

ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE GALLERIA MELLONELLA L. (LEP.: PYRALIDAE)

GENERAL ASPECTS OF THE METABOLISM OF GALLERIA MELLONELLA L. (LEP.: PYRALIDAE)

Alberto Salazar A.¹
Francisco Merino T.¹

RESUMEN

Se investigaron las variaciones metabólicas del insecto Galleria mellonella durante la metamorfosis (estados de larva, pupa y adulto). Se encontró que en el estado de larva se incrementa sensiblemente la actividad de la deshidrogenasa málica (MDH) y que en los estados de pupa y de adulto la actividad de esta enzima mantiene niveles también incrementados, pero en menor grado. Una consecuencia de este estado en el metabolismo de Galleria, es la alta concentración de succinato en las formas larvianas principalmente.

En el estado de pupa se hace evidente un incremento en la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH), lo cual corresponde a un incremento correlativo del lactato. Lo anterior permite suponer una clara actividad metabólica de tipo anaeróbico durante la fase de pupa en Galleria mellonella.

ABSTRACT

Changes in the metabolic cycle of Galleria mellonella were studied during metamorphosis (larval, pupal and adult stages). It was found that dehydrogenase malic (MDH) activity increases sharply during the larval stage and to a lesser degree in pupal and adult stages. This result explain in part the high concentration of succinate in larvae.

The dehydrogenase lactic (LDH) activity increases according to a correlative increase in lactate in the pupal stage. The results mentioned above permit us to assume that metabolic activity of Galleria mellonella is typically anaerobic during the pupal stage.

INTRODUCCION

Es conocido el hecho de que casi todos los insectos están adaptados a las condiciones aeróbicas de vida, aunque también se sabe que algunos son capaces de sobrevivir por tiempo prolongado en condiciones de vida sin oxígeno. La mayoría de las formas de vida aeróbica rápidamente inactivan sus movimientos cuando falta oxígeno, prolongando por varias horas sus condiciones de supervivencia, situación ésta que resultaría fatal para la gran mayoría de los mamíferos en unos pocos minutos. Esta gran diferencia de los insectos con los mamíferos respecto de la respuesta vital a la anaerobiosis, se explica por la existencia, en los primeros, de mecanismos para obtener energía en estas condiciones, evidentemente inexistentes en los segundos (Gilmour, 1968).

Los estudios del metabolismo en los músculos del vuelo de los insectos demuestran que descomponen la glucosa por la vía de Embden - Meyerhof produciendo dos sustancias en cantidades equimolares: el piruvato y el α -glicerofosfato. No hay por lo tanto una ganancia de ATP en el proceso, puesto que se utilizan dos moléculas hasta formar fructosa 1,6-difosfato y se sintetizan dos en los precursores que llevan del 1,3-difosfoglicerato al piruvato (fig. 1). Solamente en los casos en que el glicógeno actúa como sustrato hay ganancia neta en el proceso de producción de energía.

La glicólisis anaerobia en los insectos es mucho menos eficiente que en los vertebrados, desventaja aparente que en los primeros está compensada por la ventaja de suponer un sistema en el que se acoplan la fases citoplasmática y mitocondrial de la degradación de los hidratos de carbono durante la producción energética en condiciones aerobias (Gilmour, 1968).

1. Profesores, Depto de Biología, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

Aunque el glicógeno se almacena en los músculos de todos los insectos y en determinadas circunstancias sirve como fuente principal de energía para el metabolismo, muchos de ellos también presentan como fuente normal de energía la trehalosa, disacárido presente en la hemolinfa de los mismos que reacciona en presencia de la enzima trehalasa, formando dos moléculas de glucosa (Gilmour, 1968). En *Chironomus plumosus* la fuente principal de energía en el estado larvario es el glicógeno (Franck, 1983), mientras que las polillas requieren necesariamente de las grasas como fuentes de combustible durante el vuelo (Pant y Kumar, 1979). *Periplaneta americana* y *Helicopriss dillani* utilizan como fuentes energéticas el glicógeno y la prolina respectivamente (Dawner y Parker, 1979).

Las actividades de las enzimas que intervienen en el ciclo del ácido tricarbónico y la cadena respiratoria, varían según el estado del desarrollo durante la metamorfosis; así, en *Nauphoeta cinerea* la actividad de la citocromo oxidasa aumenta durante el estado larval, mientras que en el estado de pupa el incremento se produce en la actividad de la deshidrogenasa láctica (Tikhonravova, 1978). En dípteros, como *Sarcophaga ruficornis*, es mayor la concentración de citrato en el estado de larva que en el estado de pupa (Pant y Kumar, 1981).

Las larvas de *Galleria mellonella*, objetos de este estudio, tienen una especial capacidad para digerir la cera acumulada en los panales de las abejas, la cual constituye el nutriente principal de su alimentación. Es evidente, por lo tanto, que el metabolismo de esta especie debe estar muy especializado, para poder llevar a cabo las transformaciones necesarias que requieren el aprovechamiento de una dieta tan restringida.

Los estudios en abejas (*Megachile rotundata*) demuestran que en el estado de prepupa y en los comienzos de la pupa, se incrementa la descomposición de las sustancias de reserva, tales como el glicógeno y las grasas, mientras que disminuye la energía de intercambio gaseoso. Lo anterior permite suponer que en estos estados se incrementan los procesos del metabolismo anaeróbico, en reemplazo de los procesos del metabolismo aeróbico (Kiruva y Bodnarchuk, 1984).

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron muestras de *Galleria mellonella* de panales de abejas invadidos que se encontraban localizados en la hacienda El Progreso, la cual está ubicada en el corregimiento de El Hatillo perteneciente al mu-

nicipio de Barbosa (Antioquia, Colombia), a unos 30 km al norte de Medellín.

Las larvas de *Galleria* se trasladaron al laboratorio de fisiología en recipientes cerrados que contenían trozos de panales ya abandonados por las abejas y de los cuales se alimentaban durante todas las fases de su metamorfosis. Tales recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente y en la oscuridad con el fin de evitar al máximo un efecto oxidativo de la luz sobre las larvas, el cual podría alterar el patrón de respuesta metabólica que se pretendía estudiar.

En la medida en que se iban alcanzando las diferentes fases del desarrollo durante la metamorfosis de *Galleria* (larva, pupa y adulto) se procedía a sacrificar los organismos con el fin de preparar un extracto en frío de su musculatura (Bücher *et al.*, 1964). Una vez realizado lo anterior se procedió a montar los ensayos enzimáticos correspondientes.

Ensayos enzimáticos

Los experimentos practicados para medir la actividad de las enzimas en los extractos musculares de *Galleria* (Bücher *et al.*, 1964), correspondieron a las siguientes enzimas (entre paréntesis aparecen las referencias comerciales de cada una):

Hexoquinasa (HK) (EC. 2.7.1.1), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) (EC. 1.1.1.49), fosfofructoquinasa (PFK) (EC. 2.7.1.11), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (EC. 1.2.1.12), piruvato quinasa (PK) (EC. 2.7.1.40), lactato deshidrogenasa (LDH) (EC. 1.1.1.27), fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) (EC. 4.1.2.1.32), glicero deshidrogenasa (GDH) (EC. 1.1.1.8), enzima málica (ME) (EC. 1.1.1.40), glutamato piruvato transaminasa (GPT) (EC. 2.6.1.1), isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (EC. 1.1.1.42), malato deshidrogenasa (MDH) (EC. 1.1.1.37), glutamato deshidrogenasa (Glu-DH) (EC. 1.4.1.3) y glutamato oxalato transaminasa (GOT) (EC. 2.6.1.1).

Para la preparación de los extractos de músculo de *Galleria mellonella* (Bücher *et al.*, 1964), se disecaron en frío las paredes musculares de seis ejemplares de larvas, seis de pupas y seis de adultos. Los tejidos de cada grupo se colocaron por separado en 5 ml de buffer fosfato 62.5 mM a pH 7.4 con 6.3 mM de EDTA. La preparación se mantuvo entre 0 y 4°C mediante un recipiente de hielo picado, durante todo el tiempo. Cada preparado muscular se sometió posteriormente a un

proceso de homogenización, mediante un homogenizador Potter, durante 30 seg a 1 min. Luego de la homogenización, se centrifugó a 2500 g por medio de una centrífuga Piccolo durante 30 min. Descartados los precipitados, se separaron los sobrenadantes, los cuales fueron utilizados como extractos para los ensayos de actividad enzimática. Para la medición de la actividad enzimática se utilizó un espectrofotómetro Pye Unicam SP8-400 a una longitud de onda de 340 nm.

Además de los ensayos sobre actividad enzimática, también se realizaron pruebas de concentración de algunos metabolitos utilizando los métodos de Bergmeyer (1974) y Boehringer (1982). Para el caso anterior se determinó en cada extracto la concentración de sustancias intermediarias como alanina, lactato y succinato. Igualmente se determinó la concentración de proteínas en las muestras según el método de Lowry et al. (1951).

Finalmente, las muestras se sometieron a pruebas de consumo de oxígeno según el método de Wartburg, utilizando un respirómetro de Wartburg de manometría directa. Se calculó el consumo de oxígeno por gramo de peso fresco y por hora.

RESULTADOS

Las mediciones sobre el consumo de oxígeno de cada uno de los extractos de larva, pupa y adulto (correspondientes a las diferentes fases de la metamorfosis) de *Galleria mellonella*, demuestran que en la fase del estado adulto es donde mayor consumo de oxígeno se realiza (20.3 μ moles/h.g) y el estado de pupa es el que registra menor cantidad de oxígeno consumido (4.57 μ moles/h.g) (tabla 1).

Los resultados de la medición de las diferentes pruebas de actividad enzimática (tablas 2, 3 y 4) demuestran que en general éstas se presentan muy bajas en la fase del estado adulto (tabla 4); por el contrario, en la fase del estado larval se presentan elevadas (tabla 2). La comparación, sin embargo, de las actividades de cada enzima respecto al comportamiento de la actividad de la hexoquinasa (tablas 2, 3 y 4), demuestra que los cocientes obtenidos en cada extracto sólo son superiores a 1, en términos generales, cuando se trata de las pruebas ensayadas con el grupo de enzimas del estado adulto (tabla 4).

El análisis de la actividad de la LDH, enzima clave para la exploración de la glicólisis, muestra que la mayor actividad se presenta en el estado de pupa (tabla 3); sin embargo, la comparación de los cocientes respectivos,

enzima/hexoquinasa, demuestra ser superior en el grupo de extractos del estado adulto (tabla 4).

Tabla 1. Valores del consumo de oxígeno en los diferentes estados del desarrollo de *Galleria mellonella* en μ moles/h.g.

Estado del desarrollo	μ moles oxígeno/h.g
Larva	6.40
Pupa	4.57
Adulto	20.30

Similar a la anterior, la MDH muestra tener mayor actividad en el estado larval y menor en el estado adulto.

La actividad de la PEPCK, enzima clave en el proceso gluconeogénico, resultó ser mayor en el estado de pupa (tabla 4).

En el análisis de las enzimas del ciclo de Krebs, la ICDH presenta la más alta actividad en el estado de pupa y la menor en el estado adulto.

En vista de que el registro de las actividades enzimáticas por separado sólo refleja el potencial metabólico de una célula en un momento dado y no siempre el estado metabólico final de esa célula, se hace necesario complementar esta información con los resultados de las determinaciones de la concentración de algunos metabolitos, como el lactato, el succinato y la alanina.

Los ensayos para succinato y alanina permiten establecer si *Galleria mellonella*, en alguna etapa de la metamorfosis, presenta vías metabólicas semejantes a las que presentan algunos invertebrados como la ostra, la cual acumula esos sustratos. Los resultados (tablas 5, 6 y 7) demuestran que el succinato se encuentra en mayor cantidad en el estado larval y su concentración disminuye gradualmente hasta alcanzar el estado adulto, el cual registra los niveles mínimos. La concentración de alanina, por el contrario, se presenta con índices de aumento a lo largo de la metamorfosis, alcanzando picos máximos en el estado adulto. El lactato, finalmente, presenta su punto máximo de concentración en el estado de pupa, lo que permite suponer que el estado de pupa es la fase en la cual se desarrolla un sistema metabólico predominantemente anaeróbico.

DISCUSION

Si se analizan los resultados de consumo de oxígeno en los diferentes estados de la metamorfosis de *Galleria*

mellonella (tabla 1), y los resultados de las pruebas de actividad enzimática en los estados de larva, pupa y adulto (tablas 2, 3 y 4), se puede observar que el menor consumo de oxígeno y la mayor actividad de la LDH, se centran alrededor del estado de pupa. Además, la mayor acumulación de lactato en la musculatura en el estado de pupa (tablas 5, 6 y 7), permite concluir que en este estado de la metamorfosis se está fermentando glucosa a lactato bajo condiciones hipóxicas.

En el estado adulto, correspondiente a aquel en el cual se registran los más altos índices de consumo de oxígeno, la acumulación de lactato se reduce a casi la mitad (18.00 μ moles/g peso fresco) del que se acumula en el estado de pupa. Este resultado, acompañado de la reducción en la actividad de la HK en casi un tercio en relación con la actividad de la HK de la pupa, indica que el estado adulto necesita menos energía, lo cual está de acuerdo con las observaciones hechas durante el experimento, en la que los adultos mantenidos en frascos de aproximadamente 5 l, exhibían muy poco movimiento.

En el análisis de las actividades de otras enzimas que participan en la glicólisis, comparadas con la actividad de la HK, se observa en el estado adulto un aumento en el producto de los cocientes, lo cual indica que aunque el adulto mantenga una demanda energética baja, su actividad glicolítica se mantiene elevada.

El análisis de las pruebas sobre acumulación de succinato y alanina durante la metamorfosis de *Galleria mellonella*, demuestra que en el estado larval se presenta una mayor acumulación de succinato, lo cual parece indicar que en esta fase *Galleria mellonella* exhibe un metabolismo anaerobio semejante al que se presenta en la ostra.

No obstante todo lo anterior, la existencia de esta fase anaerobia del metabolismo podría ser cuestionable, ya que la acumulación de lactato y succinato en los estados larval y de pupa, respectivamente, no son, en forma alguna, muy apreciables. Lo anterior daría pie para pensar que además de la derivación del ciclo por la vía glicolítica, sigue funcionando la cadena de citocromos, pues enzimas claves del ciclo de Krebs, como la ICDH,

presentan incrementos importantes en su actividad, en su paso de larva a pupa.

Por otra parte, además del cambio en las actividades por la vía glicolítica, se observa una mayor actividad de la GPT y la GOT durante el estado larval. Dado que tales enzimas, especialmente la primera, son necesarias para la transaminación del piruvato con el glutamato, formando al final succinato por descarboxilación del α -cetoglutamato, se explica así la alta concentración del succinato en el estado larval.

La mayor actividad en el estado de pupa de la PEPCK, enzima clave en el proceso de gluconeogénesis, indica que además de darse la vía glicolítica, también se utiliza la energía para sintetizar más glucosa.

Finalmente, es importante destacar la mayor actividad de la MDH durante los estados larval y de pupa. Tal enzima, importante en el proceso de lipogénesis, se encuentra especialmente activada en el estado larval, en donde se presume una mayor actividad en el proceso de síntesis de lípidos, necesarios para suplir las necesidades energéticas de *Galleria* durante el prolongado estado de pupa. A manera de hipótesis, se podría pensar que uno de los más importantes puntos de ataque para el control de *Galleria mellonella* como plaga podría ser la acción sobre la actividad de enzimas como la MDH, ya que ella representa una de las rutas más importantes en el desarrollo metabólico de tales insectos.

AGRADECIMIENTOS

Hacemos un reconocimiento especial a la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero ofrecido a este proyecto y al gobierno de la República Federal Alemana por su valioso aporte en el suministro de algunos equipos científicos.

También agradecemos al profesor Rafael Salamanca, de la Facultad de Química Farmacéutica, por su valiosa colaboración en la realización de algunos ensayos enzimáticos y al profesor José Rincón M., de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por el suministro del material de *Galleria mellonella*.

Tabla 2. Actividad de diferentes enzimas metabólicas en larvas de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales (promedio de tres experimentos)

Enzima	μ moles sustrato	Enzima
	h. mg proteína	Hexoquinasa
1. Piruvato quinasa (PK)	0.50	0.66
2. Lactato deshidrogenasa (LDH)	1.23	1.62
3. Malato deshidrogenasa (MDH)	27.83	36.60
4. Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK)	0.56	0.74
5. Glutamato oxalato transaminasa (GOT)	0.77	1.01
6. Glutamato deshidrogenasa (Glu-DH)	0.34	0.45
7. Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	2.72	3.58
8. Glicero deshidrogenasa (GDH)	0.38	0.50
9. Glutamato piruvato transaminasa (GPT)	2.60	3.42
10. Hexoquinasa (HK)	0.76	1.00
11. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH)	2.13	2.80
12. Enzima málica (ME)	0.68	0.89
13. Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	1.03	1.36
14. Fosfofructoquinasa (PFK)	-	-

Tabla 3. Actividad de diferentes enzimas metabólicas en pupas de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales (promedio de tres experimentos)

Enzima	μ moles sustrato	Enzima
	h. mg proteína	Hexoquinasa
1. Piruvato quinasa (PK)	10.93	10.66
2. Lactato deshidrogenasa (LDH)	2.95	2.93
3. Malato deshidrogenasa (MDH)	18.82	18.81
4. Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK)	0.95	0.94
5. Glutamato oxalato transaminasa (GOT)	0.56	0.57
6. Glutamato deshidrogenasa (Glu-DH)	0.31	0.31
7. Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	2.38	2.37
8. Glicero deshidrogenasa (GDH)	0.28	0.28
9. Glutamato piruvato transaminasa (GPT)	1.02	1.01
10. Hexoquinasa (HK)	1.06	1.00
11. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH)	1.16	1.16
12. Enzima málica (ME)	0.79	0.79
13. Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2.74	2.72
14. Fosfofructoquinasa (PFK)	0.48	0.48

Tabla 4. Actividad de diferentes enzimas metabólicas en adultos de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales (promedio de tres experimentos)

Enzima		μ moles sustrato h. mg proteína	Enzima Hexoquinasa
1.	Piruvato quinasa (PK)	2.81	9.40
2.	Lactato deshidrogenasa (LDH)	1.50	5.00
3.	Malato deshidrogenasa (MDH)	0.45	1.50
4.	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK)	0.58	1.90
5.	Glutamato oxalato transaminasa (GOT)	0.46	1.50
6.	Glutamato deshidrogenasa (Glu-DH)	0.21	0.70
7.	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	3.16	10.50
8.	Glicero deshidrogenasa (GDH)	0.17	0.57
9.	Glutamato piruvato transaminasa (GPT)	0.36	1.20
10.	Hexoquinasa (HK)	0.30	1.00
11.	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH)	0.22	0.70
12.	Enzima málica (ME)	1.30	4.30
13.	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	0.43	1.40
14.	Fosfofructoquinasa (PFK)	0.54	1.80

Tabla 5. Concentración de los metabolitos lactato, succinato y alanina en el tejido muscular de larvas de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales.

Matabolito	μ moles/g peso fresco	Influencia ambiental
Lactato	5.62	Normal
Succinato	25.47	Normal
Alanina	0.95	Normal

Tabla 6. Concentración de los metabolitos lactato, succinato y alanina en el tejido muscular de pupas de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales.

Matabolito	μ moles/g peso fresco	Influencia ambiental
Lactato	33.48	Normal
Succinato	15.70	Normal
Alanina	2.20	Normal

Tabla 7. Concentración de los metabolitos lactato, succinato y alanina en el tejido muscular de adultos de *Galleria mellonella*, bajo condiciones ambientales.

Matabolito	μ moles/g peso fresco	Influencia ambiental
Lactato	18.00	Normal
Succinato	3.16	Normal
Alanina	8.90	Normal

LITERATURA CITADA

- Bergmeyer, H.V. 1974. Methoden der enzymatischen analyse. Bd. Verlag chemie weinheim Bergstrasse. Alemania.
- Boehringer, Mannheim. 1982. Uvtest zur Bestimmung von Bersteinsäure in lebensmitteln.
- Bücher, T., W. Luh y D. Pette. 1964. Einfache und zusammengesetzte optische test mit Pyridinnucleotiden. Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen analyse, 10. Aufl, Bd.IV/a, Springer Verlag, Berlin.
- Dawson, R.G.H. y G.H. Parker. 1979. Glycogen utilization during flight in the american cockroach, *Periplaneta americana*. Comp. Biochem. Physiol. 64(1): 29-32.
- Englishch, H., B. Opalka y E. Zebe. 1982. The anaerobic metabolism of the larvae of the midge. Insect. Biochem. 12(2): 149-156.
- Franck, C. 1983. Ecology, production and anaerobic metabolism of *Chironomus plumosus* larvae in a shallow lake. Arch. Hydrobiol. 96(3): 354-362.
- Gilmour, D. 1968. Metabolismo de Insectos. Edit. Alhambra, Madrid. 186-192.
- Kruva, I.M. y L.I. Bodnarchuk. 1984. Changes in the intensity of some processes of the metabolism at various stages of ontogenesis of the bee. Ves T.N. Zool. 0(1): 72-75.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebraugh y C.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-271.
- Meldell, A.M. 1983. Diapause, aerobic and anaerobic metabolism in alpine adult *Melissoma collaris* (Coleoptera). Oikos 41(2): 239-244
- Meyer, S.G.E. 1980. Studies in anaerobic glucosa and glutamato metabolism in larvae of *Colletroga moelleraris*. Insect Biochem. 10(4): 449-456
- Pant, R. y S. Kumar. 1979. Metabolism fate of carbohydrates and lipids during molting cycle of *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). Insect Biochem. 9(6): 577-582.
- _____. 1981. Gluconeogenesis in the dipterus fleshfly. Indian J. Biochem. Biophys. 18(1): 40-46.
- Prices, G.M. 1963. The effects of anoxia on metabolism in the adult housefly, *Musca domestica*. Biochem. J. 86: 372-378.
- Rockstein, M. 1957. Some aspects of Intermediary metabolism of carbohydrates in insects. Ann. Rev. Entomol. 2-19.
- Storey, K.B., J.G. Beust y J.M. Storey. 1981. Intermediary metabolism during low temperature acclimation in the overwintering gall fly larvae, *Eurosta solidaginis*. J. Comp. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol. 144(2): 183-190.
- Tikhonravova, N.M. 1978. The respiration characteristics in the cockroach *Nauphoeta cinerea* during postembryogenesis. Zool. Zh. 57(12): 1806-1809.
- Womersley, Ch. y E.G. Platzer. 1984. Quantitative analysis of tricarboxylic acid cycles from micro samples of insect hemolymph. Insect Biochem. 14(4): 395-400.