus chilensis* (Simpfendörfer *et al.* 1997) y por tanto el mecanismo de fosforilación-desfosforilación de la PK no parece ser relevante en el gatillamiento de rutas metabólicas anaeróbicas como había sido propuesto hasta ahora por otros autores. (Plaxton & Storey 1984 a,b; Zandee *et al.* 1986; Holwerda *et al.* 1989). La regulación del acceso a rutas anaeróbicas estaría aparentemente relacionado con la presencia de efectores alostéricos de la PK en su microambiente intracelular (FDP, aminoácidos, ATP, H⁺, u otros), donde la PK fosforilada (forma inhibida) presente en terreno, aparece como más sensible a la regulación alostérica por FDP que la forma activa (Fig. 2). La rápida inhibición de la PK de *P. purpuratus* observada *in vivo* en trabajos previos en el laboratorio, al someter a organismos a emersiones cortas o hipoxia experimental (Vial *et al.* 1992), sería causada por reguladores alostéricos, para ser fosforilada luego de tiempos mayores (26 o más horas de hipoxia).

La activación por desfosforilación de la PK de *P. purpuratus* fue confirmada al tratar la PK inhibida con AP comercial, luego de etapas preliminares y avanzadas de purificación. También es concordante este resultado con la observación experimental que al purificar la forma inhibida de la PK, ésta se fue activando en el tiempo y a medida que avanzaba la purificación (resultados no presentados), al

igual que lo observado con la PK de *Mytilus chilensis* (Simpfendörfer *et al.* 1994, 1997); es probable que ello se deba a una proteína fosfatasa endógena presente en la fracción enzimática que desfosforile la enzima, observándose la activación de la PK.

Al determinar succinato en el músculo aductor se observaron diferencias en la velocidad de producción de succinato entre los dos trasplantes (Fig.1): este metabolito aumentó rápidamente en el trasplante inferior, para descender luego hacia el fin de la emersión; en el trasplante superior, en cambio, el incremento en concentración fue más lento, alcanzando niveles mayores al final de la emersión. El descenso en la concentración de succinato se debería a la producción de propionato (Kluytmans *et al.* 1977; Vial *et al.* 1992). La producción de succinato en este tejido entonces, no estaría directamente relacionada con la forma de la PK presente, ya que la forma inhibida de la PK fue la única forma detectada en terreno en ambos trasplantes; la producción diferencial de succinato a dos alturas intermareales podría estar relacionada, en cambio, con la presencia de reguladores alostéricos de la PK en el tejido (FDP o alanina), como también con variaciones en el pH intracelular (Hochachka & Mustafa 1972; Zandee *et al.* 1986). Es claro entonces, que *P. purpuratus* posee el mecanismo de regulación por fosforilación de la PK pero no están claras las circunstancias ambientales en las cuales este mecanismo de regulación opera.

Se ha postulado que la utilización de rutas metabólicas anaeróbicas sería más frecuente en especies de la zona intermareal inferior (Simpfendörfer *et al.* 1995) y que los depredadores (agentes bióticos frecuentes en la zona intermareal baja de Metri) podrían ser causantes de períodos de anaerobiosis en bivalvos marinos (Vial *et al.* 1992; López *et al.* 1995). No cabe duda que estudios más detallados sobre la regulación de la piruvato

quinasa en moluscos, como también de otras enzimas glicolíticas, aportarán valiosa información sobre la regulación de la

ruta metabólica anaeróbica y su real dependencia de variables ecológicas bióticas y abióticas presentes en la zona intermareal.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por Fondecyt N° 1941063, a M.V.V. Los aportes de David Nash en algunas experiencias, como la traducción del resumen por Susan Angus, son reconocidos.

LITERATURA CITADA

- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brooks, SPJ & KB Storey. 1991. The role of protein kinases in anoxia tolerance in facultative anaerobes: purification and characterization of a protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase. *Biochemistry and Biophysical Acta* 1073: 253-259.
- Bücher, T & G Pfeleiderer. 1955. Pyruvate kinase from muscle. En: Colowick S & NO Kaplan (eds), *Methods in Enzymology* 1: 435-440. Academic Press, Nueva York.
- Fields, JHA. 1983. Alternatives to lactic acid: possible advantages. *Journal of Experimental Zoology* 228: 445-457.
- Hakim, G, E Carpené, P Cortesi & G Isani. 1985. Regulation by phosphorylation-dephorylation of pyruvate kinase in *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalvis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 80B: 109-112.
- Hochachka, PW & T Mustafa. 1972. Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* 178: 1056-1060.
- Hochachka, PW & GN Somero. 1984. Limiting oxygen availability. En: *Biochemical adaptation*: 145-181. Princeton University Press, Nueva Jersey.
- Holwerda, DA, M Veldhuizen-Tsoerkan, PR Veenhof & E Evers. 1989. *In vivo* and *in vitro* studies on the pathway of modification of mussel pyruvate kinase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92B: 375-380.
- Kluytmans, JH, AMT de Bont, J Janus & TCM Wijsman. 1977. Time dependent changes and tissue specificities in the accumulation of anaerobic fermentation products in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 58B: 81-87.
- López, DA, ML González, MV Vial & RW Simpfendorfer. 1995. Sublethal effects provoked by the presence of the predator *Nucella crassilabrum* upon the mussel *Perumytilus purpuratus*. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 469-475.
- Michaelidis, B, C Gaitanaki & I Beis. 1988. Modification of pyruvate kinase from the foot muscle of *Patella caerulea* (L) during anaerobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 248: 264-271.
- Munday, K, I Giles & P Poat. 1980. Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. *Comparative Biochemistry and Physiology* 67B: 403-411.
- Plaxton, WC & KB Storey. 1984a. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle tissue of the channelled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. *European Journal of Biochemistry* 143: 257-265.
- Plaxton, WC & KB Storey. 1984b. Phosphorylation *in vivo* of red-muscle pyruvate kinase from the channelled whelk, *Busycotypus canaliculatum*, in response to anoxic stress. *European Journal of Biochemistry* 143: 267-272.

- Simpfendörfer, RW, MV Vial, D Nash, ML González & DA López. 1994. Estudio de la piruvato quinasa del músculo aductor de *Mytilus chilensis*: organismos obtenidos de diferentes alturas intermareales. Revista de Biología Marina, Valparaíso, 29: 113-125.
- Simpfendörfer, RW, MV Vial, DA López, M Verdala & ML González. 1995. Relationship between the aerobic and anaerobic metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jehlius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé) (Bivalvia). Comparative Biochemistry and Physiology 111B: 615-623.
- Simpfendörfer, RW, MV Vial & A Monsalve. 1997. Adductor muscle pyruvate kinase from the bivalve *Mytilus chilensis* (Hupé): evidence of the presence of a phosphorylated form of the enzyme during the entire tidal cycle. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 213: 169-179.
- Vial, MV, RW Simpfendörfer, DA López, ML González & K Oelckers. 1992. Metabolic responses of the intertidal mussel *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) in emersion and immersion. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 159: 191-201.
- Zandee, D, DA Holwerda, J Kluytmans & A de Zwaan. 1986. Metabolic adaptations to environmental anoxia in the intertidal bivalve mollusc *Mytilus edulis* L. Netherland Journal of Zoology 36: 322-343.