

R. 8258

7-464

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

145 162

*Maria Dolores Mateos*

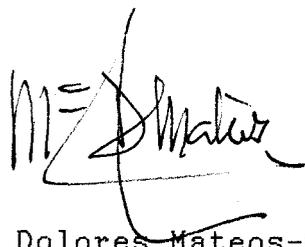
ESTUDIO DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO  
EN LAS PRINCIPALES PROTEINAS ENZIMATICAS IMPLICADAS EN LOS  
PROCESOS DIGESTIVOS.

Tesis presentada para la obtención  
del grado de Doctor en Farmacia por  
Maria Dolores Mateos-Nevado Alonso.

Sevilla, Mayo de 1991.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

Tesis que presenta la Lda. Maria Dolores Mateos-Nevado  
Alonso para optar al grado de Doctor en Farmacia.



Fdo. M<sup>ª</sup> Dolores Mateos-Nevado Alonso.

V<sup>º</sup> B<sup>º</sup> de los Directores de la Tesis:



Fdo: Prof. Dr. Alberto Machado de la Quintana  
Catedrático de Universidad.



Fdo: Prof. Dr. Benito Mateos-Nevado Artero  
Profesor Titular de Universidad.

**INDICE**

## INDICE.

### I. INTRODUCCION.

I.1.	ENVEJECIMIENTO Y ENZIMAS.....	1
I.2.	HIPOTESIS DEL ENVEJECIMIENTO.....	2
I.2.1.	Hipótesis del error catastrófico.....	4
I.2.2.	Hipótesis de modificaciones post-traduccionales.....	7
I.2.2.1.	Modificaciones post-traduccionales-enzimáticas.....	7
I.2.2.2.	Modificaciones post-traduccionales-no-enzimáticas.....	7
	Glicación o glucosilación no-enzimática.	11
	Modificaciones oxidativas no-enzimáticas	14
I.3.	MECANISMOS DE OXIDACION DE PROTEINAS MEDIADOS POR SUSTANCIAS OXIGENADAS ACTIVAS.....	26
I.4.	SIGNIFICACION DE LAS MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE LAS PROTEINAS.....	29
I.5.	METODOS MAS USUALES UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE GRUPOS CARBONILOS EN LAS PROTEINAS.....	33
I.6.	COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.....	38
I.6.1.	Recuerdo anatomo-fisiológico.....	38
I.6.2.	Descripción del complejo sacarasa-isomal-	



III.11.	INMUNOPRECIPITACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	76
III.12.	DISOCIACION DEL COMPLEJO-SI EN DOS SUBUNIDADES ENZIMATICAMENTE ACTIVAS.....	76
III.13.	MODIFICACION QUIMICA.....	78
III.13.1.	Determinación de grupos-SH.....	78
III.13.2.	Determinación de grupos arginina.....	81
III.13.3.	Determinación de grupos histidina.....	82
III.13.4.	Determinación del número de restos de lisina.....	83
III.13.5.	Modificación de los restos metionina..	83
III.14.	INACTIVACION DEL COMPLEJO-SI CON EL SISTEMA MCO NO-ENZIMATICO: Fe (III)/ Ascorbato / O <sub>2</sub> y Cu (II) / Ascorbato / O <sub>2</sub> .....	85
III.15.	DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS.....	86
III.15.1.	Determinación de grupos carbonilos con 2,4-dinitro-fenil-hidrazina.....	86
III.15.2.	Determinación de grupos carbonilos con Digoxigenin-succinil- -amino-caproico-hidrazida.....	89
III.16.	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EL INTESTINO DELGADO.....	92
III.16.1.	Actividad proteolítica pancreática.....	92
III.16.2.	Actividad proteolítica intestinal.....	94
III.16.2.1.	Actividad proteolítica intestinal ácida.....	94

III.16.2.2. Actividad proteolítica intestinal alcalina.....	95
III.17. SENSIBILIDAD FRENTE A PROTEASAS.....	96
III.18. ESTABILIDAD TERMICA.....	97
III.19. DESGLUCOSILACION.....	97

#### IV. RESULTADOS.

IV.1. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL CONTENIDO PROTEICO DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.....	99
IV.2. DISTRIBUCION DEL COMPLEJO-SI A LO LARGO DEL INTES- TINO DELGADO DE RATA Y VARIACION DE SU ACTIVIDAD DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	104
IV.3. EXTRACCION DEL COMPLEJO-SI A PARTIR DE LAS MEMBRA- NAS DE LAS MICROVELLOSIDADES DEL INTESTINO DEL- GADO.....	109
IV.4. INMUNOTITULACION.....	111
IV.4.1. Inmunotitulación de la actividad sacarasa e isomaltasa con anticuerpos policlonales anti sacarasa-isomaltasa.....	111
IV.4.2. Inmunotitulación con el anticuerpo mono- clonal BBC 1-35/11/2.....	114
IV.5. PURIFICACION DEL COMPLEJO-SI.....	118
IV.6. SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO-SI ME- DIANTE CITRACONILACION.....	122

V.9.	SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO-SI FRENTE A LAS PROTEASAS INTESTINALES.....	204
V.10.	INACTIVACION TERMICA.....	206
V.11.	EFECTO DE LA GLUCOSILACION SOBRE LA SENSIBILIDAD A PROTEASAS, DEL COMPLEJO-SI.....	207
VI.	CONCLUSIONES.....	209
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	212

# INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION.

### I.1. ENVEJECIMIENTO Y ENZIMAS.

Durante el envejecimiento se producen, entre otros muchos, una serie de cambios estructurales y funcionales de las enzimas, como consecuencia de lo cual, en algunos casos, una misma enzima presenta distinto comportamiento según proceda de animales jóvenes o de animales viejos, apareciendo a lo largo del proceso de envejecimiento importantes alteraciones funcionales y estructurales en algunas enzimas de origen y localización diferente.

Entre las propiedades que sufren cambios durante el proceso de envejecimiento, podemos citar: propiedades cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ), actividad enzimática, sensibilidad térmica, propiedades espectrales, sensibilidad e inactivación frente a proteasas (Gershon y Gershon, 1970, 1973; Lavie y col., 1982; Reznick y col., 1981), siendo la pérdida de actividad de un gran número de enzimas uno de los fenómenos más generales y mejor conocidos, de todos los que ocurren durante el proceso de envejecimiento (Gershon y Gershon, 1970; Reznick y Gershon, 1979; Rothstein, 1977;

Sharma y Rothstein, 1978, 1980; Rothstein, 1982), si bien este comportamiento no es general para todas las enzimas, ni se produce en todos los órganos, pues aunque, la mayoría de las enzimas pierden actividad durante el envejecimiento (Reiss y Gershon, 1976; Weber y col., 1976; Rothstein y col., 1980; Sharma y Rothstein, 1980; Gordillo y col., 1988, 1989), otras no sufren cambios (Joenje y col., 1978; Petell y col., 1978; Sharma y Rothstein, 1979) e incluso en algunas aumenta su actividad (Vitorica y col., 1981a, 1981b, 1981c; Machado y col., 1983; ).

Otras propiedades como el peso molecular, aminoácido N-terminal y C-terminal, carga eléctrica, comportamiento electroforético e inmunodifusión, parecen no sufrir cambio alguno (Gorin y col., 1977; Gershon, 1979; Hayflick, 1980) (Tabla I).

## **I.2. HIPOTESIS DEL ENVEJECIMIENTO.**

Las modificaciones estructurales de las enzimas asociadas al proceso de envejecimiento, así como los mecanismos por los que estas modificaciones tienen lugar no son aún bien conocidos, por lo que no se puede formular una teoría sólida que dé respuesta satisfactoria a los hechos que en la actualidad están científicamente bien

**TABLA I. PROPIEDADES DE LAS PROTEINAS ALTERADAS CON  
LA EDAD**

---

**Propiedades que sufren cambios con más frecuencia:**

- propiedades cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$ )
- actividad específica
- sensibilidad térmica
- propiedades espectrales
- inactivación por proteasas
- inmunotitulación

**Propiedades que no sufren cambios:**

- peso molecular
  - aminoácidos C- y N-terminal
  - carga eléctrica (pI)
  - comportamiento electroforético
  - inmunodifusión
-

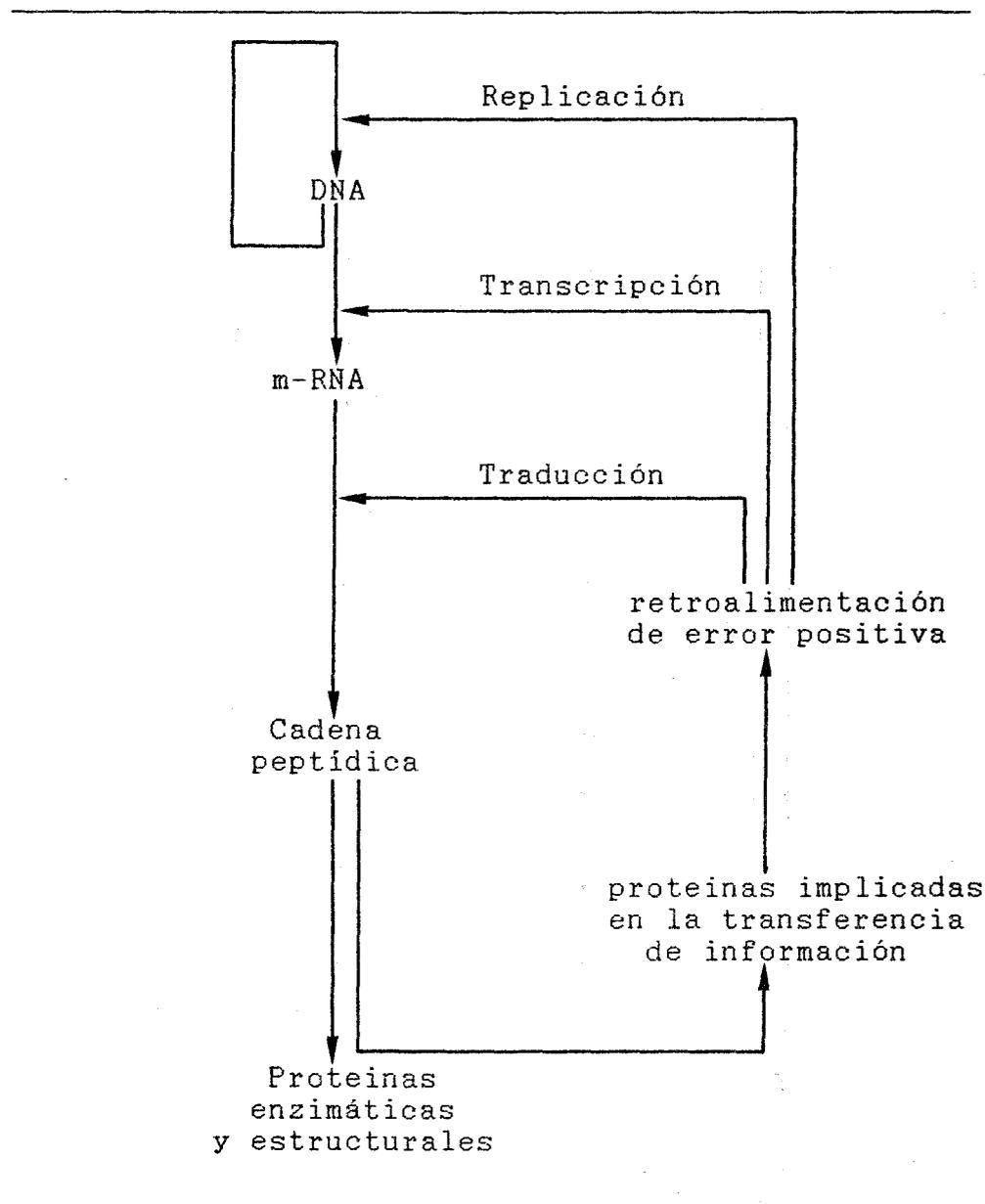
establecidos, especialmente en lo referente a la pérdida de actividad específica que algunas enzimas sufren durante el proceso de envejecimiento, transformándose en formas inactivas o menos activas. Y así, lo que en realidad existen son hipótesis, que en unos casos más que en otros, dan respuestas parcialmente satisfactorias.

De todas ellas, analizaremos brevemente la del **error catastrófico** y la de las **modificaciones post-traduccionales**.

#### **I.2.1. HIPOTESIS DEL ERROR CATASTROFICO.**

Esta hipótesis, formulada inicialmente por Medvedev y desarrollada posteriormente por Orgel (1963), supone que la fidelidad del proceso de síntesis de proteínas se pierde con el tiempo, produciéndose una serie de proteínas erróneas, que van aumentando en cantidad, por lo que la célula va envejeciendo. La actuación de estas enzimas modificadas en los diversos procesos en los que intervienen no sería normal, suponiendo Orgel que algunos de estos procesos son la replicación, transcripción o traducción del DNA. Los errores en estas series de reacciones conducen a una regulación por retroalimentación (*feed-back*) positiva de errores en todo el mecanismo que conduce a la formación final de las proteínas (Fig. 1) (Orgel, 1963; Holliday,

FIGURA 1. FLUJO DE INFORMACION Y PROCESOS IMPLICADOS  
EN LA MODIFICACION DE LAS PROTEINAS  
(TEORIA DE ORGEL).



1965).

En la actualidad, se piensa que, esta hipótesis tiene pocas probabilidades de ser cierta, ya que:

a) Si los errores fueran a nivel de maquinaria biosintética, todas las proteínas, en viejos, deberían estar modificadas, fenómeno que no ocurre (Steinhagen-Thiessen y Hiltz, 1976).

b) Muchas de las enzimas estudiadas, en jóvenes y en viejos, como es el caso de proteínas del imago de *Drosophila melanogaster*, presentan el mismo peso molecular y el mismo punto isoeléctrico, lo que indica que la expresión génica no presenta ninguna alteración de tipo cualitativo con la edad (Fleming y col., 1986), y desde luego no es válido el argumento de que las formas viejas modificadas se pierdan durante el proceso de purificación, ya que el proceso de purificación seguido con las proteínas de animales jóvenes, es idéntico al seguido con las proteínas de animales viejos, y los rendimientos obtenidos son prácticamente idénticos.

c) Además, estudios específicos sobre la fidelidad del mecanismo de la síntesis de proteínas (Buchanan y col., 1980; Harley y col., 1980; Wojtyk y Goldstein, 1980) así como estudios específicos sobre proteínas alteradas (Rothstein, 1982; Gracy y col., 1985; Velez y col., 1985)

han demostrado que las alteraciones encontradas en las enzimas durante el proceso de envejecimiento no son debidas a mutaciones ni a cambios de aminoácidos en la estructura primaria de las proteínas, sino que parece estar más de acuerdo con modificaciones químicas producidas con posterioridad a la síntesis de proteínas, es decir a modificaciones post-traduccionales.

### **I.2.2. HIPOTESIS DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES.**

Estas modificaciones, como queda reflejado en la Tabla II, pueden ser enzimáticas y no-enzimáticas.

#### **2.2.1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES ENZIMATICAS.**

Este tipo de modificaciones, desempeñan un papel de gran importancia en procesos de control metabólico y expresión génica (Freedman y Hawkins, 1980; Wold y Moldave, 1984), sin embargo, parecen no desempeñar un papel relevante en el proceso de envejecimiento.

#### **2.2.2. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES NO-ENZIMATICAS.**

En los últimos años se han ido acumulando importantes evidencias a favor de las modificaciones post-traduccionales

**TABLA II. CLASIFICACION DE LAS MODIFICACIONES  
POST-TRADUCCIONALES COVALENTES.**

---

**1.-ENZIMATICAS.**

**A.-Modificaciones a nivel de enlace peptídico:**

a.-Degradación proteolítica parcial.

- para facilitar transporte y almacenamiento hacia y/o en determinados compartimentos celulares.
- para modificar la actividad biológica.

**B.-Modificaciones a nivel de restos aminoacídicos:**

a.-Adición de grupos no aminoacídicos (carbohidratos, lípidos)

b.-Modificación de restos aminoacídicos.

- a nivel de aminoácidos terminales (del grupo amino del N-terminal o del carboxilo del C-terminal)

-modificaciones a nivel de los restos aminoacídicos:

- fosforilación
- metilación
- acilación
- hidroxilación
- oxidación

**2.-NO-ENZIMATICAS**

**A.-Modificaciones que transcurren a través de la formación de una base de Schiff:**

- a.-Glucosilación o glicación
- b.-Reacciones con aldehidos y cetonas
- c.-Reacciones con quinonas

**B.-Otras modificaciones no-enzimáticas:**

- a.-Cianilación
- b.-Racemización
- c.-Oxidación
- d.-Isomerización

---

(Modificado por Machado, 1988)

no-enzimáticas *in vivo* durante el proceso de envejecimiento (Adelman y Sartin, 1984; Harding, 1985), observándose que cuando existe pérdida de actividad enzimática, esta pérdida frecuentemente, no suele ir acompañada de una disminución en la cantidad de enzima (Gershon y Gershon, 1973; Gafni, 1981), sino que lo que parece tener lugar es la acumulación de proteínas enzimáticas "alteradas", inactivas o con menor actividad (Rothstein, 1980; Rothstein, 1985; Stadtman, 1986; Machado, 1988), como consecuencia de este tipo de modificaciones. Este fenómeno ha sido descrito principalmente en proteínas citoplasmáticas, tales como la gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa (Gafni, 1981, 1983), glutamina sintetasa (Levine, 1983; Stadtman y col., 1985), enzima málico (Gordillo y col., 1988), fosfogluconato deshidrogenasa (Gordillo y col., 1989), etc., obtenidas a partir de diferentes fuentes (Tabla III).

Si las modificaciones post-traduccionales no-enzimáticas son una de las principales causas que conducen a la generación de proteínas inactivas o con menor actividad durante el envejecimiento, este proceso debe ser válido no sólo para proteínas citoplasmáticas (como ya hemos visto), sino también para proteínas no citoplasmáticas, como es el caso del **complejo sacarasa-isonaltasa** del intestino delgado, proteína de la membrana, situada en el borde en cepillo de las vellosidades intestinales, y cuya actividad

**TABLA III. ALGUNAS ENZIMAS QUE SE ACUMULAN EN FORMAS  
"ALTERADAS" DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.**

---

- Enolasa
  - Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
  - Lactato deshidrogenasa
  - Fosfoglicerato quinasa
  - Piruvato quinasa
  - Glutamina sintetasa
  - Glutation reductasa
  - Hipoxantina fosforribosil transferasa
  - Isocitrato liasa
  - Maltasa
  - Enzima málico
  - 6-fosfogluconato deshidrogenasa
  - Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
-

específica se modifica durante el envejecimiento (Holt and Kotler, 1987).

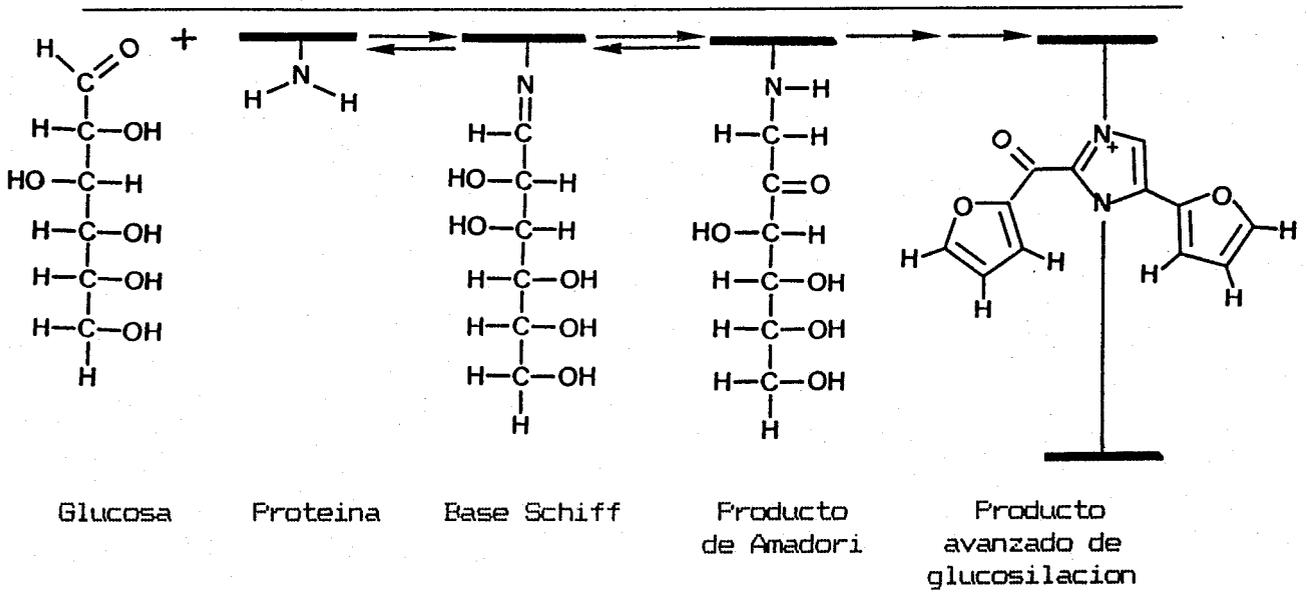
Entre los tipos de modificaciones post-traduccionales no-enzimáticas se han sugerido, entre otras, la **glicación o glucosilación no-enzimática** y las **modificaciones oxidativas**, como las principales vías responsables de la pérdida de actividad biológica (actividad enzimática o funcional) observada en muchas proteínas durante el envejecimiento.

#### **GLICACION O GLUCOSILACION NO-ENZIMATICA.**

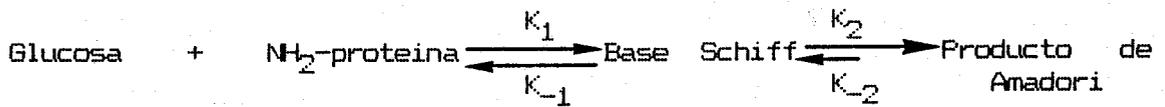
El proceso de glicación, comienza con la unión de la glucosa u otro azucar reductor, en su forma abierta y a través del grupo carbonilo, al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina o al  $\alpha$ -amino N-terminal de la cadena polipeptídica en su forma no protonizada ( $-\text{NH}_2$ ) dando lugar a la formación de una base de Schiff inestable, la cual conduce por reordenamiento, de Amadori cuando el azucar unido es una aldosa o reordenamiento de Heyns cuando es una cetosa, a la acumulación de un aducto azucar-proteína estable, químicamente reversible, que genéricamente recibe el nombre de "producto de Amadori" (Higgins y Bunn, 1981; Cheftel y Cheftel, 1989).

Es importante señalar que, dependiendo de la vida media ( $\tau$  1/2) de la proteína, en las glucosilaciones no-enzimáticas pueden formarse dos tipos de productos glucosilados (Fig. 2). Las proteínas de vida media corta (días o semanas) como la hemoglobina, albúmina, etc., pueden reaccionar con el azúcar y formar la base de Schiff a una velocidad que refleja la concentración media ambiental de glucosa (Monnier y Cerami, 1983). En pocas semanas, a través de reordenaciones químicas, llegan hasta la formación del producto de Amadori. Sin embargo, en el caso de proteínas de vida media larga (meses o años), es decir proteínas cuyo recambio (*turnover*) es mucho más lento, como en el caso del colágeno, proteínas del cristalino del ojo, etc., se producen uniones o entrecruzamientos (*crosslinking*) de los productos de Amadori, que a través de mecanismos complejos en los que están implicadas deshidrataciones y ciclaciones dan lugar a la formación de oligómeros que contienen anillos furanósicos y heterociclos nitrogenados (Pongor y col., 1984), y que son los responsables de la formación de los cromóforos complejos denominados *advanced glycosylated end-products* por Brownlee y col. (1988) o productos de glucosilación avanzada (PGA). Estos complejos coloreados se desarrollan lentamente, son irreversibles y se acumulan durante todo el tiempo de vida de la proteína, dando lugar a cambios estructurales y funcionales significativos en la proteína (Koenig y Cerami, 1980; Higgins y Bunn, 1981;

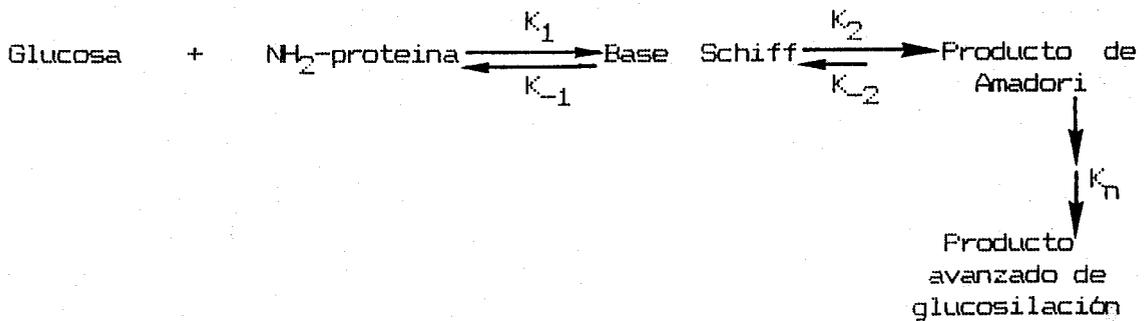
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA GLUCOSILACION NO ENZIMATICA.



I. Proteinas de vida media corta ( $\tau_{1/2}$  de dias a semanas):



II. Proteinas estructurales de vida media larga ( $\tau_{1/2}$  de meses o años):



Monier y Cerami, 1983; Cerami y col., 1985; Cerami y col., 1987; Brownlee y col., 1988).

La unión no-enzimática de la glucosa y otros azúcares reductores a los grupos  $\alpha$ - y/o  $\xi$ -amino de las proteínas puede desempeñar, *in vivo*, un papel importante en fenómenos biológicos que incluyen modificación de la actividad enzimática, susceptibilidad de proteólisis, modificación de la unión a moléculas reguladoras, reconocimiento celular y endocitosis, etc. (Romay y Pascual, 1987).

#### **MODIFICACIONES OXIDATIVAS NO-ENZIMATICAS.**

Las reacciones consideradas generalmente como responsables de la oxidación de las proteínas, son aquellas que conducen a la formación de diferentes derivados del oxígeno altamente reactivos, y que de forma genérica se denominan **sustancias oxigenadas activas (SOA)**. Esta reactividad es consecuencia de su peculiar configuración electrónica en la que existen electrones desapareados o enlaces muy lábiles.

Entre las sustancias oxigenadas activas podemos distinguir (Fig. 3):

### FIGURA 3. SUSTANCIAS OXIGENADAS ACTIVAS.

---

#### Definición:

Moléculas producidas por el metabolismo del oxígeno que son altamente reactivas con muchos otros constituyentes.

#### Radicales libres:

- radical superóxido:  $O_2^{\cdot -}$
- radical hidroxilo:  $OH^{\cdot}$
- radical peróxido:  $ROO^{\cdot}$

#### Peroxidos:

- peróxidos orgánicos:  $ROOH$
  - peróxido de hidrógeno:  $H_2O_2$
-

a) **Radicales libres oxigenados**

-radical superóxido:  $O_2^{\cdot-}$

-radical hidroxilo:  $HO\cdot$

-radical peróxido:  $ROO\cdot$

b) **Peróxidos**

-peróxido de hidrógeno:  $H_2O_2$

-peróxidos orgánicos:  $ROOH$

Entre los sistemas biológicos capaces de generar sustancias oxigenadas activas (Tabla IV), cabe destacar los que tienen lugar:

a) Mediante **sistemas enzimáticos de oxidación mediados por iones metálicos** -metal-ion catalyzed oxidation-(MCO) o simplemente **sistemas-MCO enzimáticos** constituidos por  $NAD(P)H$ ,  $O_2$ , Metal (Fe(III) o Cu(II)) y enzimas endógenas (principalmente oxidasas, algunas con una amplia distribución en las células aerobias, como es el caso de los sistemas  $NAD(P)^+/NAD(P)H$  oxidasas y el sistema-citocromo-P450, que desempeñan un papel fisiológico importante) (Oliver y col., 1980; Levine y col., 1981; Fucci y col., 1983; Stadtman y Wittenberger, 1985) y

**TABLA IV. SISTEMAS GENERADORES DE SUSTANCIAS  
OXIGENADAS ACTIVAS.**

---

**ENZIMATICOS:**

-O<sub>2</sub>

-NAD(P)H

-Metal (Fe(III) o Cu (II))

-Enzimas endógenas (sistema citocromo P-450, NAD(P)H oxidasas, peroxidasas...)

**NO-ENZIMATICOS:**

-O<sub>2</sub>

-Metal (Fe(III) o Cu(II))

-Agente reductor (ascórbico, NAD(P)H...)

---

b) Mediante sistemas no-enzimáticos de oxidación mediados por iones metálicos o simplemente sistemas-MCO no-enzimáticos (Oliver y col., 1985; Amici y col., 1989; Gordillo y col., 1989, 1990), constituidos por  $O_2$ , Metal (Fe(III) o Cu(II)) y algún agente reductor (ascórbico, NAD(P)H, etc.).

Ambos sistemas presentan características análogas, dando lugar a las mismas sustancias oxigenadas activas. Debido a esto, la mayoría de los estudios *in vitro* se realizan con sistemas-MCO no-enzimáticos y especialmente los que utilizan ascorbato.

Si se comparan las listas de proteínas enzimáticas que se inactivan mediante los sistemas-MCO (\*) enzimáticos y no-enzimáticos, con las que se acumulan de forma inactiva durante el proceso de envejecimiento (Tabla V), se observa que la gran mayoría de las enzimas que se acumulan durante el proceso de envejecimiento, se inactivan también por los citados sistemas de oxidación. Esta observación es la que ha

---

(\*) Los sistemas de oxidación catalizados por iones metálicos (metal-catalyzed oxidation, MCO) han venido denominándose hasta 1989 como sistemas de oxidación de función mixta (mixed-function oxidation, MFO), pero debido a que pudieran existir confusiones con el término "oxidasas de función mixta" se ha sustituido la denominación MFO por la de MCO.

**TABLA V. ENZIMAS INACTIVADAS POR SISTEMAS-MCO "in vitro" Y ENZIMAS QUE SE ACUMULAN EN FORMA ALTERADA DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.**

	Se inactivan	Se acumulan
-Enolasa	+	+
-Fructosa-1,6-difosfatasa	+	+
-Glucosa-6-fosfato DH	+	+
-Lactato DH	+	+
-Fosfoglicerato quinasa	+	+
-Piruvato quinasa	+	+
-Glutamina sintetasa	+	+
-Acetilcolina sintetasa	+	-
-Alcohol DH	+	-
-Aspartato quinasa III	+	-
-Creatin quinasa	+	-
-Gliceraldehido-3-fosfato DH	+	-
-Lisozima	+	-
-Ornitindescarboxilasa	+	-
-Ribonucleasa A y B	+	-
-Glutation reductasa	-	+
-Hipoxantina-fosfo- ribosil-transferasa	-	+
-Isocitrato liasa	-	+
-Enzima málico	+	+
-6-fosfogluconato DH	+	+

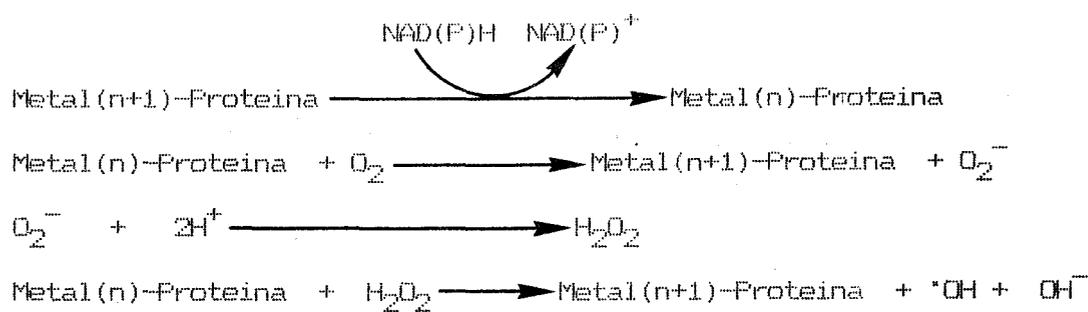
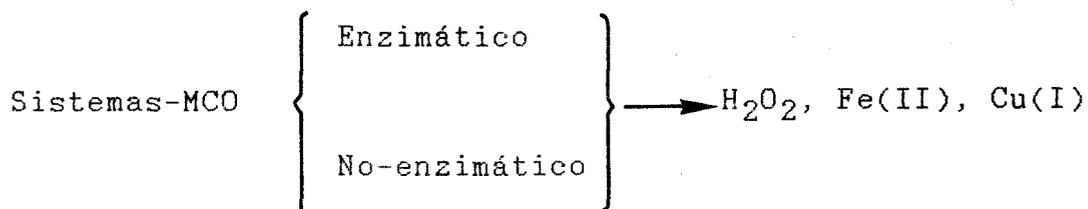
conducido y centrado la investigación de diversos grupos en el estudio de los cambios sufridos por algunas proteínas durante el proceso de envejecimiento y su relación con las modificaciones oxidativas de las proteínas.

A partir de los estudios realizados con estos sistemas, se estableció que el  $H_2O_2$  y el  $Fe(II)$  o el  $Cu(I)$  generados por los sistemas-MCO interactúan con las moléculas proteicas en sus sitios de unión a metales dando lugar a la formación de **radicales libres oxigenados** como el radical superóxido y el radical hidroxilo (Fig. 4) de los que se piensa que son los principales responsables de la oxidación de las cadenas laterales de los restos aminoacídicos de las proteínas, dichas cadenas laterales han de estar cercanas al lugar donde se han originado estos radicales y a esta oxidación es la que se le denomina "oxidación sitio específica".

Entre las distintas cadenas aminoacídicas, las de los restos de histidina, prolina, arginina, lisina, metionina y cisteina son las más sensibles a la "oxidación sitio-específica" catalizada por iones metálicos (Oliver y col., 1985; Amici y col., 1989).

La investigación de este proceso, se ha visto en cierto grado favorecida por la observación de que la oxidación de las proteínas por los sistemas-MCO conduce, entre otros

**FIGURA 4. FORMACION DE RADICALES OXIGENADOS.**




---

siendo:

Metal(n+1) = Fe(III) ó Cu(II)

Metal(n) = Fe(II) ó Cu(I)

---

cambios, a la conversión de determinados restos aminoacídicos en sus correspondientes derivados carbonílicos (Levine, 1983; Oliver y col., 1985; Amici y col., 1989) como se ha comprobado en estudios realizados con homopolímeros aminoacídicos de prolina, arginina, lisina e histidina, que tras su oxidación por sistemas-MCO dan lugar a la formación de determinados derivados carbonílicos, cuya determinación y cuantificación, puede considerarse como una medida o índice del estado de oxidación/modificación de las proteínas (Levine, 1983). Así, se han identificado el semialdehído glutámico como principal producto de oxidación de la prolina y la arginina (Fig. 5) (Amici y col., 1989; Climent y col., 1989), el derivado  $-\beta$ -(2-oxo-imidazoloni)alanina como producto de oxidación de la histidina (Uchida y Kawakishi, 1986, 1989) (Fig. 6), y el semialdehído adípico como producto de oxidación de la lisina (Miller y col., citado por Stadman, 1990). Existen evidencias de que los restos de treonina puedan oxidarse a ácido 2-amino-3-cetobutírico (Taborsky, 1973).

Además de los derivados carbonílicos, los restos de prolina, al oxidarse, dan también lugar a restos de ácido glutámico y/o piroglutámico, y la histidina se convierte también en asparragina y/o ácido aspártico (Creeth y col., 1983; Cooper y col., 1985; Farber y Levine, 1986).

FIGURA 5. OXIDACION DE LA PROLINA Y DE LA ARGININA DANDO EL SEMIALDEHIDO GLUTAMICO COMO PRODUCTO PRINCIPAL.

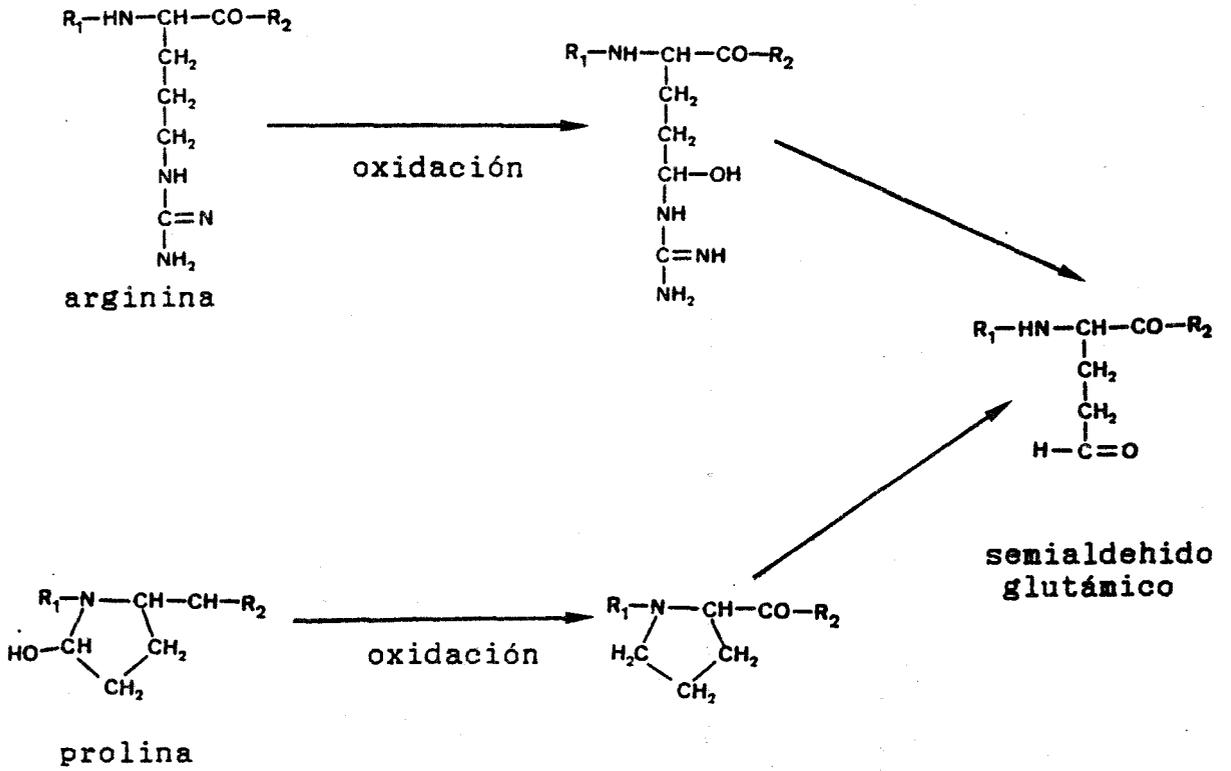
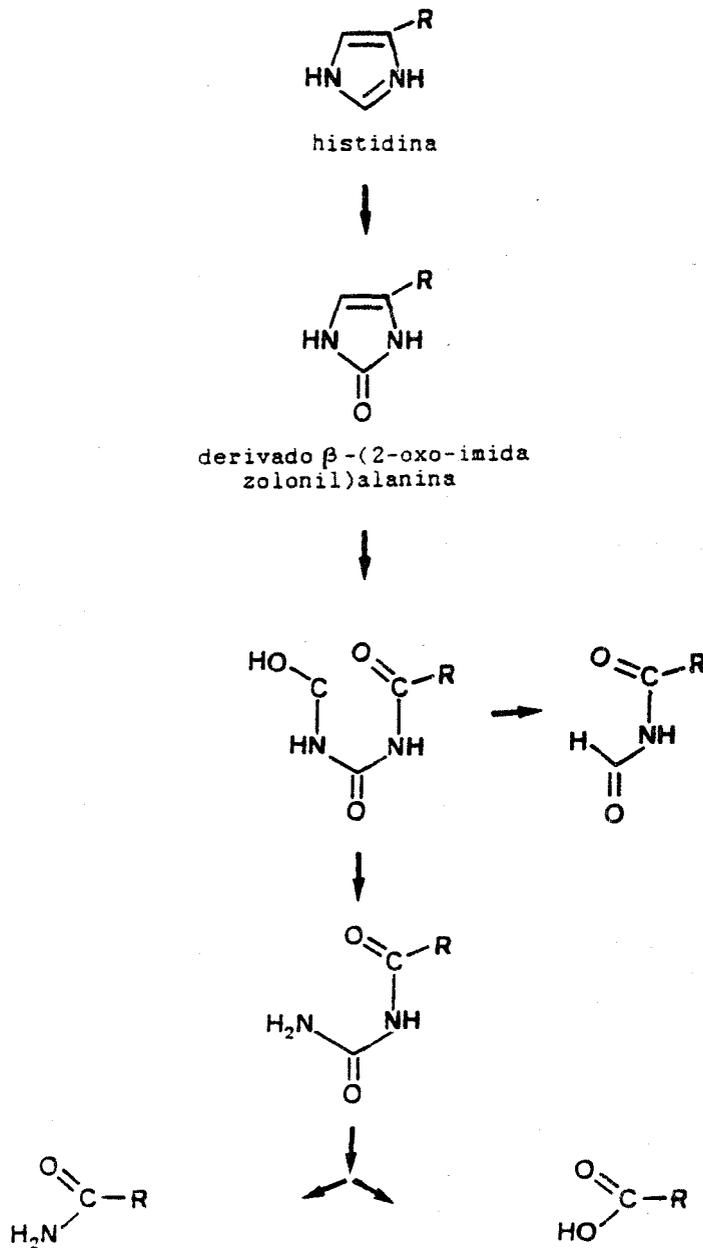


FIGURA 6. OXIDACION DE LA HISTIDINA DANDO COMO PRODUCTO PRINCIPAL EL DERIVADO  $\beta$ -(2-OXO-IMIDAZOLONIL)ALANINA.



Los restos de metionina son oxidados a metionina sulfóxido y sus derivados (Auroma y Halliwell, 1989; Maier y col., 1989) y los restos de cisteina se convierten en disulfuros mixtos y/o dan lugar a la formación de enlaces cruzados tipo puentes disulfuro intra- o intercatenarios (Ballad y Hopgood, 1976; Francis y Ballard, 1980; Bond y Offermann, 1981; Offermann y col., 1984).

De los datos disponibles, parece no existir duda sobre la **no implicación** de los restos de triptófano, fenilalanina y tirosina como centros de oxidación en los procesos de oxidación por sistemas-MCO.

En contraste con la oxidación por sistemas-MCO, en la oxidación por radiación gamma, todos los restos aminoacídicos son oxidados siendo, en este caso, los restos aminoacídicos aromáticos los centros de oxidación preferentes (Swallow, 1960). Esta diferencia, entre la oxidación por sistemas-MCO y la oxidación por radiación, en los centros de oxidación preferente, se puede atribuir fundamentalmente a la naturaleza sitio-específica de la oxidación por sistemas-MCO, como ya hemos indicado anteriormente.

En ausencia de oxígeno, los radicales superóxido producidos por radiolisis conducen a un extenso

entrecruzamiento proteína-proteína vía formación enlaces tirosina-tirosina principalmente, si bien también puede tener lugar la formación de enlaces cruzados entre otros restos, como, por ejemplo, la formación de enlaces disulfuros (-S-S-) entre restos de cisteína. En presencia de oxígeno, no se produce la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de proteínas, y en su lugar lo que ocurre preferentemente es la ruptura de enlaces peptídicos con la formación simultánea, de **grupos carbonilos** en las cadenas proteicas (Garrison y col., 1962; Schuessler y Schilling, 1984; Wolff y col., 1986; Davies y Delsignore, 1987; Davies y Goldberg, 1987).

Así pues, podemos concluir que, independientemente de la fuente de los agentes oxidantes, la formación de grupos carbonilos destaca como señal de oxidación de las proteínas en medios oxigenados.

### **I.3. MECANISMOS DE OXIDACION DE PROTEINAS MEDIADOS POR SUSTANCIAS OXIGENADAS ACTIVAS.**

El estudio de diferentes enzimas inactivadas por sistemas-MFO y/o sistemas-MCO, ha puesto claramente de manifiesto que la inactivación de las proteínas por estos sistemas va paralela a una serie de hechos, tales como:

a) **modificación por oxidación de determinados restos aminoacídicos**, (fundamentalmente restos de histidina, prolina y lisina) (Levine, 1983; Oliver y col., 1985; Rivett y col., 1985; Gordillo y col., 1988, 1989),

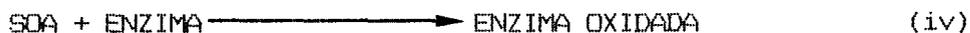
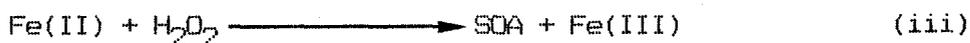
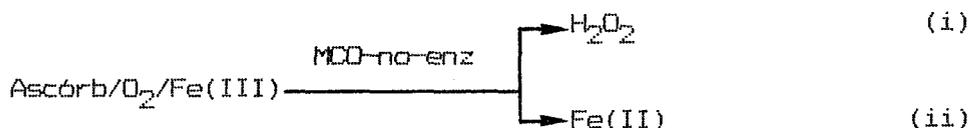
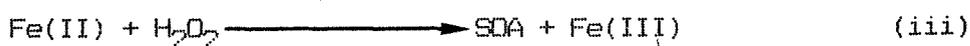
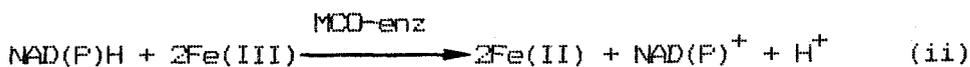
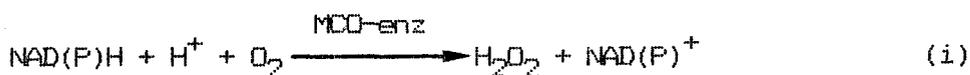
b) **ruptura de enlaces peptídicos** (Wolff y col., 1986; Davies y Delsignore, 1987).

Como consecuencia de ambos procesos se observa un **incremento del contenido en grupos carbonilos** (Levine, 1983; Oliver y col., 1985; Rivett y col., 1985; Gordillo y col., 1988, 1989).

A partir de estudios realizados con la glutamina-sintetasa de *E. coli* se ha postulado que el papel de los sistemas-MCO está principalmente implicado en la producción de  $H_2O_2$  y de Fe(II), los cuales, posteriormente interactúan en los sitios de unión a metales de la enzima para generar *in situ* sustancias oxigenadas activas (radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, etc), siendo estas sustancias oxigenadas activas las responsables de la oxidación de los restos aminoacídicos situados en el entorno del sitio de unión a metales.

Este mecanismo viene soportado por los siguientes datos:

1. Todos los sistemas-MCO ensayados tienen la capacidad de catalizar las reacciones i) y ii):



2. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{Fe(II)}$  formados causan la inactivación de las enzimas en ausencia de sistemas-MCO.

3. La catalasa inhibe la inactivación de las enzimas por los sistemas-MCO.

4. Agentes quelantes fuertes (o-fenantrolina, ácido edético, etc.) generalmente inhiben la inactivación (Fucci y col., 1983; Levine, 1983; Nakamura y col., 1985; Stadtman y Wittemberger, 1985).

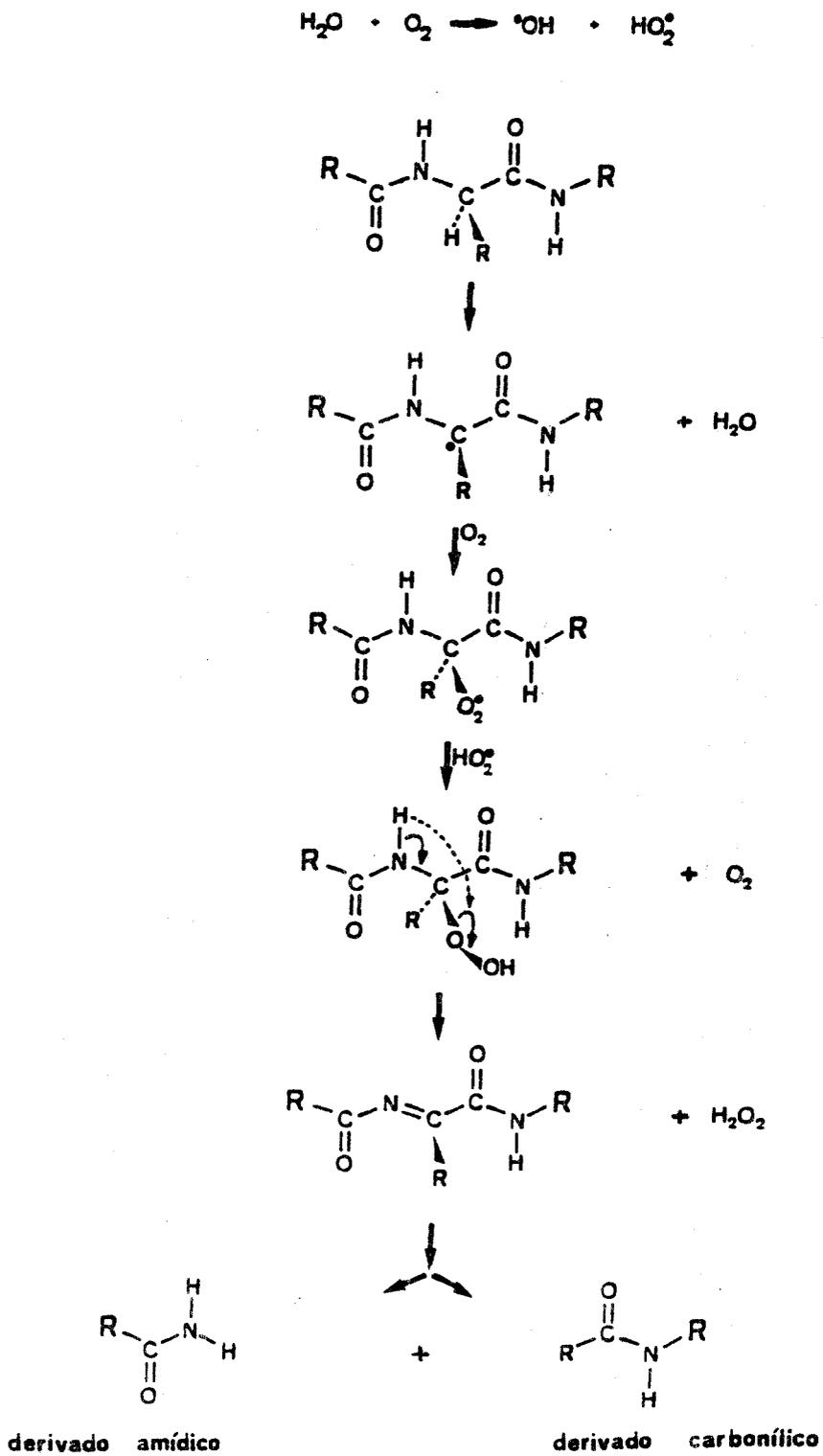
En cuanto a la ruptura de enlaces peptídicos que se ha descrito en algunos procesos de oxidación, generalmente se acepta que en esta ruptura está implicada la eliminación del hidrógeno situado sobre el C , y en la que interviene de manera directa el radical hidroxilo, OH·, para formar un radical carbonado. Estos radicales carbonados en presencia de oxígeno darían lugar a la formación de radicales peróxido como productos intermedios, y que al reorganizarse podrían dar lugar a la ruptura del enlace peptídico, con la consiguiente formación de los correspondientes derivados amidados y carbonílicos (Stadtman, 1990). De acuerdo con Garrison y cols (1962) este proceso podría tener lugar a través del mecanismo indicado en la Fig. 7.

La reacción global es formalmente análoga a la reacción sitio-específica catalizada por iones metálicos dependientes de oxígeno, descrita por Bateman y cols (1985) y a la ruptura oxidativa del enlace peptídico mediada por iones cobre, descrita por Levitzki y cols (1967).

#### **I.4. SIGNIFICACION DE LAS MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE LAS PROTEINAS.**

Cada vez parece estar más claro que las proteínas cuyos restos aminoácidos han sido oxidados, presentan una mayor

FIGURA 7. RUPTURA DE ENLACES PEPTIDICOS DESCRITO EN ALGUNOS PROCESOS DE OXIDACION.



predisposición a la degradación proteolítica por los diversos sistemas proteolíticos celulares, sirviendo pues esta oxidación como señal marcadora de dicha predisposición (Stadtman, 1985, 1986, 1990) (Fig. 8), y evidenciando esto la muy posible implicación de la oxidación proteica en el recambio de las proteínas (*turnover*).

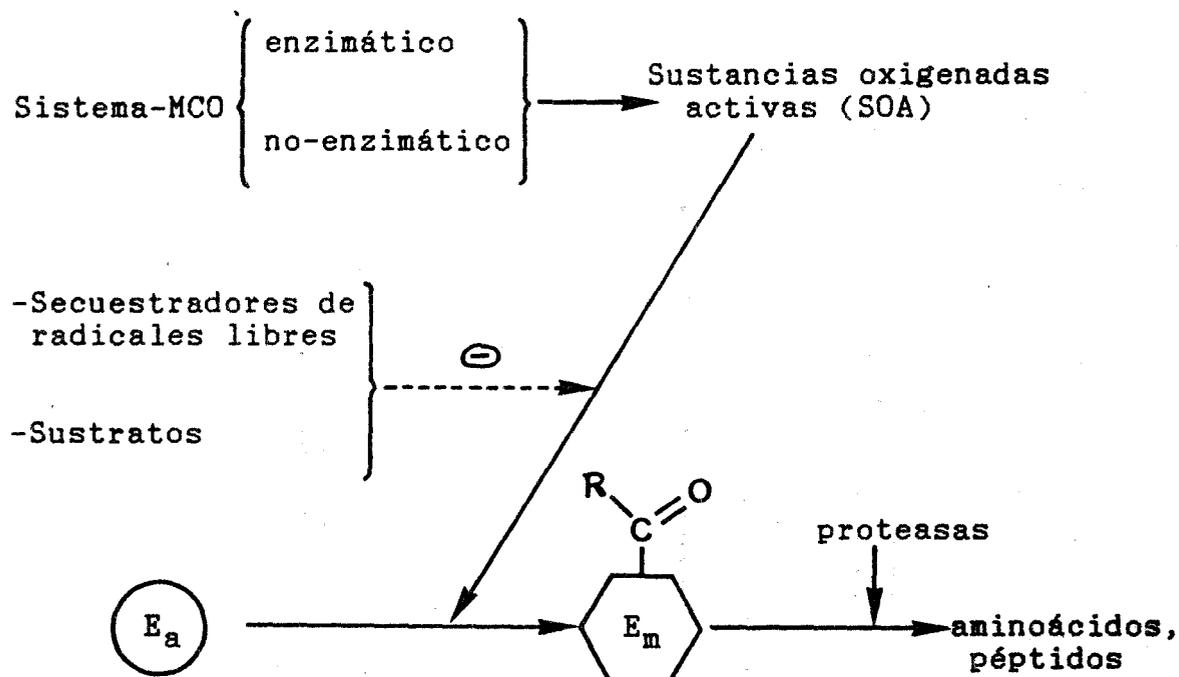
Sin embargo, no está claro el por qué durante el envejecimiento se acumulan las proteínas marcadas o alteradas, si este fenómeno tiene lugar para favorecer su degradación o eliminación.

El acúmulo de proteínas alteradas por oxidación durante el envejecimiento podría explicarse, entre otras razones, por la disminución del *turnover* de proteínas, que puede tener lugar:

#### **A. Por disminución de la actividad proteolítica.**

Debido a que la oxidación de una proteína se considera como una etapa de marcaje previa a la degradación de la misma (Levine y col., 1981; Dice, 1982; Stadtman, 1986; Davies, 1987; Davies y Goldberg, 1987; Davies y Lin, 1988; Stadtman, 1988, 1990) y que esta oxidación conlleva un aumento de su sensibilidad frente a las proteasas (Levine y col., 1981; Rivett, 1985a,b; Stadtman, 1986; Roseman y Levine, 1987), un acúmulo de este tipo de proteínas oxidadas

**FIGURA 8. ETAPAS IMPLICADAS EN LA OXIDACION DE PROTEINAS *in vivo* POR SISTEMAS-MCO.**



$E_a$  = Enzima activa

$E_m$  = Enzima modificada

podría ser debida a una disminución de la actividad proteolítica de las proteasas encargadas de la degradación de las moléculas "alteradas", bien porque las proteasas fueran menos activas o bien porque se sintetizara menor cantidad de las mismas.

#### **B. Aumento del daño causado por las sustancias oxigenadas activas.**

El aumento de los daños causados por las sustancias oxigenadas activas -fundamentalmente por radicales oxigenados- durante el proceso de envejecimiento podría deberse a un incremento de su producción o bien a una disminución de los sistemas de defensa y protección contra este tipo de sustancias, según postulan Harman, (1981); Sohal (1988); y Miquel (1986).

#### **I.5. METODOS MAS USUALES UTILIZADOS EN LA CUANTIFICACION DE GRUPOS CARBONILOS EN LAS PROTEINAS.**

Como ya hemos dicho anteriormente, el incremento en el contenido de grupos carbonilos de las proteínas, se puede considerar como índice del estado de oxidación de las proteínas. Por eso su cuantificación es necesaria para comparar el estado de oxidación de las proteínas a lo largo del desarrollo, y más concretamente durante el

envejecimiento.

De una manera general y atendiendo al tipo de reacción, los métodos utilizados para cuantificar los grupos carbonilos en las proteínas se pueden agrupar en los siguientes apartados:

1.-Reducción del grupo carbonilo a alcohol con borohidruro tritiado.

2.-Reacción del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) para formar la correspondiente 2,4-dinitrofenil hidrazona.

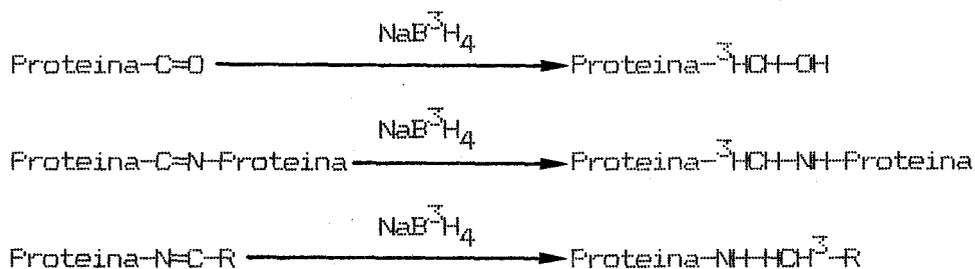
3.-Reacción del grupo carbonilo con fluoresceína tiosemicarbazida para formar la correspondiente tiosemicarbazona.

4.-Reacción del grupo carbonilo con fluoresceinamina para formar una base de Schiff la cual se reduce con cianoborohidruro a la correspondiente amina secundaria.

**1.-Reducción con borohidruro tritiado. (Lenz y col., 1989).**

Es el método más sensible de los que se utilizan normalmente. El borohidruro reduce todos los grupos

carbonilos (esto es, aldehidos, cetonas y cetoácidos) a alcoholes; y además reduce también las bases de Schiff a aminas; con lo que mediante este método se detectan también los grupos carbonilos que han formado bases de Schiff con los grupos -amino de la lisina y los -amino de los aminoácidos N-terminales. En cada caso, si se utiliza borohidruro tritiado se introduce un marcaje radiactivo estable:



## 2.-Reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Levine, 1983; 1984)

El 2,4-DNPH es el reactivo clásico de los grupos carbonilos, siendo su uso con las proteínas satisfactorio.

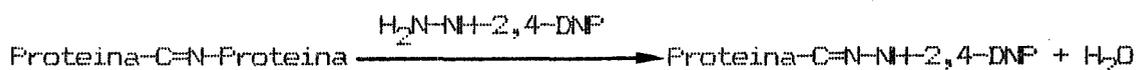
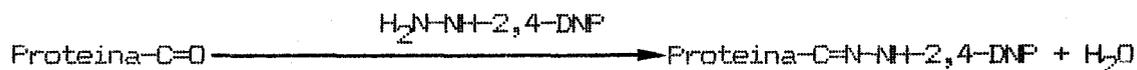
En este método se necesita mayor cantidad de proteína, que en el caso anterior, ya que la hidrazona se determina espectroforéticamente<sup>(\*)</sup>.

Cuando se dispone de suficiente muestra (alrededor de

<sup>(\*)</sup> Nota: ambos métodos dan resultados iguales (lenz y col., 1989).

0,5mg proteína) este método es preferible al radiactivo para la determinación de grupos carbonilos en las proteínas.

Asumiendo que las bases de Schiff reaccionan en las condiciones empleadas, las reacciones son:



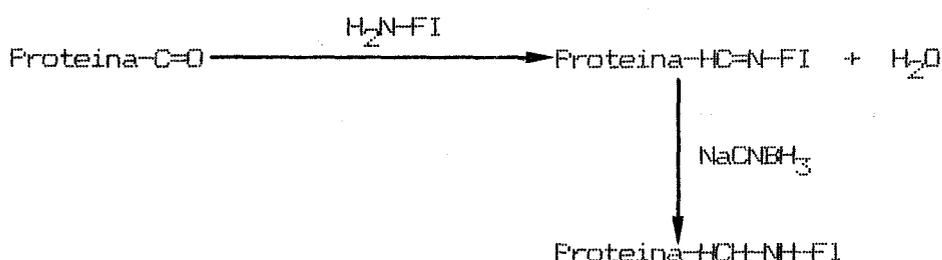
### 3.-Reacción con Fluoresceína-tiosemicarbazida. (Ahn y col., 1987).

La fluoresceína-tiosemicarbazida y la fluoresceína-adipico-hidrácida reaccionan con los grupos carbonilos dando lugar a la formación de tiosemicarbazonas o hidrazonas fluorescentes análogos a los cromóforos 2,4-DNP-hidrazonas.

Las proteínas marcadas con fluoresceína-tiosemicarbazida pueden separarse por PAGE-LDS (lithium dodecyl sulphate-PAGE) proporcionando un método muy sensible para visualizar proteínas oxidadas, aunque si bien potencialmente es muy útil como método de *screening*, esta técnica no parece ser aplicable para determinaciones cuantitativas en los geles, debido a diferencias en la estabilidad de los derivados y a la variabilidad en rendimientos cuánticos (Ahn y col., 1987).

#### 4.-Reacción con fluoresceinamina y ciano-borohidruro (Climent y col., 1989).

Es un método relativamente nuevo (Climent y col., 1989) y sólo se ha aplicado a proteínas purificadas. Se basa en la capacidad de las aminas primarias aromáticas para formar bases de Schiff con los grupos carbonilos a pH neutro. A éste pH, el ciano-borohidruro reduce las bases de Schiff a aminas secundarias pero no reduce a los grupos carbonilos (Climent y col., 1989), por lo que ambos reactivos pueden utilizarse simultáneamente, las reacciones son:



El derivado obtenido es fluorescente, sin embargo, el rendimiento cuantitativo es bajo y varía con el solvente utilizado. No obstante, su absorbancia molar es alta (86.000 a 490nm) de manera que el marcaje proporciona un cromóforo muy útil para cuantificar grupos carbonilos.

La fluoresceinamina no reacciona con todos los grupos carbonilos presentes en las proteínas, así en el caso de la glutamina sintetasa sólo reacciona con el 65% , principalmente con el -glutamil-semialdehído (Climent y col., 1989). La principal ventaja de éste método es que proporciona un "derivado-marcado" muy estable.

## I.6. COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.

### I.6.1. RECUERDO ANATOMO-FISIOLOGICO.

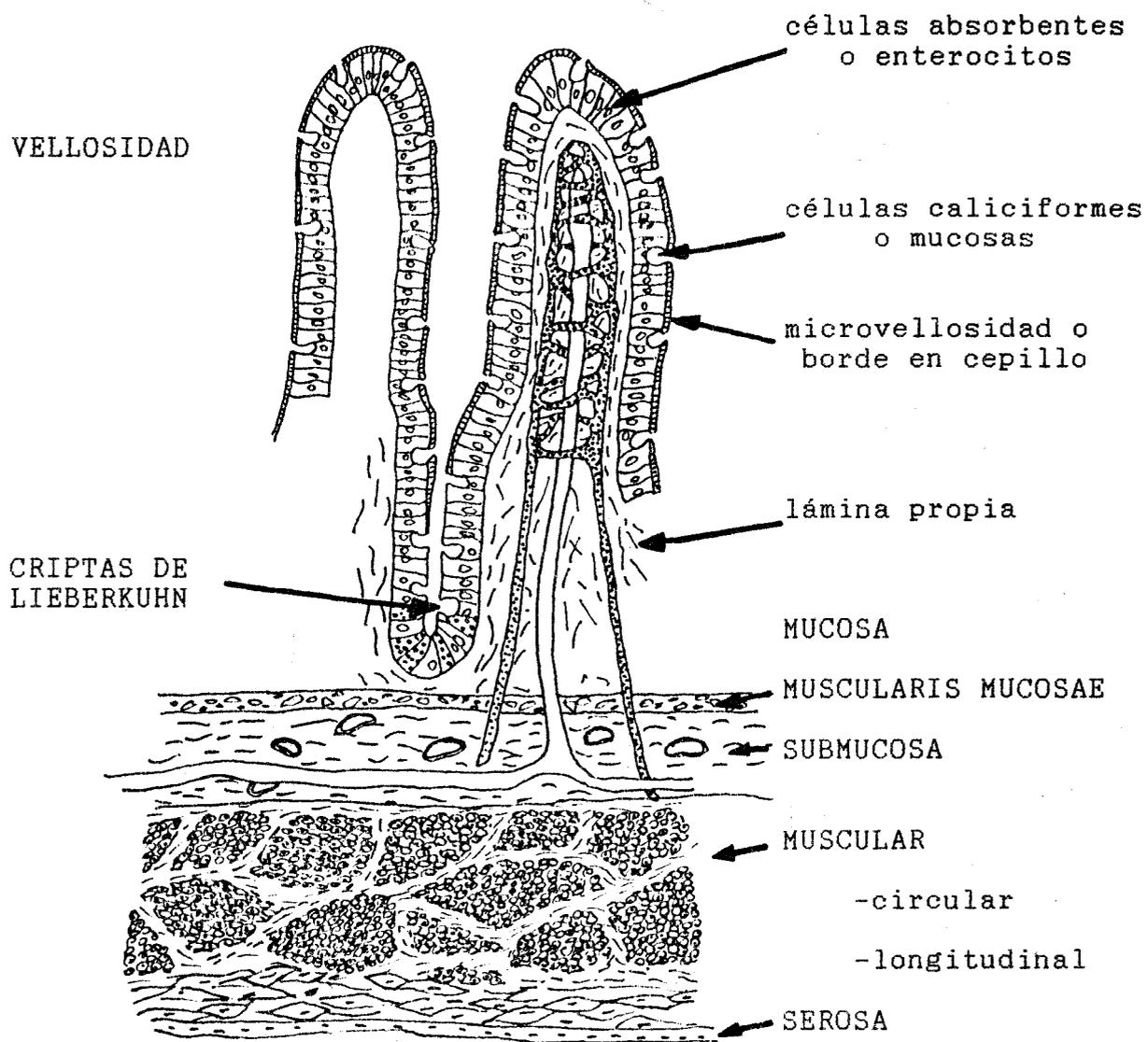
Como es bien conocido, en la mayoría de los mamíferos, la estructura del intestino delgado responde a un patrón común, en respuesta a dos necesidades: la de presentar una superficie muy extensa para la absorción y la de caber en el espacio limitado de la cavidad abdominal.

Para cumplir tales exigencias, forma asas y presenta varios tipos de proyecciones dirigidas hacia la luz intestinal que incrementan notablemente su superficie.

El intestino delgado se extiende desde la válvula pilórica hasta el intestino grueso, distinguiéndose en él tres secciones: duodeno, yeyuno e ileon, cuya relación, arbitrariamente fijada, es 1:4:7 (D:Y:I). A partir del ligamento de Treitz, el duodeno se transforma en yeyuno, no existiendo frontera anatómica entre el yeyuno y el ileon. La pared del intestino delgado presenta en los tres segmentos la misma organización anatómica (Fig. 9) (Hollander y Weinstein, 1882):

1.-Las válvulas conniventes o pliegues de Kerkring:  
formadas por repliegues de la pared que incluyen mucosa,

FIGURA 9. ORGANIZACION ESTRATIFICADA DE LAS CAPAS TISULARES DE LA PARED INTESTINAL.



muscularis mucosae y submucosa.

2.-Las **vellosidades intestinales**: son proyecciones de la mucosa en forma de dedo, de 0,5-1 mm de altura, cubierta por una sola capa de epitelio columnar, conteniendo una red de capilares y vasos linfáticos (quilíferos), existiendo aproximadamente entre 20-40 vellosidades por  $\text{mm}^2$ . Este epitelio columnar está formado a su vez por dos tipos principales de células: **caliciformes o mucosas**, que segregan el mucus que recubre y protege la pared intestinal y las células que realizan la absorción, denominadas **enterocitos**, implicadas en funciones de digestión y transporte, constituyendo estas últimas aproximadamente el 90% de las células de las vellosidades, caracterizadas sobre todo por poseer un borde estriado en la superficie luminal de la célula. El epitelio intestinal tiene un *turnover* de 2-3 días en el ratón y en la rata y de 3-6 días en el hombre.

Entre las vellosidades, están situadas las **criptas de Lieberkühn**. La división del epitelio intestinal, está restringida a la base de las criptas de Lieberkühn.

El ciclo celular completo, transcurre en 10-17 horas en roedores, necesitando al menos 24 horas en el hombre. Después de al menos dos divisiones dentro de la cripta, las células migran a la vellosidad. El paso del comportamiento

formador al funcional, se acompaña de una diferenciación y maduración celular, estando presente entonces las enzimas relacionadas con la función de absorción de nutrientes. La migración celular se completa muy rápidamente en el íleon y yeyuno, como resultado del descenso de la altura de la vellosidad a lo largo del intestino delgado.

La migración termina con la expulsión de las células inservibles por la parte superior de la vellosidad, siendo la pérdida celular por el ápex de la vellosidad equivalente al nacimiento celular en la base de la cripta.

Tanto los enterocitos o células absorptivas como las células mucosas, migran a través de la vellosidad. Una vez maduras, no sufren mitosis y las endocrinas migran a más velocidad que las mucosas.

**3.-Microvellosidades:** dijimos anteriormente que las células absorbentes de las vellosidades se caracterizaban por poseer, en su superficie luminal, un borde estriado, que con una altura media de 0,75 a 1,5 nm, que constituye las microvellosidades o borde en cepillo del intestino delgado, aumentando con esta disposición especial la superficie absorbente de la célula entre 14 y 30 veces (Fig. 10). En su interior, las microvellosidades contienen microfilamentos, cuya función es ayudar a su movimiento y contracciones.

En este borde en cepillo es donde se encuentran las disacaridasas, como veremos más adelante.

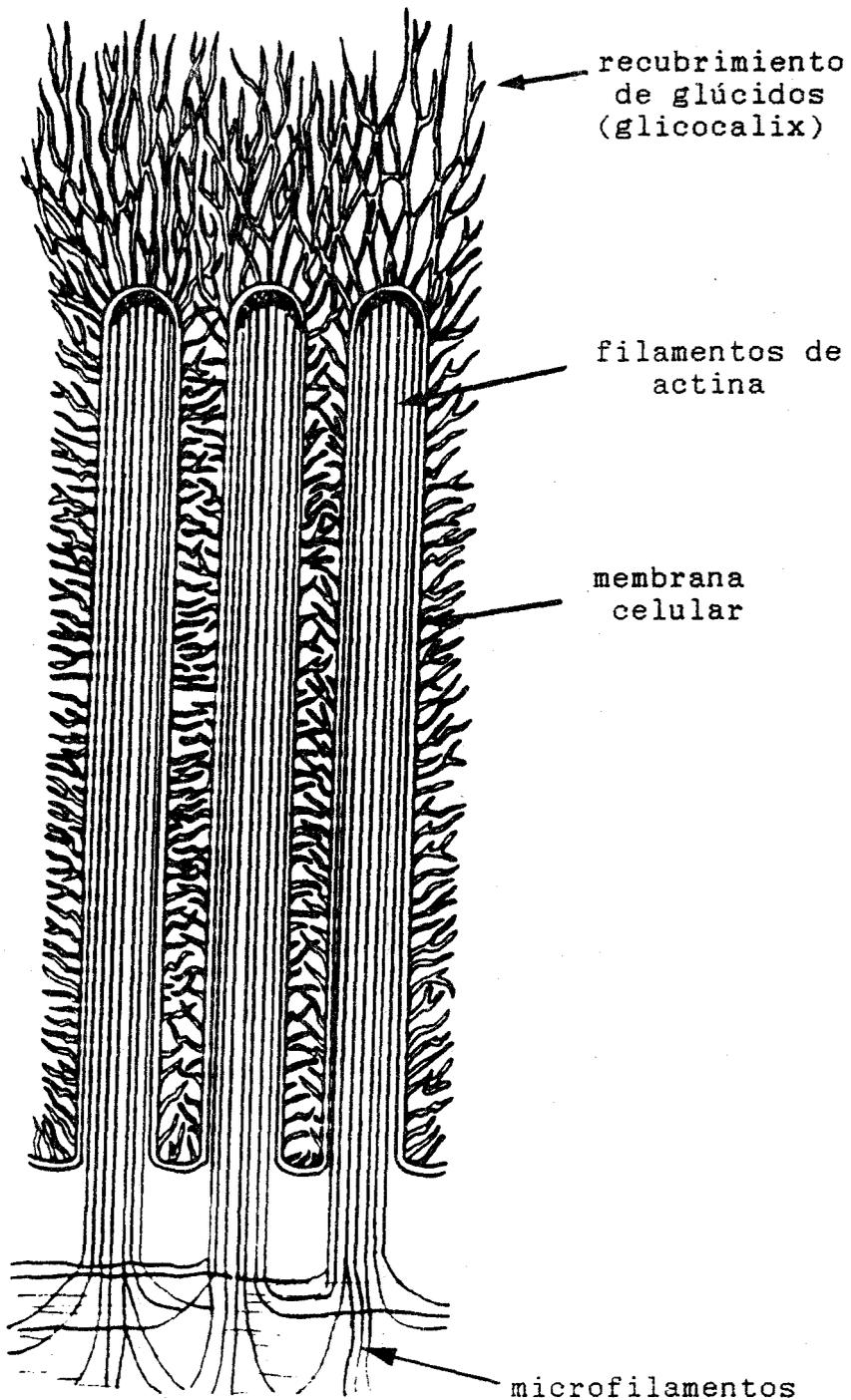
Para hacer efectivo el proceso de absorción e impedir que los nutrientes, una vez absorbidos, sean de nuevo filtrados hacia el lumen por los espacios intercelulares, existe un cinturón que rodea las uniones entre las células epiteliales, descrito por primera vez por Farquhar en 1966 al que denominó "zónulas occludens" o uniones estrechas.

En la región correspondiente a una unión estrecha, las membranas plasmáticas de dos células epiteliales adyacentes, parecen fusionarse formando una región de intenso contacto, que constituye un "aro" que ciñe cada célula.

Cubriendo las microvellosidades se encuentra la membrana celular, formada por dos capas de moléculas lipídicas, recubiertas a su vez por una capa glucídica que es más gruesa que la que corresponde a la mayoría de las membranas celulares. Este recubrimiento de glúcidos de la membrana celular, conocido como **glicocáliz** está compuesto por fibras muy finas que se prolongan sin solución de continuidad a partir de la membrana celular (Fig. 11).

En 1961, se aísla por centrifugación diferencial el borde en cepillo, en la Universidad de Washington (San Luis)

FIGURA 11. GLICOCALIX.



por David Miller y Robert K. Crane, descubriéndose entre sus componentes sacarasa y maltasa. En la década de los 70 se demostró que las citadas enzimas formaban parte integrante de la membrana de la microvellosidad y no estaban simplemente asociadas por algún tipo de interacción débil. Las enzimas digestivos glicoproteicos, alcanzan diferentes profundidades en la membrana de la microvellosidad, insertándose el componente proteico de la enzima en la matriz lipídica que constituye la membrana, mientras que las cadenas de carbohidratos se proyectan hacia la luz intestinal.

Las enzimas ancladas en la membrana son de varios tipos (Fig. 12): las distintas **disacaridasas (a,b,c)** se proyectan desde la membrana, donde sólo penetran hasta cierta profundidad. La **fosfatasa alcalina (d)** que hidroliza muchos de los compuestos fosfatados de la ingesta se adentra profundamente en la membrana por su parte proteica. Las **aminopeptidasas (e)** que liberan un aminoácido terminal de un péptido de cadena corta, atraviesan la membrana y alcanzan el interior de la microvellosidad.

### I.6.2. DESCRIPCION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.

Las disacaridasas del borde en cepillo del intestino delgado de mamíferos (sacarasa-isomaltasa, maltasa-glucoamilasa y lactasa-glicosilceramidasa) forman un grupo homogéneo de enzimas en cuanto a sus propiedades catalíticas, su modo de inserción en la membrana, y su biosíntesis.

Estas disacaridasas están insertas en la membrana del borde en cepillo del intestino delgado y juegan un papel importante en los últimos pasos de la digestión del glucógeno y del almidón (Semenza 1981a, 1981b).

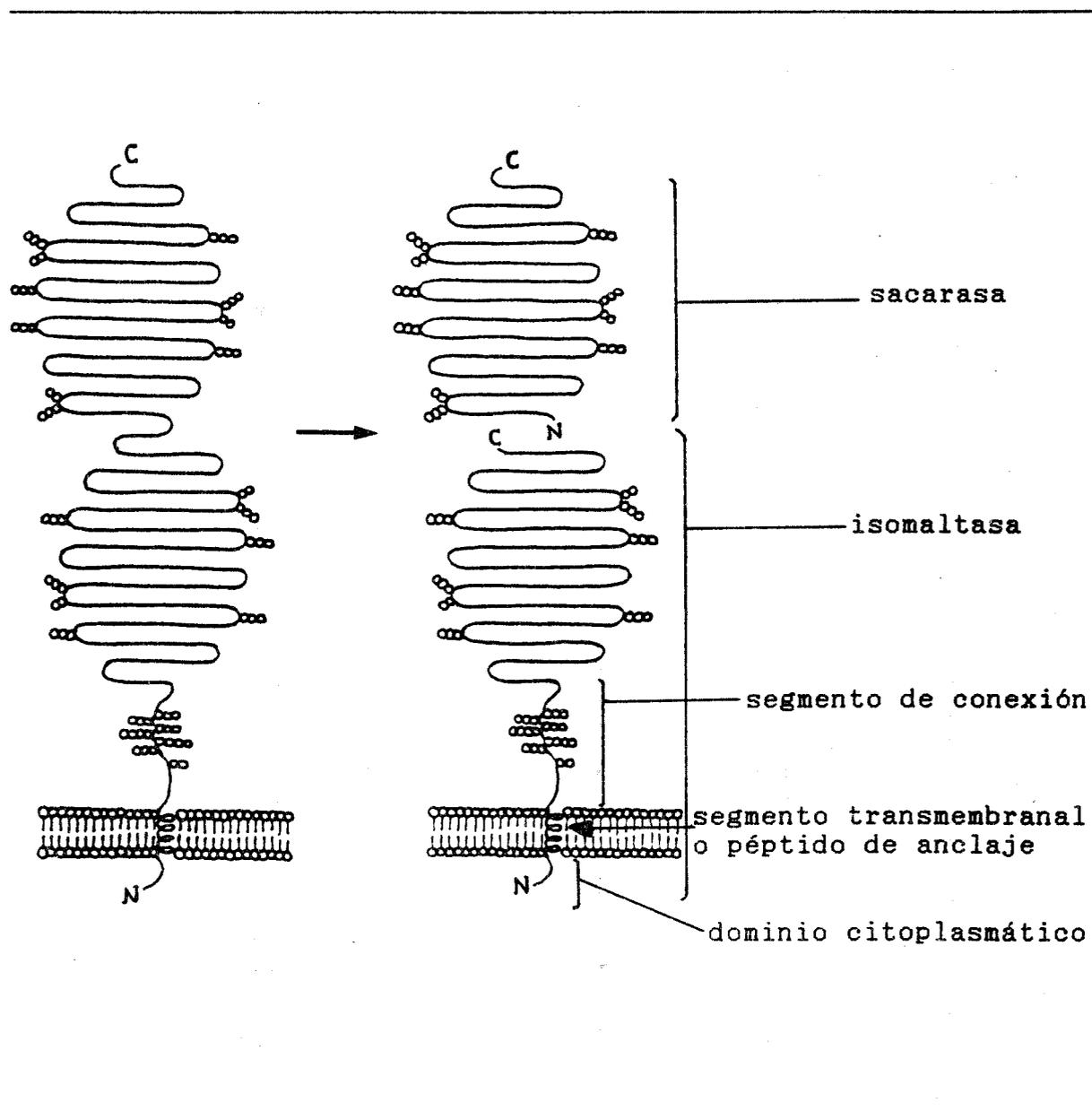
Uno de los complejos más estudiados es el de la sacarasa-isomaltasa (SI), proteína intrínseca de membrana que constituye alrededor de un 10% de la proteína total de la membrana del borde en cepillo del intestino delgado (Kessler y col., 1978). Dicho complejo, con un peso molecular aproximado de 260 Kilodaltons (KDa) (Sjöström y col., 1980), se sintetiza como una cadena polipeptídica simple (Hauri y col., 1979; Sjöström y col., 1980; Montgomery y col., 1981; Wacker y col., 1981; Hauri y col., 1982), denominada pro-sacarasa-isomaltasa (pro-SI) con dos sitios enzimáticamente activos. Trás la inserción en la membrana de las microvellosidades, éste precursor es

hidrolizado por acción de proteasas pancreáticas en dos subunidades, similares pero no idénticas (Hauri y col., 1979; Hauri y col., 1980; Semenza, 1981a; Sjöström y col., 1980; Riby y Kretchmer, 1985) (Fig. 13). El complejo sacarasa-isomaltasa cuenta con aproximadamente un 80% de la actividad maltasa, la mayoría de la actividad isomaltasa y toda la actividad sacarasa del intestino delgado. Se trata de una enzima que se encuentra compuesta por dos subunidades, sacarasa e isomaltasa, cada una de las cuales es una cadena polipeptídica simple y glucosilada. Este complejo se ha estudiado en conejo (Kolinska y Semenza, 1967), en el hombre (Conklin y col., 1975), en cerdo (Sjöström y col., 1980), en rata (Sasaki y col., 1979) y en gallina (Mizumo y col., 1982).

Una de las subunidades, la sacarasa (E.C.3.2.1.48), de aproximadamente 120 KDa, hidroliza principalmente maltosa y sacarosa, y la otra subunidad, la isomaltasa (E.C.3.2.1.10), de aproximadamente 140 KDa, hidroliza principalmente maltosa y uniones 1,6  $\alpha$ -glucopiranosídicas de los oligosacáridos (Hauri y col., 1980).

El complejo sacarasa-isomaltasa está unido a la membrana mediante un segmento polipeptídico hidrofóbico, denominado péptido de anclaje, localizado cerca de la región N amino terminal de la subunidad isomaltasa (Frank y

**FIGURA 13. HIDROLISIS DEL PRECURSOR PRO-SACARASA-ISOMALTASA POR ACCION DE PROTEASAS PANCREATICAS PARA DAR LUGAR AL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.**



col., 1978; Brunner y col., 1979; Hauri y col., 1982; Spiess y col., 1982), y atraviesa la bicapa lipídica (Kenny y Maroux, 1982). Este péptido de anclaje, supone el 3% o menos de la masa proteica del complejo y es de naturaleza muy hidrofóbica. La subunidad sacarasa no interacciona directamente con la membrana y tiene tanto el C- como el N-terminal en el lumen del intestino delgado (Hunziker y col., 1986). Se pueden considerar por tanto cinco dominios en el complejo sacarasa-isomaltasa: dominio citoplasmático, que es la parte amino terminal de la isomaltasa que está dentro de la membrana; segmento transmembranal o péptido de anclaje, que es la parte inmersa en la bicapa lipídica; segmento de conexión, que es el segmento que conecta el péptido de anclaje y el resto del cuerpo globular de la proteína, que está muy glucosilado mediante uniones O-glucosídicas; el cuerpo globular de la isomaltasa y por último el cuerpo globular de la sacarasa (Fig. 13).

El complejo no se puede extraer de la membrana del borde en cepillo con soluciones acuosas, siendo necesario para realizar esta extracción el empleo de detergentes o bien la utilización de técnicas de digestión proteolítica controlada (Auricchio y col., 1963; Sigrist y col., 1975; James y col., 1971).

La diferencia principal entre las formas extraídas por

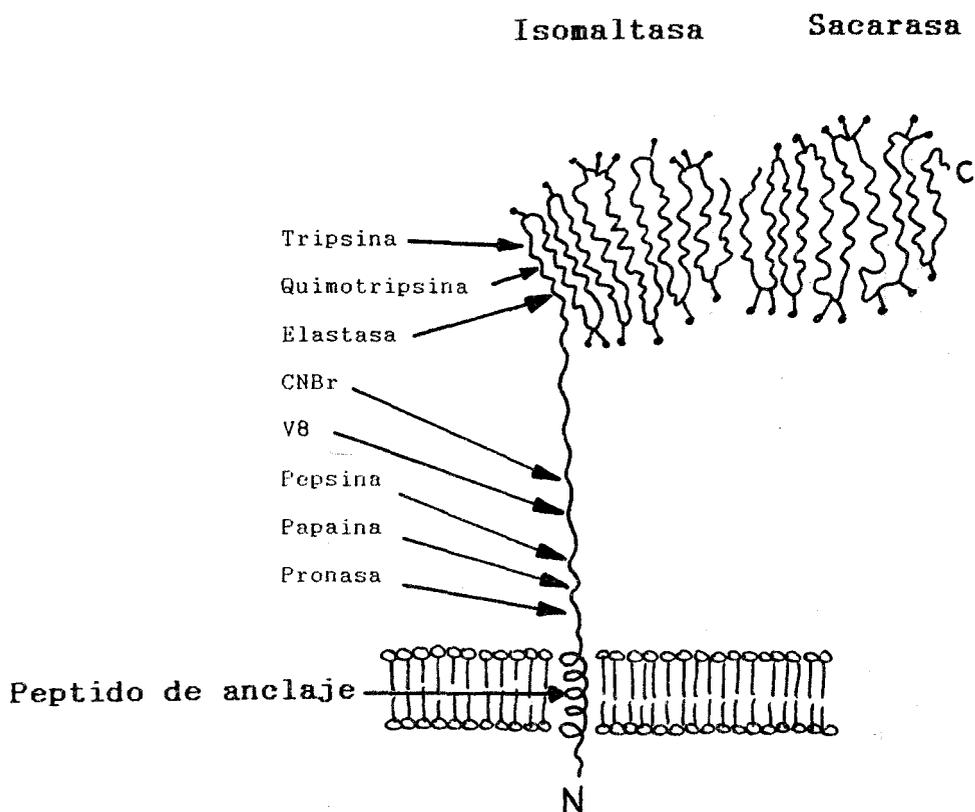
los dos métodos es su solubilización en solventes acuosos: mientras que las formas solubilizadas con detergentes, normalmente, y debido al péptido de anclaje son de naturaleza hidrofóbicas (Bordier, 1981), teniendo tendencia a formar agregados en ausencia de detergentes, las formas solubilizadas mediante proteólisis limitada, son normalmente proteínas de naturaleza hidrofílicas, ya que en la solubilización proteolítica se produce la ruptura del segmento de conexión a diferente nivel según sea el agente utilizado en la proteólisis (Fig. 14) (Spiess y col., 1981). Como hemos dicho, las formas solubilizadas mediante el uso de detergentes, en ausencia de los mismos forman micelas de peso molecular aparente superior a un millón (Hussain, 1985). La diferencia en el peso molecular aparente entre la forma solubilizada con detergentes y la solubilizada por proteasas es debido al segmento que queda inserto en la membrana y a los detergentes unidos al complejo.

Ambas subunidades son glucoproteínas, con un contenido total de azúcares comprendido entre un 10 a un 15% (Cogoli y col., 1972, 1973).

Al estar formado el complejo por dos subunidades muy similares (Cogoli y col., 1973), existe un considerable solapamiento en la especificidad del sustrato y en la química de los inhibidores competitivos. Ambas enzimas se

FIGURA 14. POSICIONES RELATIVAS A LAS QUE SE ROMPE LA SUBUNIDAD ISOMALTASA BAJO LA ACCION DE DIFERENTES PROTEASAS.

---



activan por iones de sodio y la cinética de las reacciones que catalizan parecen ser muy similares (Semenza, 1974). La información acerca de la naturaleza química de los sitios activos es escasa. De los datos que se tienen, parece ser que existen al menos dos grupos carboxilos en los sitios activos de cada una de las dos subunidades (Braun y col., 1975; Quaroni y Semenza, 1976), encontrándose que la secuencia aminoacídica en estos sitios activos es prácticamente idéntica. Estos sitios catalíticos están localizados en una zona hidrofóbica y no parece tener interacción con la capa hidrofóbica de la membrana (Sjöstrom y col., 1982), de forma que cambios en la fluidez de la membrana o en la solubilización no afectan a las propiedades catalíticas del complejo (Quaroni, 1976). Se han propuesto mecanismos de catálisis similares para las dos enzimas (Cogoli, 1975). Parece ser que las actividades de estas dos subunidades tienen un mecanismo de control biosintético comun o parecido (Semenza, 1986).

### I.6.3. PRO-SACARASA-ISOMALTASA.

La hipótesis de una cadena única pro-sacarasa-isomaltasa como precursor del complejo sacarasa-isomaltasa podría resumirse de la siguiente forma (Semenza, 1978, 1979a, 1979b; Frank y col., 1978; Brunner y col., 1979):

a)Un gen ancestral codifica una cadena polipeptídica, con un sitio activo que hidroliza maltosa e isomaltosa, se trata de una isomaltasa simple.

b)Una duplicación parcial del gen permite codificar una cadena simple polipeptídica que tiene dos sitios activo idénticos, cada uno de los cuales hidroliza maltosa e isomaltosa: se trata de una doble isomaltasa.

c)Por mutaciones puntuales y/o deleciones cambia uno de estos sitios activos desde una isomaltasa-maltasa a la actual sacarasa-isomaltasa. Así se forma una larga cadena polipeptídica, que posee dos sitios activos similares pero no idénticos: se trata del precursor pro-sacarasa-isomaltasa.

d)Esta cadena polipeptídica simple pro-sacarasa-isomaltasa se sintetiza e inserta en la membrana del retículo endoplásmico y finalmente se transfiere a la membrana del borde en cepillo del intestino delgado, siendo durante éste período cuando ocurre la glicosilación.

e)Hay modificaciones post-translacionales de ésta cadena simple polipeptídica (por proteasas intracelulares) que dan lugar a las dos subunidades que forman el complejo sacarasa-isomaltasa final. Las subunidades permanecen

asociadas entre sí a través de interacciones no covalentes formadas durante el plegado de la inicial pro-sacarasa-isomaltasa.

La pro-sacarasa-isomaltasa tiene las mismas propiedades catalíticas e inmunológicas que el complejo sacarasa-isomaltasa final (Sjöström y col., 1980), lo que sugiere que la forma pro y el complejo final tienen estructuras secundaria y terciaria similares si no idénticas (Hauri y col., 1982).

## **OBJETIVOS**

## II. OBJETIVOS.

Hasta la fecha, la mayoría de las manifestaciones que acompañan al proceso de envejecimiento y que implican cambios estructurales y funcionales de las proteínas se han estudiado en proteínas intracelulares. Estos cambios tienen lugar fundamentalmente por modificaciones post-traduccionales no-enzimáticas, entre las que desempeñan un papel muy importante las oxidaciones.

Sin embargo, es de suponer que si este fenómeno es un proceso de validez general en el envejecimiento, se dará también en otro tipo de proteínas, tales como proteínas de membrana, proteínas estructurales, etc.

Por ello, hemos seleccionado el complejo sacarasa-isomaltasa del intestino delgado, que es una proteína ligada a membrana en el borde en cepillo intestinal, para lo que se ha procedido según el siguiente esquema:

a) Estudio del efecto de la edad sobre el intestino delgado centrándonos en la variación de parámetros fisiológicos y bioquímicos tales como: longitud, contenido proteico, distribución de las actividades enzimáticas (sacarasa e isomaltasa).

b) Estudio de la variación de la actividad específica del complejo sacarasa-isomaltasa con la edad.

c) Purificación del complejo.

d) Estudio de la relación actividad/cantidad de enzima mediante la utilización de anticuerpos policlonales y monoclonales.

e) Estudio de la relación de la pérdida de actividad con la edad y el estado de oxidación del complejo y de las subunidades separadas mediante la titulación de restos aminoacídicos con reactivos específicos.

f) Estudio de la inactivación del complejo-SI mediante sistemas-MCO no-enzimáticos.

g) Estudiar la relación existente entre el estado de oxidación y su sensibilidad a proteasas.

# **MATERIAL Y METODOS**

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales de experimentación utilizados por nosotros han sido ratas machos de la raza Wistar jóvenes y viejas. Las jóvenes de 3-6 meses de edad y entre 250-350 gramos de peso corporal. Las viejas de 24-28 meses de edad y peso corporal entre 650-750 g. Las ratas se alimentaron *ad libitum*, con una dieta estandar de laboratorio y agua potable.

Para obtener los anticuerpos se emplearon conejos hembras blancos de raza Neozelandesa, de unos 6 meses de edad, utilizando como antígeno el complejo sacarasa-isomaltasa purificado.

#### III.2. PRODUCTOS.

Los sustratos y enzimas utilizados proceden, fundamentalmente, de las firmas Boehringer (Manheim, Alemania), Sigma Chemical Co. (U.S.A.) y Merk (Alemania).

El Sephadex G-200, la Sepharosa 4B activada con CNBr, y

los marcadores moleculares (rango entre 56.000 y 280.000 Da) son productos de Pharmacia (Suecia).

La acrilamida, bisacrilamida, TEMED , el persulfato amónico de Bio Rad (U.S.A.), y el anhídrido citracónico de Sigma (U.S.A.).

La proteina-A y los tampones necesarios en la purificación de anticuerpos proceden de Beckman (U.S.A.).

Para la preparación del resto de tampones y disoluciones se emplearon reactivos de las firmas Sigma Chemical Co. (U.S.A.) y Merk (Alemania), con alto grado de pureza.

### III.3. PREPARACION DE LAS MEMBRANAS DE LAS MICROVELLOSIDADES INTESTINALES.

La preparación de las membranas de las microvellosidades intestinales se realiza siguiendo básicamente el método descrito por Kessler y col. (1978), con algunas modificaciones.

Una vez sacrificadas las ratas (jóvenes y viejas) mediante dislocación cervical, se extrae el intestino delgado lo más rápidamente posible y se mantiene en frío

(baño de hielo), se lava con solución salina fisiológica y se raspa la mucosa con la ayuda de un porta. Al raspado se le añade 10 veces su peso, en volumen, de la solución de tampón A (fosfato sódico 20 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, ajustar el pH a 7,0) y se homogeniza durante 3 minutos (10 pasadas) en un homeneizador Ultra Turrax provisto de un sistema con hielo. El homogeneizado se centrifugó a 1.500 x g durante 15 min..

Al sobrenadante opalescente se le añade cloruro cálcico cristalino a una concentración final de 10 mM y se mantiene con agitación suave, en baño de hielo, durante 45 minutos, pasados los cuales se centrifuga a 3.000 x g durante 10 minutos. El precipitado, -que contiene mitocondrias, núcleo, la mayoría de las membranas basolaterales y trozos rotos de células-, se elimina y el sobrenadante, con la gran mayoría de la actividad sacarasa-isomaltasa se centrifuga a 35.000 x g durante 30 minutos. De ésta última centrifugación, se elimina el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado, donde están los fragmentos de la **membrana del borde en cepillo** que contienen la mayor parte de actividad sacarasa-isomaltasa y se resuspende en 4 volúmenes de tampón A.

### III.4. AISLAMIENTO DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.

Para la solubilización del complejo-SI con el fin de extraerlo de la estructura de la membrana, manteniendo su actividad enzimática, se utilizaron dos métodos.

#### III.4.1. SOLUBILIZACION CON DETERGENTES.

En general, las disacaridasas del borde en cepillo son bastante resistentes a la solubilización mediante el uso de detergentes. Sin embargo se consigue una solubilización considerable del complejo-SI utilizando Tritón X-114 al 0,5% (concentración final) en tampón fosfato sódico 10 mM, a pH 7,0 y NaCl 0,1 M (Schmitz y col., 1973; Takesue y col., 1973; Sigrist y col., 1975; Kessler y col., 1978; Hauser y col., 1980). Las membranas se mantienen a 4°C durante 90 minutos y con movimiento ocasional. Centrifugamos a 90.000 x g durante 60 minutos y nos quedamos con el sobrenadante que contiene nuestro complejo solubilizado. Este sobrenadante se concentra 10 veces por ultrafiltración (corte nominal 100.000 Da). El concentrado se cromatografía por una columna de Sephadex G-200, equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM, tritón X-114 al 0,5% y NaCl 0,1M (flujo de 10 ml/h). El complejo se eluye con el mismo tampón de equilibrio entre los 1,2 y 4 volúmenes de la columna (50 x 1,7 cm). La proteína una vez solubilizada, mantiene un elevado

porcentaje de su actividad enzimática original. Para eliminar el Tritón de la muestra seguimos el método descrito por Takesue y col., 1973, de precipitación con acetona.

#### III.4.2. SOLUBILIZACION CON PAPAINA.

Experimentos *in vitro* han demostrado que el complejo-SI se puede solubilizar de la membrana del borde en cepillo mediante incubación con enzimas proteolíticas (Auricchio, 1963; James y col., 1971; Sigrist y col., 1975; Alpers y col., 1981). Entre las proteasas pancreáticas, la elastasa es la más efectiva para la solubilización de las disacaridasas intestinales (Alpers y Tedesco, 1975; Maestracci, 1976), sin embargo en el caso del complejo sacarasa-isomaltasa, rompe el segmento de conexión muy cerca a la parte globular de la isomaltasa, por lo que es la papaina la más comunmente utilizada, ya que obtenemos más del 90% de la masa total del complejo-SI permaneciendo anclado a la membrana lipídica solamente la parte N-amino terminal y el péptido de anclaje de la isomaltasa (Kolinska y col., 1975). Por el contrario, la tripsina y quimotripsina parecen ser inefectivas para solubilizar el complejo a menos que utilicemos concentraciones elevadas (1 mg/ml) (Maestracci, 1976). Originalmente, para solubilizar con papaina, se partía del homogeneizado del intestino delgado, pero se ha visto que es mejor partir de las membranas del

borde en cepillo una vez obtenidas.

Las membranas del borde en cepillo se diluyen con un tampón cisteína-HCl 5 mM/EDTA 1 mM (concentración final) en tampón fosfato potásico 50 mM a pH 6,8 y se incuban durante 30 minutos a 37°C con la papaina activada. Se utilizan 0,09 U de papaina por mg de proteína (Louvard y col., 1975). La papaina se activa añadiendo yodoacetato sódico a pH 6,8 y a una concentración final de 10 mM. Las membranas insolubilizadas se separan por centrifugación a 90.000 x g durante 60 minutos. Eliminamos el precipitado y el sobrenadante se concentra 10 veces por ultrafiltración (UF) (corte nominal 100.000 Da).

#### **III.4.2.1 PURIFICACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA SOLUBILIZADO CON PAPAÑA.**

Unos 2 ml del concentrado obtenido anteriormente por UF, se cromatografian en una columna de Sephadex G-200 (65 X 1,5 cm), previamente equilibrada con tampón fosfato potásico 0,01M (pH 6,8). La elución se realiza con tampón fosfato potásico 0,01M (pH 6,8), a un flujo de 10 ml/h, recogiendo las fracciones cada 15 min. El experimento se lleva a cabo a 4°C.

Se toman las fracciones que presenten actividad

sacarasa-isomaltasa y se realiza una electroforesis en condiciones nativas, seguida de una tinción por actividad, y la banda que tenga actividad sacarasa-isomaltasa se corta, se homogeniza en tubo Eppendorf y se centrifuga. Este sobrenadante es el que utilizamos para la obtención de anticuerpos anti-sacarasa-isomaltasa mediante inoculación en conejos Neozelandeses.

### III.5. OBTENCION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

Los anticuerpos policlonales para el complejo sacarasa-isomaltasa se preparan mediante inoculación, del complejo-SI purificado (mediante electroforesis preparativa), a conejos hembras de raza Neozelandesa siguiendo básicamente la técnica de Cummins y col.(1968).

Se mezclan 0,5 ml del complejo-SI purificado (0,5 mg/ml) con un volumen igual de coadyuvante de Freund, inyectándose a continuación subcutáneamente en los conejos, de los que previamente se obtiene suero preinmune para utilizarlo como control. Transcurridos unos 12-15 días de la inyección, se inyecta subcutáneamente la misma cantidad de antígeno en una mezcla análoga a la utilizada en la primera inoculación pero que contiene coadyuvante incompleto de Freund. Cuando desciende la respuesta se vuelve a inyectar

antígeno como en la 2<sup>a</sup> inyección, repitiéndose las inyecciones de antígeno periódicamente y obteniéndose suero una semana después de cada inyección.

### III.5.1. PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS.

La fracción gammaglobulina del suero se purifica mediante precipitación de las proteínas con sulfato amónico. A un volumen de suero se le añade, muy lentamente, en frío y con agitación suave, sulfato amónico hasta una concentración final del 40%, se deja a 4°C durante 4 horas, y una vez transcurridas se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min., el sedimento obtenido se resuspende en un volumen de PBS, y se realiza una segunda precipitación con sulfato amónico al 40% de la misma forma. Al cabo de una hora de precipitación se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min.. El sedimento se redisuelve en 0,1 volúmenes de PBS, y se dializa durante toda la noche a 4°C frente a una solución de PBS diluida 10 veces.

Solución de PBS:

NaCl.....8,0g

PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub>.....2,9g

PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K.....0,2g

KCl.....0,2g

Llevar hasta un volumen final de 1000 ml.

Ajustar el pH a 7,4. Almacenar a 4°C

### III.6. OBTENCION Y PURIFICACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL BBC 1-35/11/2.

Se parte del hibridoma del anticuerpo monoclonal BBC 1-35/11/2 (cedido por el Dr. Andrea Quaroni, Universidad de Cornell, Ithaca, U.S.A.), que es específico de la subunidad isomaltasa.

El crecimiento, expansión y obtención de sobrenadantes ricos en anticuerpos se realiza en colaboración con el Servicio de Inmunología del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), cultivando las células del hibridoma en crecimiento exponencial durante 7 días, sin cambiar el medio de cultivo, a una densidad celular inicial de 50.000 cel/ml en medio RPMI-1640 (casa Biochrom) y se creció en medio libre de suero, suplementado con 20% de BMS (casa Biochrom), 2 mM de L-glutamina (Sigma) y 0,2 g/l de bicarbonato sódico (Lab.BDH). Pasado este tiempo, se recogen los sobrenadantes, se centrifugan a 1.000 x g durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante. Los anticuerpos monoclonales (mAB) se precipitan con sulfato amónico al 40% (concentración final), añadido muy lentamente, en frío y agitación suave, se deja durante 4 horas a 4°C, pasadas las cuales se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min., el sedimento se resuspende en la mínima cantidad de PBS, y se dializa toda la noche a 4°C contra una solución de PBS diluida 10 veces.

Esta solución dializada se purifica en cromatografía de afinidad en Agarosa proteina A según las instrucciones específicas del proveedor (Beckman).

### III.7. PURIFICACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA POR INMUNOAFINIDAD.

Las fracciones con actividad sacarasa-isomaltasa provenientes de la cromatografía en columna de Sephadex G-200 se cromatografían en una columna de inmunoafinidad, Sepharosa 4B activada con cianuro de bromo a la que se le han unido los anticuerpos policlonales purificados, siguiendo básicamente el método descrito por March y col., 1974. La concentración de la inmunoglobulina es de unos 15 mg/ml y la relación entre el volumen de la solución del anticuerpo y la Sepharosa empaquetada es de 1:1. Basándonos en la absorbancia a 280 nm antes y después de la etapa de unión, vemos que la cantidad de inmunoglobulina unida a la Sepharosa es de un 90% de la cantidad inicial.

La purificación final del complejo-SI se realiza por inmunoadsorción a la columna de Sepharosa a la que se le ha unido el anticuerpo.

Las fracciones con actividad sacarasa-isomaltasa

provenientes de la columna de Sephadex G-200 se pasan a través de la columna de la anti-SI-Sepharosa (4,8 x 1,2 cm) equilibrada con tampón Tris-HCl, 50 mM (pH 8,0) que contiene 0,15 M de NaCl a un flujo de 5 ml/h) y se recogen fracciones de 5 ml. Tras lavar con 100 ml de tampón de equilibrio el complejo-SI se eluye a temperatura ambiente con tampón Tris-HCl 2 mM (pH 8,0). Se realizan electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y con SDS para determinar la pureza del complejo.

### III.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, se efectúan siguiendo básicamente el método descrito por Laemmli (1970), modificado por Reddy y col. (1980).

Para la preparación de los geles se utilizan las siguientes soluciones de partida:

Sol. A.- Acrilamida al 30%/bis-acrilamida al 0,8%

Sol. B.- 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sol. C.- 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8

Sol. D.- SDS al 10%

Sol. E.- Persulfato amónico al 10%

El gel separador se prepara al 7% según el siguiente protocolo:

Solución A.....8,5 ml  
Solución B.....7,0 ml  
Solución D.....0,3 ml  
Agua destilada.....13,98 ml  
Solución E.....0.2 ml  
TEMED.....15  $\mu$ l

El gel de empaque se prepara al 3% según el siguiente protocolo:

Solución A.....0,996 ml  
Solución C.....0,625 ml  
Solución D.....0,1 ml  
Agua destilada.....8,2 ml  
Solución E.....65  $\mu$ l  
TEMED.....7  $\mu$ l

Las muestras se mezclan en proporción 1:1 con el tampón de muestra, y se hierven durante 5 min.

El tampón de muestra tiene la siguiente composición:

SDS.....3,3 ml  
Sacarosa.....20%  
Azul de bromofenol....0,008%  
Tris/HCl, pH 7,0.....80 mM

EDTA.....17 mM

DTT.....17 mM

El tampón de corrido tiene la siguiente composición:

Trizma base..... 0,05 M

Glicina..... 0,383 M

Ajustar el pH a 8,3 y añadir SDS al 0,1%

Para la electroforesis sin SDS se sigue el método descrito por Cogoli y col., 1973.

La electroforesis se lleva a cabo a temperatura ambiente a una intensidad de corriente de 25 mA/gel en el gel de empaque y de 50 mA/gel en el gel de resolución.

Una vez acabada la electroforesis los geles se tiñen durante 1 hora con Coomassie blue G-250 al 0,25% (p/v) en etanol: agua: ácido acético (5:5:1), decolorándose a continuación en una mezcla de solución de ácido acético al 7,5 % y metanol al 5 % . Las tinciones por actividad se realizan incubando el gel con el sustrato (sacarosa o palatinosa) y tampón fosfato 200 mM.

Cuando las cantidades de proteína son del orden de  $\text{ng/mm}^2$  de gel, utilizamos la tinción de plata siguiendo el método descrito por Switzer y col., 1979, modificado por Oakey y col., 1980, que es 100 veces más sensible que el Coomassie Brilliant Blue.

### III.9. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Para la determinación de proteínas se sigue básicamente el método de Bradford (1976), modificado por Stoscheck (1990).

Este método está basado en la interacción del colorante utilizado como reactivo con los restos de arginina, y en menor proporción con los restos de histidina, lisina, fenilalanina, triptófano y tirosina de las proteínas, produciéndose así la estabilización de la forma aniónica del colorante por interacciones hidrofóbicas e iónicas, pudiendo detectarse por el máximo de absorbancia del colorante en solución ácida que se encuentra entre 465 y 595 nm.

Las cifras de proteínas detectables se encuentran en el intervalo de 0,2 y 100 µg. El protocolo seguido se detalla a continuación.

#### a) Preparación del reactivo:

Disolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%. Cuando se ha disuelto el colorante se filtra y se lleva hasta un volumen de 1000 ml con agua bidestilada. Se añaden 20 µl de NaOH 10 M por ml de reactivo.

**b) Solución de proteína para el trazado de la curva estandar:**

Se parte de una solución de albúmina de concentración 100 ug/ml y a partir de ella se preparan soluciones de menor concentración por diluciones sucesivas. El tampón utilizado para la proteína estandar es el mismo que el tampón en el que va disuelto nuestro complejo.

**c) Preparación de las muestras:**

Las muestras se preparan de forma que su concentración final esté dentro del rango de los 20-80  $\mu\text{g/ml}$ .

**d) Protocolo:**

A 100  $\mu\text{l}$  de la solución a medir (patrón o muestra) se le añade 1 ml del reactivo de Bradford (las soluciones se preparan por triplicado), se agitan y se dejan reposar 5 min. a temperatura ambiente. La absorbancia se lee a 595 nm frente a tampón.

**III.10. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.**

Para la determinación de las actividades del complejo-SI se ha seguido básicamente el método descrito por

Dahlqvist, quien ha ido desarrollando y mejorando las técnicas para la determinación de disacaridasas intestinales desde 1964 hasta 1984 (Dahlqvist, 1964; 1968; 1970; 1984).

**a) Principio:**

Después de la incubación de la preparación enzimática con el sustrato apropiado, se interrumpe la reacción mediante la ebullición de las muestras con la consiguiente precipitación protéica. La glucosa liberada por la enzima se determina mediante el método de la Glucosa-Oxidasa, utilizando el 2,2'Azino-di(3 etil bentiazolinsulfonato(6)) (ABTS) como reactivo cromogénico.

**b) Reactivos:**

Como sustratos, se utilizan: la sacarosa para la medida de actividad sacarasa y la palatinosa para la medida de actividad isomaltasa, preparando disoluciones 56 mM del disacárido apropiado (sacarosa ó palatinosa) en agua destilada. Las soluciones se almacenan en pequeñas alícuotas de 1-2 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 6,8.

El estandar de glucosa, se prepara a una concentración de 9,1  $\mu\text{g/ml}$ .

**Reactivo de la glucosa oxidasa:**

Peroxidasa (POD)..... 40  $\mu$ l  
Glucosa Oxidasa (GOD).....220  $\mu$ l  
ABTS.....100 mg  
Tampón fosfato sódico 100 mM c.s.p. 100 ml

**c) Medida de la actividad disacaridasa.**

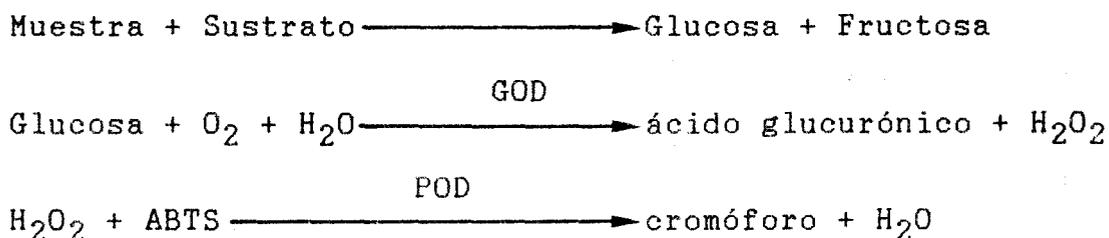
De cada dilución se toman 0,1 ml y se colocan en un tubo, que contiene 0,05 ml de tampón fosfato sódico 200 mM a un pH de 6,8. A continuación se le añade el sustrato, es decir, 0,1 ml de solución de sacarosa ó palatinosa 56 mM, según se vaya a determinar la actividad sacarasa ó isomaltasa. También se preparan los tubos controles, uno para cada sustrato, que contienen 0,05 ml de tampón y 0,1 ml del sustrato correspondiente.

Todos los tubos se llevan a un baño termostatzado a 37°C durante un periodo de 60 minutos. Pasado éste tiempo se añaden a los tubos controles 0,1 ml de la disolución del homogeneizado correspondiente. La reacción se interrumpe introduciendo todos los tubos en agua hirviendo durante dos minutos, y las muestras se centrifugan en una microfuga durante 2 min.

En el sobrenadante se encuentra la glucosa liberada de

la hidrólisis de los disacáridos, por la enzima correspondiente. Dicha glucosa se determina por el método de la Glucosa-Oxidasa.

Este método se basa en la reacción:



**d) Protocolo:**

Se toman 0,2 ml de la solución que contiene la glucosa a medir, se le añaden 5 ml del reactivo de la GOD, dejando desarrollar la reacción durante 10 min. a 37°C y leyendo la absorbancia a 600 nm. (se procede igual con el blanco control).

**e) Cálculos:**

Definimos una unidad de actividad disacaridasa como aquella que hidroliza un nmol de disacárido por minuto.

La actividad disacaridasa por ml de preparación de enzima se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. (mg/ml)} = 0,091 \times \frac{E_p}{E_{\text{std}}}$$

### **III.11. INMUNOPRECIPITACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.**

Para los ensayos de inmunoprecipitación de las actividades enzimáticas, en tejidos de ratas jóvenes y viejas, se utilizan los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación a 105.000 x g. A una determinada cantidad de actividad del complejo-SI se le añaden cantidades crecientes de anticuerpo, ajustando la mezcla a un volumen constante con solución salina y Tritón X-100 al 1,7% (p/v) de concentración final. Transcurrida 1 hora de reacción a 37°C ó toda la noche a 4°C se centrifugan a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, midiendo las actividades remanentes en los sobrenadantes obtenidos. Se utiliza suero preinmune de conejo como control de la incubación, no observándose pérdida de la actividad del complejo estudiado.

### **III.12. DISOCIACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA EN DOS SUBUNIDADES ENZIMATICAMENTE ACTIVAS.**

El proceso que se suele usar para la disociación de proteínas, envuelve el uso de agentes desnaturizantes, como por ejemplo: urea, guanidina o exposición a pH alcalinos o ácidos (Cogoli y col., 1973; Quaroni y col., 1975). Estas condiciones producen cambios en la estructura terciaria y las subunidades que se obtienen son insolubles a pH neutros en ausencia de agentes desnaturizantes. Por

ello, la disociación del complejo sacarasa-isomaltasa en sus dos subunidades, enzimáticamente activas, se ha llevado a cabo mediante citraconilación según el método descrito por Brunner y col. (1975), ya que este método presenta la ventaja de ser reversible, además de permitir la recuperación de las dos subunidades sin que exista por ello una pérdida significativa de sus actividades enzimáticas.

A una solución del complejo de sacarasa-isomaltasa de aproximadamente 5 mg en 1 ml de tampón fosfato sódico 50 mM a pH 8,2 y Tritón X-114 al 0,5% se le añaden 60  $\mu$ l de una solución al 10% (p/v) de anhídrido citracónico (Sigma) disuelto en dioxano, dejando que transcurra la reacción durante un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente y manteniendo el pH a 8,2 mediante la adición de KOH 1N.

Trás una extensiva diálisis contra una solución de fosfato sódico 10 mM a un pH de 8,2 y tritón al 0,5%, que permite la renaturalización de las subunidades, éstas se cromatografían en una columna de Bio-gel P-200 (90 x 2,5 cm) con tampón fosfato sódico 10 mM (pH 6,8) a 4°C y con flujo de elución de 5 ml/h. Las fracciones que contienen actividad sacarasa-isomaltasa se recogen y se concentran mediante ultracentrifugación a 140.000 x g durante toda la noche y posteriormente el precipitado se redisuelve en la mínima cantidad de tampón fosfato sódico 10 mM y se cromatografía

en columna de Sephadex G-200 (30 x 1,5 cm) con tampón fosfato 10 mM (pH 6,8) a 4°C y flujo de 2,5 ml/h. En esta cromatografía se obtienen separadas las dos subunidades que mantienen prácticamente toda su actividad enzimática inicial.

### III.13. MODIFICACION QUIMICA.

#### III.13.1. DETERMINACION DE GRUPOS -SH.

La determinación de grupos -SH se llevó a cabo con en reactivo ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), que es un disulfuro aromático. Dicho compuesto reacciona con los grupos -SH de las proteínas dando lugar a la formación de un disulfuro mixto, además del 2-nitro-5-tiobenzoato. Un mol de 2-nitro-5-tiobenzoato equivale a un mol de P-SH. (La sustancia que absorbe es la mitad del DTNB hidrolizado).

Se puede seguir la reacción espectrofotométricamente a 412 nm, ya que el 2-nitro-5-tiobenzoato absorbe fuertemente a dicha longitud de onda. El coeficiente de extinción molar para éste compuesto es de  $\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El intervalo de pH en el que se realiza la reacción es entre 8,0 y 9,0.

Para la determinación de grupos -SH directamente

accesibles, se ha seguido básicamente el método descrito por Sedlak y Linsay (1968):

- Tomar 0,5 ml de solución de enzima no desnaturalizada, y mezclar con 0,4 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M a un pH de 8,2.

- Añadir 0,1 ml de solución de DTNB 0,01 M disuelto en metanol y preparado en el momento de su utilización.

- Mezclar bien y dejar reaccionar durante 60 minutos a 37°C con el fin de que se desarrolle el color característico.

- Medir la absorbancia a 412 nm, frente a blanco muestra.

- Para la realización de los cálculos, restar la absorbancia del blanco reactivo a la absorbancia leída para la muestra.

Para la determinación de grupos -SH en muestras desnaturalizadas, le añadimos SDS al 2% a la solución de enzima y se procede de la misma forma que se ha descrito anteriormente para las muestras nativas (Ellman, 1959).

#### **Estudio Cinético:**

La reactividad de los grupos -SH presentes en el

complejo-SI se ha realizado de la siguiente manera:

- En la cubeta de medida ponemos 0,5 ml de solución de enzima y se mezcla con 0,4 ml de tampón Tris-HCl (pH 8,2).

- Se coloca la cubeta en el espectrofotómetro y se le añaden 0,1 ml de la solución de DTNB 0,01 M. Se agita rápidamente y se toma la primera lectura que corresponde al tiempo 0.

- Durante el primer minuto tomamos lectura cada 10 segundos y a partir de ahí a los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos.

El estudio cinético se realiza mediante la representación gráfica del log. de la concentración de grupos -SH no modificados frente al tiempo.

Para la determinación de la actividad enzimática tras la modificación de los grupos -SH se procede de la siguiente forma: a 0,5 ml de la solución de enzima se le añaden 0,4 ml de tampón Tris-HCl 0,01M (pH 8,2). Añadimos 0,1 ml de solución de DTNB 0,01 M, agitamos y vamos midiendo la actividad enzimática a distintos tiempos: 0, 5, 10, 15 y 30 minutos.

### III.13.2. DETERMINACION DE GRUPOS ARGININA.

Las determinaciones cuantitativas de los restos de arginina en las soluciones enzimáticas puras, se han realizado siguiendo el método de Yamasaki (1981), utilizando el reactivo p-nitrofenilglioxal (p-NPG).

Como consecuencia de la reacción de los grupos arginina con éste reactivo se produce un producto de condensación que absorbe a una longitud de onda de 475 nm. El producto que se obtiene con arginina o con N-acetil arginina contiene dos moles de fenil glioxal por mol de aminoácidos. El procedimiento seguido es el siguiente:

- A 3 ml de muestra (0,5-1,0 mg/ml) en tampón fosfato sódico 0,15 M (pH 9,0) se le añaden 30 µl de p-NPG al 10% en metanol.

- La reacción se desarrolla a temperatura ambiente y a intervalos de tiempo determinados, medimos absorbancia a 475 nm, frente a un blanco patrón.

- La cuantificación de los restos de arginina se realiza a partir de una curva de calibrado trazada previamente con L-arginina como patrón.

Al igual que para los grupos -SH la determinación de la actividad enzimática tras la modificación de los restos de arginina con p-NPG se realiza siguiendo un protocolo

totalmente análogo al anteriormente detallado para los grupos-SH.

### III.13.3. DETERMINACION DE GRUPOS HISTIDINA.

Los grupos histidina de las soluciones enzimáticas puras se han valorado utilizando como reactivo el dietilpirocarbonato (DEPC) (Miles, 1977).

La reacción entre el DEPC y los grupos histidina da lugar al N-carbetoxihistidina, compuesto que tiene un máximo de absorbancia a 240 nm ( $\epsilon=3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Miles, 1977; Tophan y Dalziel, 1986). El procedimiento seguido es el siguiente:

- A 2 ml de muestra (0,5 - 1 mg/ml) en tampón Tris-HCl 0,1M a un pH de 7,0 se añaden 0,5 ml de DEPC al 1% en tampón fosfato 0,1 M.

- Dejamos que la reacción transcurra durante 60 minutos a temperatura ambiente y vamos tomando lectura de la absorbancia a 240 nm a intervalos de tiempo fijos.

Al igual que en los casos anteriores se determina la actividad enzimática de la mezcla solución-tampón-reactivo, tomando valores a distintos intervalos de tiempo.

### III.13.4. DETERMINACION DE RESTOS DE LISINA.

Para la determinación de los restos de lisina en las soluciones enzimáticas se ha utilizado como reactivo el Trinitro benzol-sulfónico (TNBS) en agua siguiendo básicamente el método de Habeeb (1966), modificado por Tuengler y Pfleiderer (1977).

El número de restos de lisina por mol de enzima se determina a partir del incremento de absorbancia a 342 nm ( $\epsilon = 14.4 \text{ cm}^{-1} \mu\text{moles}^{-1}$ ) procediéndose de la siguiente forma:

- Tomamos 250  $\mu\text{l}$  de solución enzimática (10-30  $\mu\text{g}$ ) y añadimos 250  $\mu\text{l}$  de tampón borato 0,5 M (pH 9,5) y 250  $\mu\text{l}$  de TNBS 0,1% en agua.

- Dejamos la mezcla en incubación durante 3 horas a 40°C y añadimos 250  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 125  $\mu\text{l}$  de HCl 1N.

- Cuantificamos los restos de lisina a 342 nm a partir del incremento de absorbancia frente a un blanco (sin solución enzimática).

### III.13.5. MODIFICACION DE LOS RESTOS METIONINA

La modificación de los restos de metionina se lleva a

cabo con cloramina-T según el método de Trout, (1979) que básicamente consta de los siguientes pasos:

- A 0,5 ml de solución enzimática se le añaden 0,3 ml de tampón fosfato 0,15 M, (pH 7,0) y 0,2 ml de cloramina-T de concentración variable (0,001; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 y 0,1 M). Mezclar bien y dejar que se desarrolle la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procede a:

- a) determinar la actividad enzimática.
- b) determinar el n<sup>o</sup> de restos de metionina modificados

Los restos de metionina presentes en la molécula de la enzima se determinan como homoserina, según el método de Gross (1967) que básicamente consiste en:

Digestión de la muestra (0,5 a 1,5 mg) con CNBr.

Hidrolisis ácida en presencia de DTT.

Determinación cromatográfica de homoserina (equivalente a los restos de metionina oxidados a metionina sulfoxido).

El n<sup>o</sup> de restos de metionina modificados por la cloramina-T se calcula por diferencia con los valores obtenidos para una muestra no tratada.

III.14. INACTIVACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA CON LOS SISTEMAS-MCO NO-ENZIMATICOS: Fe(III)/ASCORBATO/O<sub>2</sub> Y Cu(II)/ASCORBATO/O<sub>2</sub>.

Se prepara una solución de ascorbato 1,28 M en tampón HEPES 100 mM a pH 7,4 y la mantenemos en frío. La solución se prepara momentos antes de su uso.

Se prepara una solución de Cl<sub>3</sub>Fe 25 mM disuelto en HCl 1 mM.

Las concentraciones en cubeta, en un volumen total de 2,05 ml, para los diferentes componentes deben ser:

Muestra.....	0,1-0,2 mg/ml
Tampón HEPES.....	50 mM
FeCl <sub>3</sub> .....	0,1 mM
CuSO <sub>4</sub> .....	0,1 mM
Ascórbico.....	2,5 mM

Se preparan nueve muestras para medir la actividad enzimática remanente a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 180 min.). La reacción se para añadiendo 1 ml de una solución de EDTA al 50 mM. El exceso de ascorbato se elimina, para evitar interferencias, cromatografiando las muestras por una columna PD-10 (Pharmacia).

### III.15. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS.

Los grupos carbonilos se han determinado mediante dos procedimientos:

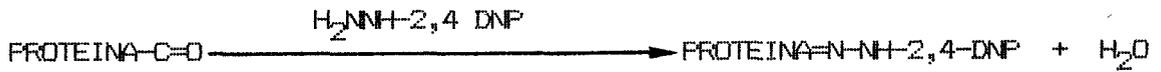
1) Con 2,4-Dinitrofenil hidrazina (2,4-DNPH): empleado para cuantificar los grupos carbonilos de la albúmina oxidada durante 50 horas con el sistema-MCO no-enzimático (Fe(III)/Ascorbato/O<sub>2</sub>), utilizada como patrón en la determinación de grupos carbonilos con el reactivo DIG-X-hidrazida.

2) Con Digoxigenin-succinil- $\epsilon$ -amino-caproico-hidrazida. (DIG-X-hidrazida): empleado para cuantificar grupos carbonilos en el complejo-SI de animales jóvenes, viejos y oxidado, utilizando albúmina-oxidada como patrón.

#### III.15.1. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS CON 2,4-DINITRO-FENIL-HIDRAZINA

Este es el reactivo general para el estudio de los grupos carbonilos (Brady y Elsmie, 1926; Fields y Dixon, 1971; Levine, 1983); y el más conveniente de usar cuando se dispone de cantidades apreciables de muestra ( 1mg/ml) (Lenz y col., 1989).

El método se basa en la siguiente reacción:



y la hidrazona formada se puede cuantificar espectrofotométricamente asumiendo una  $\epsilon = 22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**a) Reactivos**

- HCl 2M.
- 2,4 DNP 10 mM en HCl 2M.
- Acido tricloroacético, 20% (p/v).
- Guanidina, 6M en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 2,3 (ajustar el pH con acido trifluoroacético).

**b) Protocolo**

- En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se pipetea las siguientes cantidades:

	Problemas	Blanco
Muestra.....	1 ml	1 ml

-Con el fin de concentrar la proteína, la precipitamos con tricloroacético (TCA), eliminando el sobrenadante. Al precipitado le añadimos las siguientes cantidades:

	Problemas	Blanco
2,4 DNP, 10 mM.....	500 µl	-
HCl 2M.....	-	500 µl

-Dejamos reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, agitándolos cada 10-15 min. Transcurrido este tiempo de reacción, añadir:

	Problemas	Blanco
TCA 20% .....	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l

y centrifugar en una centrifuga de mesa a 11.000 x g durante 3 min. Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado 3 veces con 1 ml de etanol:acetato de etilo (1:1) para eliminar el exceso de reactivo (Dejar reposar unos 10 min. antes de centrifugar).

Una vez lavado el precipitado, redisolverlo en 0,6 ml. de solución de guanidina. Eliminar los insolubles mediante centrifugación y utilizar el sobrenadante para determinar el contenido en grupos carbonilos.

Hacer un espectro desde 250 a 400 nm y calcular el contenido de grupos carbonilos a partir del máximo de absorción (360-390 nm) que presenta el espectro, asumiendo un coeficiente de absorción molar de 22.000  $M^{-1} m^{-1}$  (Johnson, 1953).

### III.15.2. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS CON DIGOXIGENIN-SUCCINIL- $\xi$ -AMINO-CAPROICO-HIDRAZIDA.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del método de la 2,4-DNPH se han obtenido diferentes derivados de la hidrazina, tales como la fluoresceina tiosemicarbacida o la fluorescein-adipic-hidracida (Ahn y col., 1987) que mejoran sensiblemente su sensibilidad, sin embargo, estos métodos, por causas aún no explicadas, no son fácilmente aplicables directamente en la cuantificación de grupos carbonilos utilizándose fundamentalmente para la detección de proteínas oxidadas en geles de poliacrilamida o en Western-blots. (Ahn y col., 1989).

Sin embargo, trabajando en esta línea, nuestro grupo (Bautista y col., resultados no publicados) ha desarrollado una técnica de "enzimo-inmunoensayo" que utilizando un derivado de la hidrazina, la Digoxigenin-succinil- -amino-caproico-hidrazida (DIG-X-hidrazida) y un anticuerpo antidigoxigenina ligado a fosfatasa alcalina permite la cuantificación de grupos carbonilos a niveles de ng de proteína.

El método se basa en las reacciones reflejadas en la Fig. 15.

**a) Reactivos:**

- Microplaca de 96 pocillos.
- DIG-X-hidrazida.
- Anticuerpo antidigoxigenina ligado a fosfatasa alcalina ( <DIG> PA ).
- p-nitrofenil-fosfato disódico.
- TBS-Tween 20.
- Albumina oxidada.

**b) Protocolo:**

- En una microplaca de 96 pocillos ponemos 100 µl de cada una de las soluciones a ensayar (estandar y problema), por triplicado, e incubar a 4°C durante toda la noche.
- Lavar 3 veces con TBS-Tween 20.
- Añadir 5 µl de DIG-X-hidrazida + 95 µl de tampón TBS pH 7,4 e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar 5 veces con TBS-Tween 20.
- Bloquear los sitios libres con reactivo de bloqueo (200 µl) e incubar de 1-2 horas a temperatura ambiente.
- Lavar dos veces con TBS-Tween 20.
- Diluir el <DIG> PA con TBS pH 6,5 en una proporción 1:1000 y poner 100 µl de la dilución en cada pocillo. Dejar incubar una hora a temperatura ambiente.
- Lavar 5 veces con TBS-Tween 20.

- Añadir 100 µl de solución sustrato (pH 9,8).
- Leer en el Elisa-reading, a 405 nm a los 10 min. y a los 30 min.

El contenido en grupos carbonilos se determina a partir de la curva estandar trazada con la albumina oxidada a 50 horas.

### III.16. ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EL INTESTINO DELGADO.

Se han determinado dos tipos de actividad proteolítica:

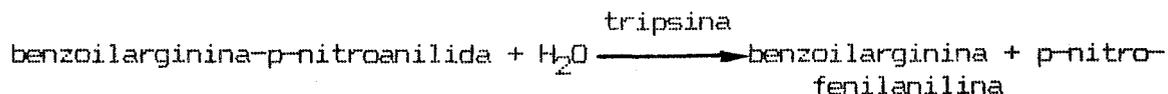
1.-Actividad **proteolítica** debida a proteasas **pancreáticas** (tripsina, quimotripsina y elastasa), expresada como unidades de tripsina.

2.-Actividad **proteolítica** propia del intestino, expresada como actividad proteolítica **ácida** (medida a pH 5,5) y como actividad proteolítica **alcalina** (medida a pH 8,8).

#### III.16.1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA PANCREATICA.

La actividad proteolítica pancreática se determina en el jugo intestinal siguiendo básicamente el método descrito por Erlanger y col., 1961.

El jugo intestinal se obtiene en el lavado del intestino delgado una vez sacrificado el animal. El fundamento del método empleado para medir la actividad proteásica es el siguiente:



Esta reacción tiene lugar en presencia de las proteasas pancreáticas, aunque con una especificidad menor que para la tripsina, para quien esta reacción es específica, por lo que los resultados se expresarán como unidades de tripsina (U).

**a) Reactivos.**

- Tampón Tris-HCl 0,2 M con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  25 mM a pH 7,8
- Benzoilarginina-p-nitrofenilalanilida 12 mM

**b) Protocolo.**

Se toman 2 ml de tampón Tris- $\text{CaCl}_2$  y se le añaden 0,2 ml de la solución de benzoilarginina-p-nitrofenilalanilida. Se mezclan bien y se incuban durante 5 minutos en baño maría a  $25^\circ\text{C}$ .

Se añaden 0,2 ml de solución problema a la mezcla anterior. Al blanco se le añaden 0,2 ml de agua destilada en lugar de solución problema. Se mezclan y medimos absorbancia

a 405 nm a tiempo cero ( $A_1$ ) y a un tiempo de incubación de 15 min. ( $A_2$ ) a 25°C después de la primera lectura.

### c) Cálculos.

La actividad expresada como actividad tripsina se expresa en unidades internacionales aplicando la siguiente fórmula:

$$U.I.(25^{\circ}C) = 80,0 \times A_{405nm}$$

donde:

$$A = A_2 - A_1$$

$A_1$  = absorbancia a tiempo cero.

$A_2$  = absorbancia a 15 minutos de incubación.

## III.16.2. ACTIVIDAD PROTEOLITICA INTESTINAL.

### III.16.2.1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA INTESTINAL ACIDA.

Para la determinación de la actividad proteolítica ácida se ha seguido básicamente el método descrito por Reimerdes y Klostermeyer (1976), ligeramente modificado por Rivett (1985a).

Se utiliza el homogeneizado de mucosa intestinal, previamente lavado, y por tanto sin el jugo pancreático.

**a)Reactivos.**

Solución de hemoglobina desnaturalizada al 0,27% disuelta en tampón Tris-HCl 0,13 M con  $\text{CaCl}_2$  25 mM a pH 5,5.

**b)Protocolo.**

A 1 ml de la solución de la hemoglobina desnaturalizada se le añaden 100  $\mu\text{l}$  de homogeneizado (para el blanco se le añaden 100  $\mu\text{l}$  de tampón).

Se incuba durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y se para la reacción añadiendo 1,1 ml de solución de TCA al 5% . Se centrifuga y se lee absorbancia a 280 nm en el sobrenadante.

Definimos 1 Unidad de actividad como los mg de hemoglobina desnaturalizada que se hidrolizan por minuto y por mg de proteína problema.

### **III.16.2.2. ACTIVIDAD PROTEASICA ALCALINA**

Para la determinación de la actividad proteolítica intestinal alcalina seguimos el mismo protocolo que para la determinación de la actividad proteolítica intestinal ácida

con la siguiente salvedad: se utiliza como reactivo una solución de caseinato al 0,27% disuelto en tampón Tris-HCl 0,13 M con  $\text{CaCl}_2$  25 mM a pH 8,8 en lugar de solución de hemoglobina desnaturalizada.

### III.17. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO-SI FRENTE A PROTEASAS

La sensibilidad del complejo frente a proteasas se ha estudiado frente a proteasas pancreáticas y frente a proteasas intestinales alcalinas. Para ello se ha utilizado el complejo de animales jóvenes, viejos y el complejo oxidado de animales jóvenes, y como fuente de proteasas se ha utilizado:

-Tripsina como proteasa pancreática

-Homogeneizado de mucosa, previamente lavado, solubilizadas las proteínas con Tritón X-114, y filtrado por ultrafiltración (corte nominal 100.000 Da), con lo que obtenemos un UF sin actividad sacarasa-isomaltasa, como fuente de proteasas intestinales.

El protocolo seguido, básicamente ha consistido en la incubación del complejo-SI con la correspondiente proteasa durante diferentes intervalos de tiempo y medida posterior de la actividad enzimática remanente.

Los resultados se han expresado como tanto por ciento de la actividad inicial (actividad a tiempo cero).

### III.18. ESTABILIDAD TERMICA.

Para los ensayos de inactivación térmica del complejo, seguimos básicamente el método descrito por Takahashi y Goto (1987).

Sometemos al complejo-SI de joven y de viejo a diferentes temperaturas y medimos la actividad enzimática remanente a distintos intervalos de tiempo.

También incubamos la solución del complejo modificado y sin modificar por el sistema Fe(III)/ascorbato/O<sub>2</sub> a 45°C, representando la actividad remanente del complejo-SI frente a diferentes tiempos de incubación a dicha temperatura.

### III.19. DESGLUCOSILACION.

La desglucosilación del complejo se ha llevado a cabo bajo condiciones nativas siguiendo básicamente el método descrito por Byatt y col., 1990.

Se toman 100 µg del complejo sacarasa-isomaltasa liofilizado y se disuelven en 200 µl de agua bidestilada. Para eliminar los oligosacáridos unidos a través de uniones tipo-N, la solución del complejo sacarasa-isomaltasa se tampona con 200 µl de tampón fosfato sódico 0,55 M, a pH 8,6. A esta mezcla tamponada se le añade como inhibidor de proteasas 30 µl de una solución de 1,10-fenantrolina hidrato 100 mM disuelta en metanol y 30 µl de una solución de aprotinina de 30 mg/ml y como glucosidasa se le añaden 500 mU de N-glucosidasa-F (la solución stock contiene 2000 mU/ml). Se agita y se incuba la mezcla durante 24 horas a 37°C.

Para eliminar las uniones glucosídicas de tipo-O la mezcla se liofiliza y se reconstituye con 400 µl de tampón acetato 0,5 M a pH 6,0. A esta solución se le añaden 120 mU de O-glicanasa (solución stock 1450 mU/ml), y se incuba durante 24 horas a 37°C.

Todas las reacciones de desglucosilación se paran por congelación a -80°C.

Las muestras desglucosiladas se pasan a través de una PD-10 para eliminar sales y azúcares. Las fracciones que contienen la proteína libre de sales y azúcares son las que se utilizan para posteriores estudios.

## **RESULTADOS**

#### IV. RESULTADOS.

##### IV.1. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL CONTENIDO PROTEICO DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.

En las Tablas VI y VII se muestran los pesos, expresados como peso húmedo, y longitudes del intestino delgado de ratas jóvenes y viejas utilizadas en el presente estudio, así como las cantidades de mucosa, obtenida mediante raspado, de los distintos segmentos intestinales estudiados (duodeno, yeyuno, íleon proximal e íleon distal).

En las Tablas VIII y IX se expresan los contenidos proteicos hallados mediante determinaciones realizadas en la mucosa y en las membranas del borde en cepillo, de los distintos segmentos del intestino delgado estudiados, en animales jóvenes y viejos.

**TABLA VI. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL PESO CORPORAL, LA LONGITUD Y LAS CANTIDADES DE MUCOSA OBTENIDAS MEDIANTE RASPADO EN EL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

**RATAS JOVENES (3 meses)**

Peso (g)	Longitud (cm)	Peso de mucosa raspada en diferentes segmentos del intestino delgado (g)			
		D	Y	Ip	Id
250,2	110,3	0,40	0,43	0,41	0,35
248,4	101,6	0,31	0,42	0,45	0,37
239,3	112,2	0,42	0,31	0,43	0,31
273,5	116,1	0,41	0,43	0,40	0,27
255,0	112,8	0,42	0,34	0,40	0,34
216,3	111,3	0,40	0,41	0,41	0,33
253,2	110,2	0,39	0,42	0,39	0,44
225,6	104,4	0,50	0,62	0,58	0,46
238,8	111,3	0,42	0,45	0,42	0,31
257,7	116,8	0,43	0,44	0,41	0,33
227,5	112,1	0,50	0,45	0,42	0,41
257,4	110,1	0,45	0,40	0,40	0,36
283,2	109,3	0,41	0,33	0,38	0,34
251,4	110,2	0,32	0,45	0,43	0,36
278,6	117,3	0,44	0,57	0,37	0,33
256,1	111,1	0,39	0,43	0,43	0,32
259,0	110,3	0,40	0,52	0,35	0,35
x (251,1)	(111,0)	(0,41)	(0,44)	(0,42)	(0,35)
DE(±17,4)	( ±3,8)	(±0,05)	(±0,07)	(±0,05)	(±0,05)

D= duodeno, Y= yeyuno, Ip= ileon proximal, Id= ileon distal x= valor medio, DE= desviación estandar. n= 17 ratas.

**TABLA VII. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL PESO CORPORAL, LA LONGITUD Y LAS CANTIDADES DE MUCOSA OBTENIDAS MEDIANTE RASPADO EN EL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

**RATAS VIEJAS (28 meses)**

Peso (g)	Longitud (cm)	Peso de mucosa raspada en diferentes segmentos del intestino delgado (g)			
		D	Y	Ip	Id
464,2	110,3	0,53	0,49	0,52	0,38
450,6	114,1	0,39	0,53	0,51	0,32
462,1	112,4	0,52	0,41	0,43	0,38
456,7	111,3	0,50	0,54	0,57	0,40
443,3	112,2	0,61	0,66	0,38	0,39
459,2	112,1	0,39	0,48	0,54	0,38
411,5	108,3	0,48	0,48	0,53	0,45
433,5	112,6	0,62	0,62	0,47	0,46
453,3	102,8	0,51	0,60	0,59	0,47
x (448,4)	(110,7)	(0,51)	(0,52)	(0,50)	(0,40)
DE(±15,86)	( ±3,2)	(±0,08)	(±0,07)	(±0,06)	(±0,05)

D= duodeno, Y= yeyuno, Ip= ileon proximal, Id= ileon distal x= valor medio, DE= desviación estandar. n= 9 ratas.

**TABLA VIII. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL CONTENIDO PROTEICO DE LA MUCOSA Y MEMBRANAS DE LAS VESICULAS DEL BORDE EN CEPILLO EN LOS DISTINTOS SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

**RATAS JOVENES (3 meses)**

Contenido proteico del homogeneizado de mucosa (mg)				Contenido proteico en la membrana de las vesículas del borde en cepillo (mg)			
D	Y	Ip	Id	D	Y	Ip	Id
47,1	48,2	52,5	39,3	2,2	2,8	2,4	2,0
49,3	60,5	51,7	40,2	2,6	2,6	2,3	2,4
55,1	47,2	50,4	46,2	2,8	2,6	2,3	2,0
53,2	57,2	50,9	46,2	2,5	2,8	2,3	1,8
46,8	46,3	48,9	36,2	2,4	2,6	2,4	2,3
49,2	51,2	52,6	40,3	2,5	3,1	2,5	2,3
53,7	56,4	54,1	39,3	2,4	2,6	2,8	2,5
46,2	43,2	50,2	42,0	2,6	2,8	2,0	1,8
46,1	47,4	50,2	40,5	2,6	2,9	2,8	1,8
52,9	49,9	50,3	43,2	2,4	2,4	2,4	1,8
x (50,0)	(50,8)	(51,2)	(40,9)	(2,5)	(2,7)	(2,5)	(2,1)
DE(±3,3)	(±5,3)	(±1,5)	(±2,5)	(±0,1)	(±0,2)	(±0,2)	(±0,3)

n= 10 ratas.

**TABLA IX. EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL CONTENIDO PROTEICO DE LA MUCOSA Y MEMBRANAS DE LAS VESICULAS DEL BORDE EN CEPILLO DE LOS DISTINTOS SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

**RATAS VIEJAS (28 meses)**

Contenido proteico del homogeneizado de mucosa (mg)				Contenido proteico en la membrana de las vesículas del borde en cepillo (mg)			
D	Y	Ip	Id	D	Y	Ip	Id
50,3	56,7	58,0	48,2	2,7	2,9	2,6	2,0
56,2	53,8	63,1	44,1	2,5	2,7	2,4	2,3
60,7	58,2	60,2	51,3	2,8	3,1	2,6	1,8
57,3	70,5	64,8	42,4	2,4	2,8	2,3	2,2
57,4	56,3	59,3	56,4	2,6	2,9	3,0	2,1
56,2	54,7	57,0	47,3	2,7	3,0	2,3	2,1
58,9	57,3	61,0	48,2	2,5	2,7	2,7	2,4
54,3	52,4	58,4	57,2	2,9	2,5	2,6	1,9
55,6	57,8	55,2	46,3	2,7	2,9	2,6	2,2
x (56,6)	(57,5)	(59,7)	(49,1)	(2,6)	(2,8)	(2,6)	(2,1)
DE(±2,7)	(±4,9)	(±2,8)	(±4,8)	(±0,1)	(±0,2)	(±0,2)	(±0,2)

D= duodeno, Y= yeyuno, Ip= íleon proximal, Id= íleon distal x= valor medio, DE= desviación estandar. n= 9

#### IV.2. DISTRIBUCION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA A LO LARGO DEL INTESTINO DELGADO Y VARIACION DE SU ACTIVIDAD DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

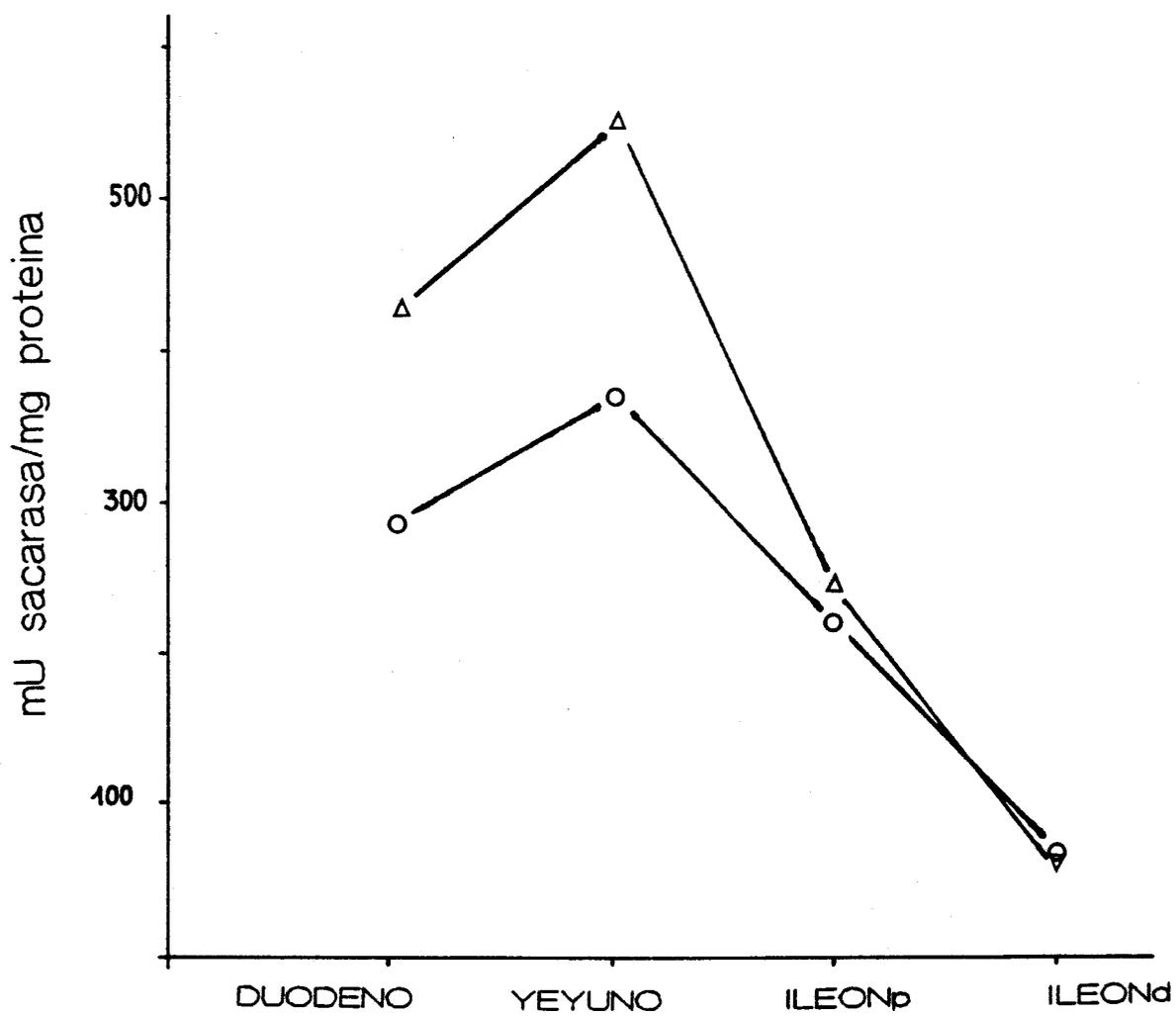
Con el fin de estudiar la distribución del complejo sacarasa-isomaltasa a lo largo del intestino delgado, se procedió a determinar en primer lugar la actividad del complejo en los diferentes segmentos intestinales de ratas jóvenes. Los resultados obtenidos se exponen en la Fig. 16.

La Fig. 17 muestra la actividad media del complejo, medida como actividad sacarasa, en el intestino delgado, a distintas edades.

La Fig. 18 muestra comparativamente los datos obtenidos para la actividad específica sacarasa del complejo en animales jóvenes y viejos, en los distintos tramos del intestino delgado, mostrándose en la Fig. 19 los relativos a la actividad específica isomaltasa del complejo.

FIGURA 16. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO-SI, EN LOS DISTINTOS SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO, DE RATAS JOVENES.

---



Δ actividad sacarasa

○ actividad isomaltasa

---

FIGURA 17. ACTIVIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA, MEDIDA COMO ACTIVIDAD SACARASA, A LO LARGO DE LA VIDA DE LA RATA, EN EL HOMOGENEIZADO DE LA MUCOSA DEL INTESTINO DELGADO.

---

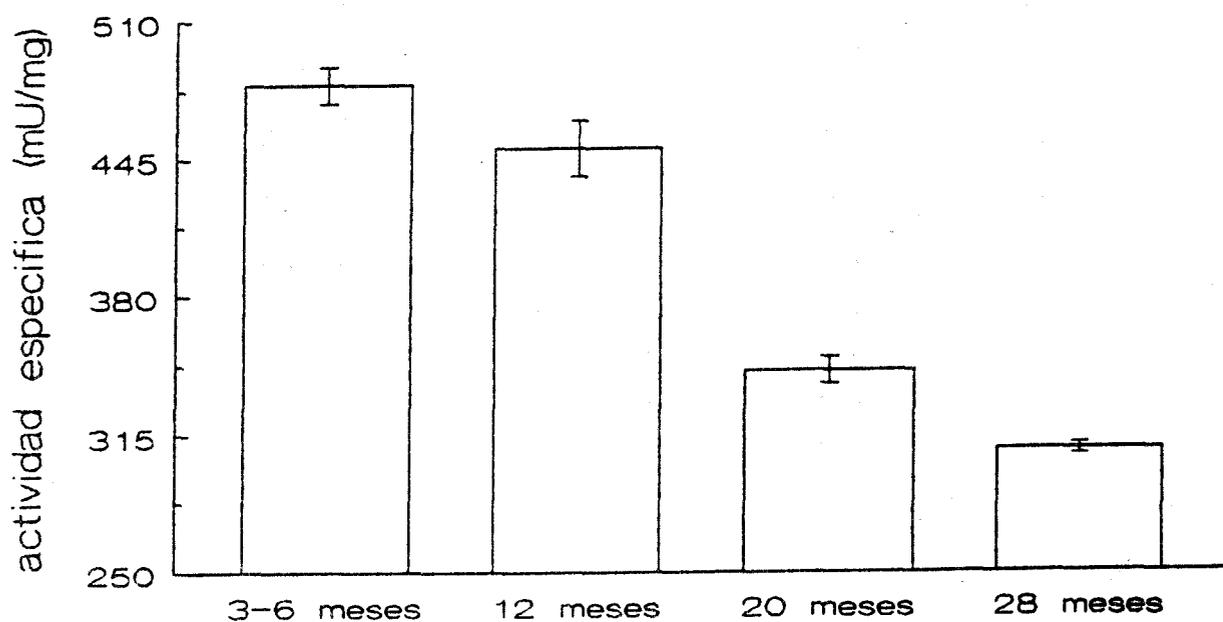
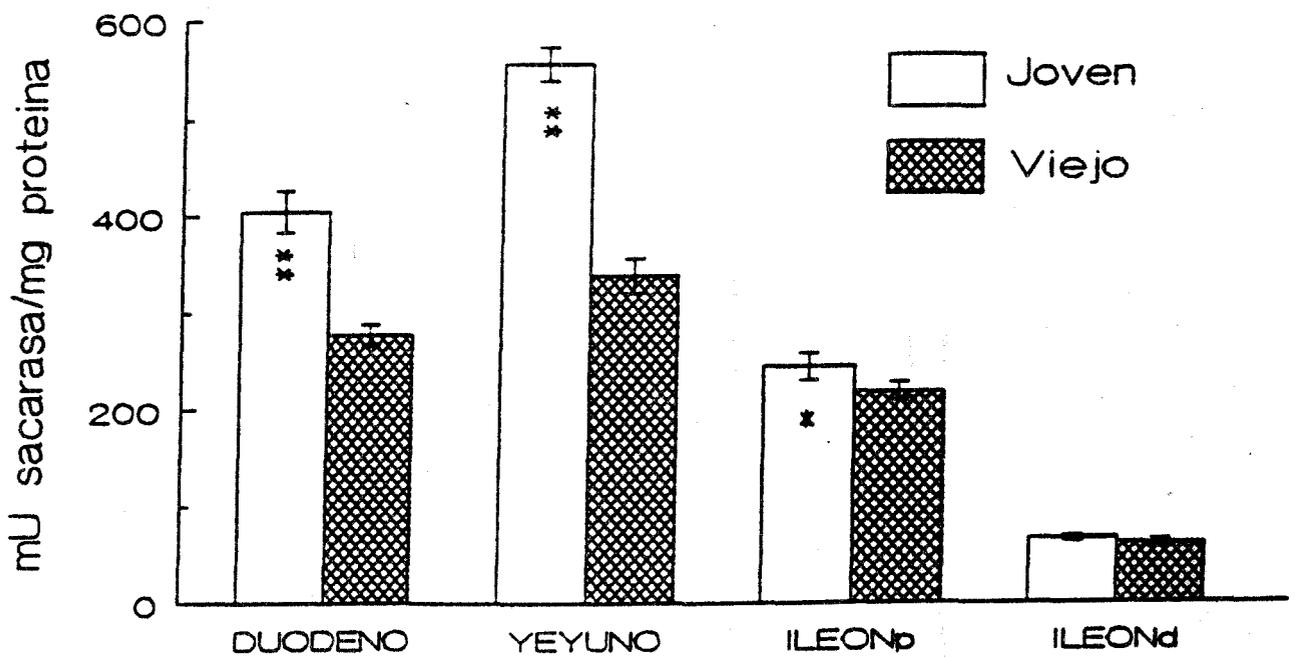


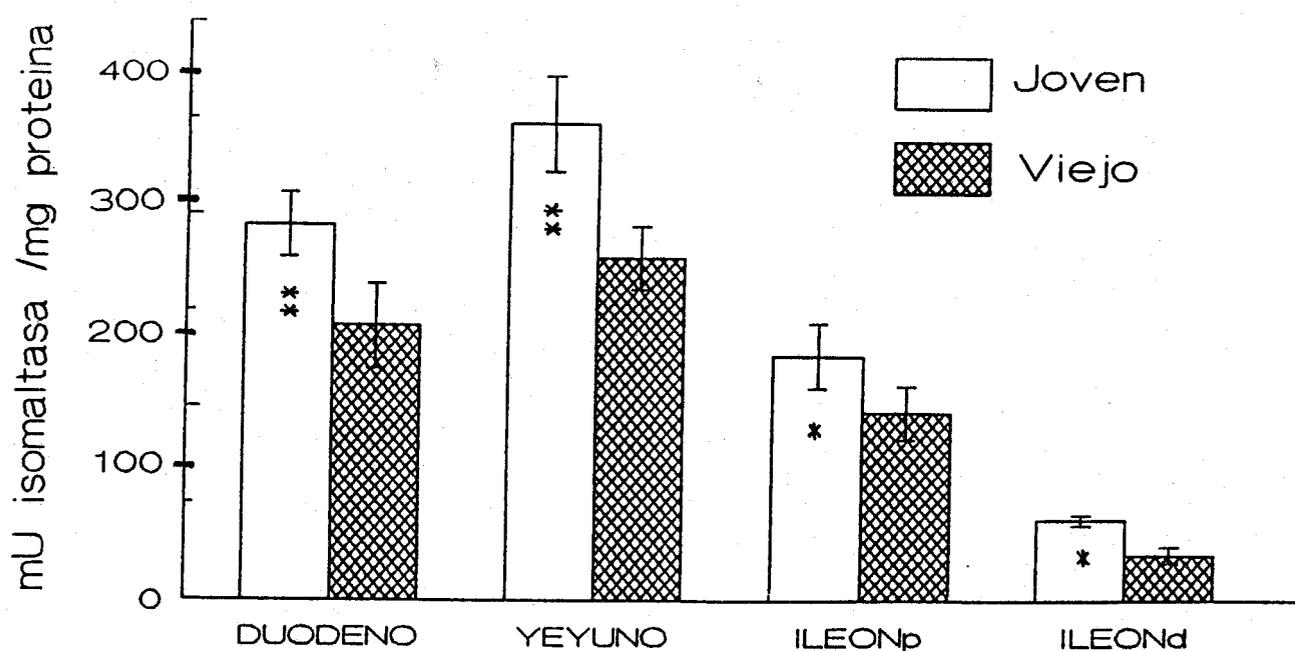
FIGURA 18. ACTIVIDAD ESPECIFICA SACARASA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS EN LOS DISTINTOS SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.



\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

FIGURA 19. ACTIVIDAD ISOMALTASA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS EN LOS DISTINTOS SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.



\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

#### IV.3. EXTRACCION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA A PARTIR DE LAS MEMBRANAS DE LAS MICROVELLOSIDADES DEL INTESTINO DELGADO.

En la Tabla X se presentan los resultados de la extracción del complejo sacarasa-isomaltasa de la membrana de las microvellosidades intestinales mediante solubilización con Triton X-114 y con papaina.

**TABLA X. EXTRACCION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA A PARTIR DE LAS MICROVELLOSIDADES INTESTINALES, MEDIANTE EL USO DE TRITON X-114 Y DE PAPAINA.**

	Peso (g)	Vol. (ml)	Proteina (mg)	Actividad	
				(mU/mg)	(mU)
Mucosa	8,5	-	-	-	-
Homogeneizado	-	85	1.092,4	470	513.428
Extracto:					
-Tritón X-114	-	79	630,0	746	469.980
-Papaina	-	81	556,0	730	405.880

n= 10

actividad del complejo medida como sacarasa.

#### **IV.4. INMUNOTITULACION.**

Con el fin de estudiar la relación actividad/cantidad de enzima, se han utilizado ratas macho de 3 meses (jóvenes) y ratas machos de 28 meses (viejas). Las inmunotitulaciones se hicieron frente a anticuerpos policlonales anti-sacarasa-isomaltasa y el anticuerpo monoclonal BBC 1-35/11/2, específico para la subunidad isomaltasa.

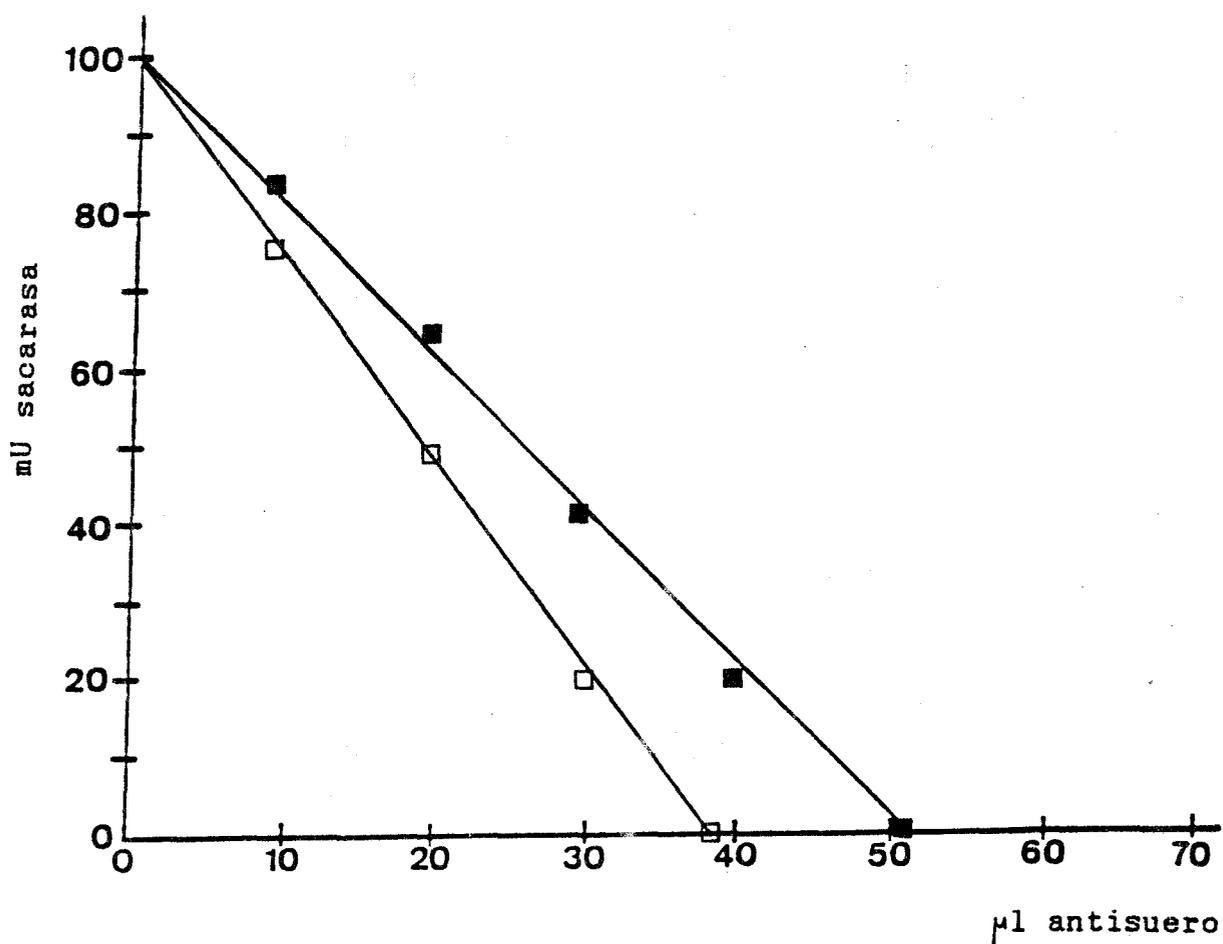
##### **IV.4.1. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD SACARASA E ISOMALTASA CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-SI.**

Como control de la inmunoprecipitación se utilizó suero pre-inmune de conejo, no observándose pérdida de actividad sacarasa, ni de isomaltasa durante la inmunotitulación con dicho suero.

La Fig. 20 muestra los resultados obtenidos para la inmunotitulación de 100 mU de actividad sacarasa en muestras de homogeneizado de mucosa intestinal de animales jóvenes y viejos, y en la Fig. 21 se recogen los relativos a 60 mU de actividad isomaltasa.

FIGURA 20. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD SACARASA EN HOMOGENEIZADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS CON LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

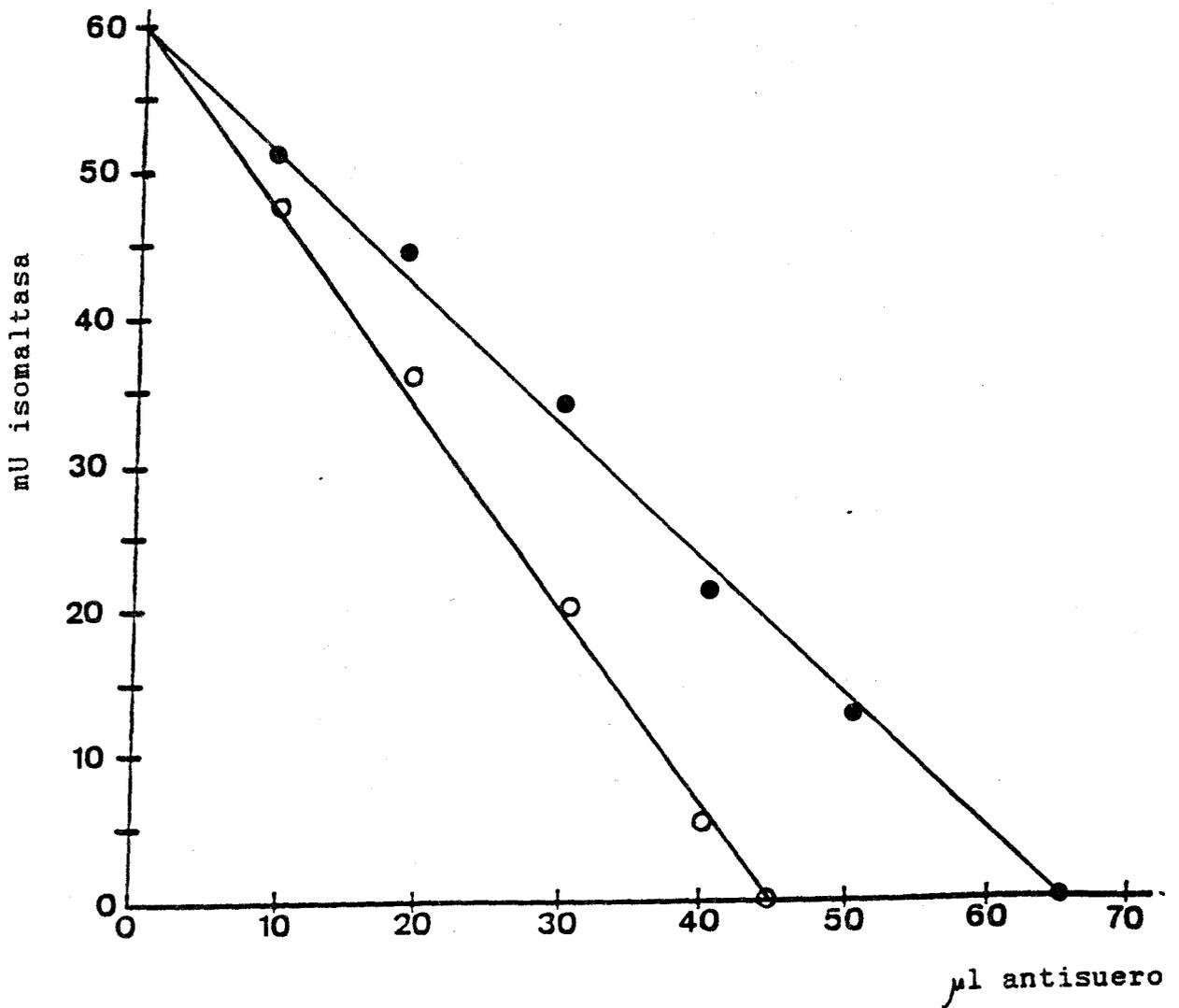
---



---

□ sacarasa joven  
■ sacarasa viejo

FIGURA 21. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD ISOMALTASA EN HOMOGENEIZADOS DE RATAS JOVENES Y VIEJAS CON LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.



○ isomaltasa joven

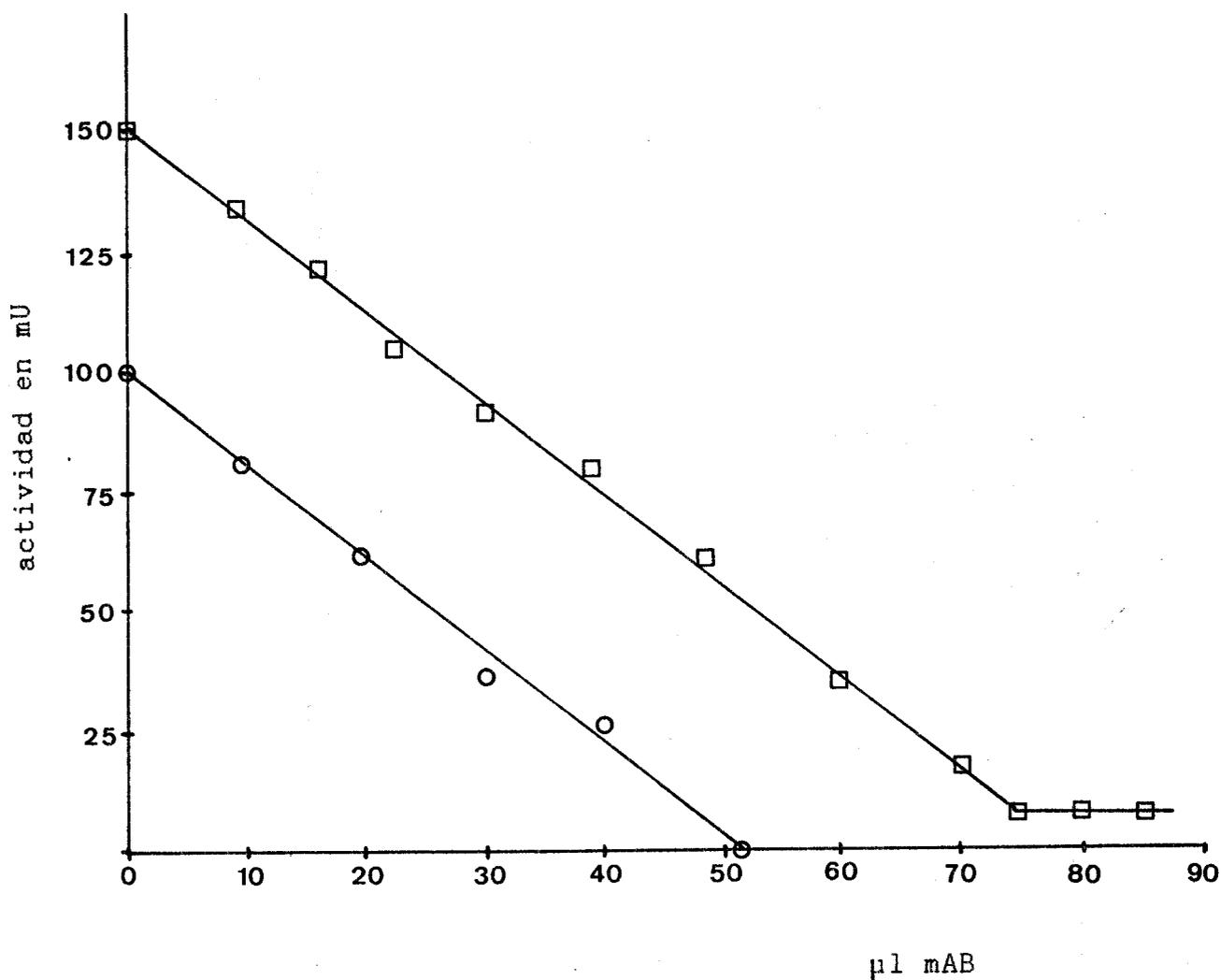
● isomaltasa viejo

#### IV.4.2. INMUNOTITULACION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL

BBC 1-35/11/2.

La Fig. 22 muestra los resultados obtenidos para la inmunotitulación de una muestra de homogeneizado de mucosa intestinal de animales jóvenes, con 150 mU de actividad sacarasa y 100 mU de actividad isomaltasa. La Fig. 23 recoge los resultados relativos a animales viejos, inmunotitulando 120 mU de actividad sacarasa y 100 mU de actividad isomaltasa. En la Fig. 24 se representa la inmunotitulación de 100 mU de actividad isomaltasa tanto en animales jóvenes como en viejos.

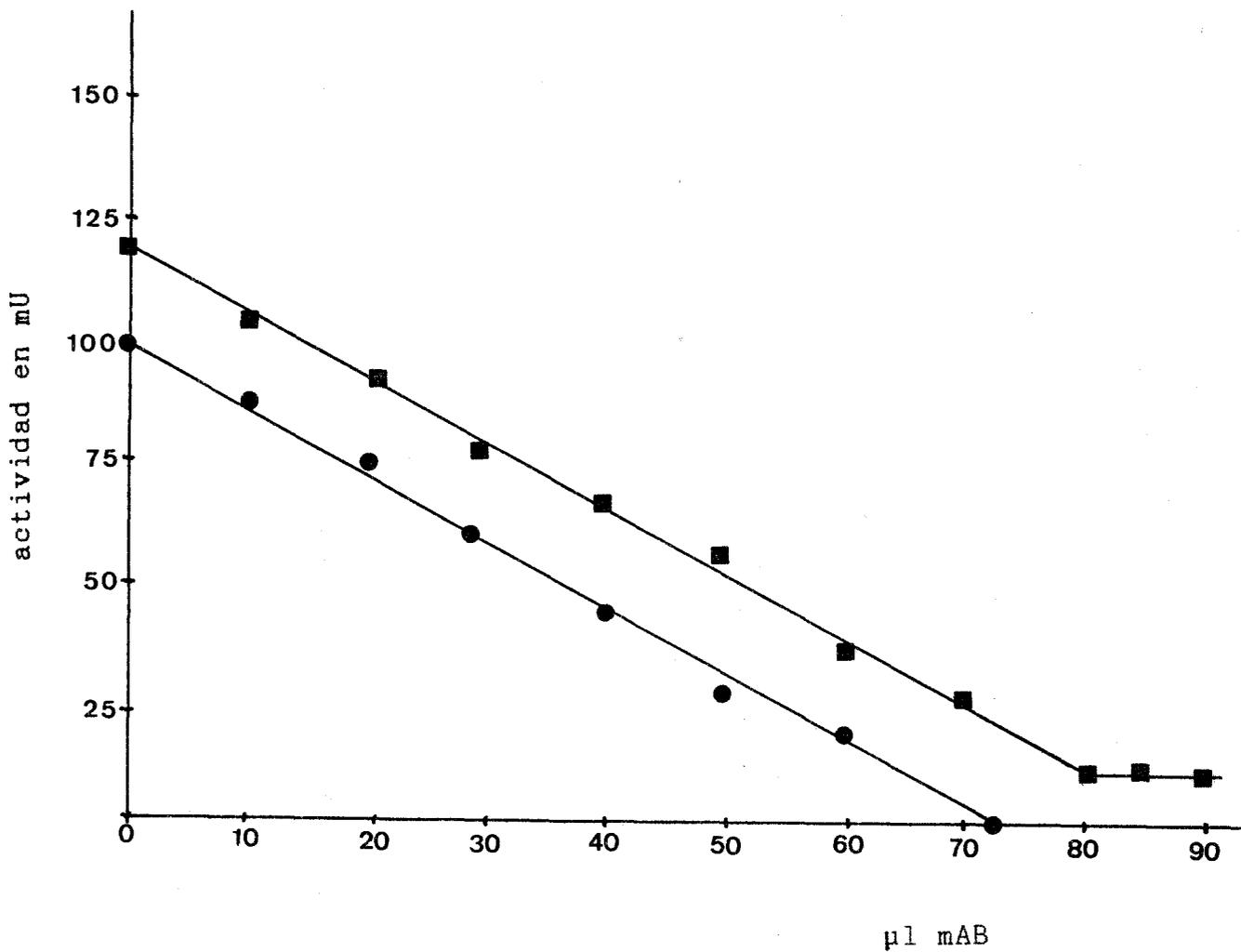
FIGURA 22. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD SACARASA E ISOMALTASA EN HOMOGENEIZADO DE RATAS JOVENES CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL BBC 1-35/11/2.



□ sacarasa joven  
○ isomaltasa joven

FIGURA 23. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD SACARASA E ISOMALTASA EN HOMOGENEIZADO DE RATAS VIEJAS CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL BBC 1-35/11/2.

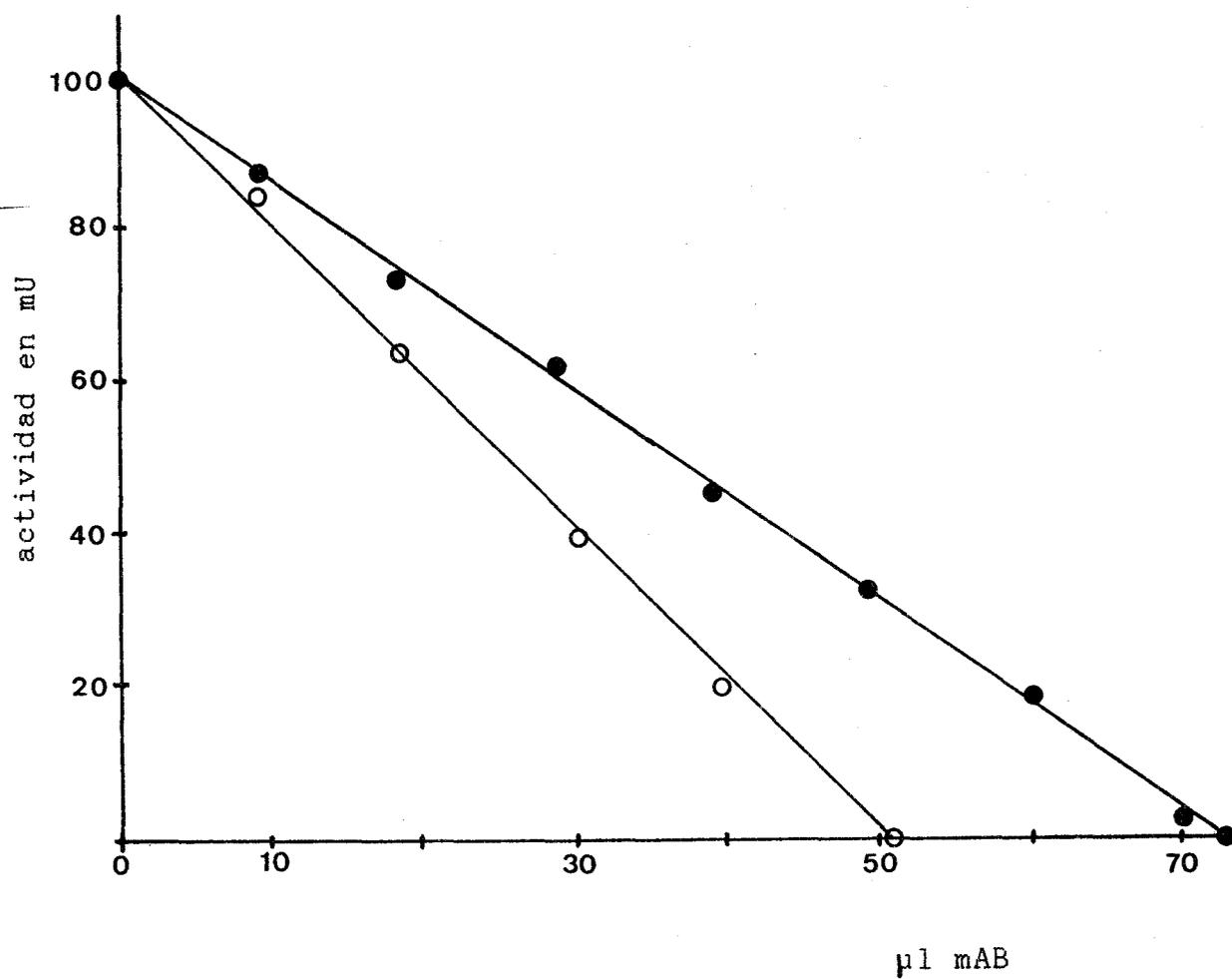
---



---

■ sacarasa viejo  
● isomaltasa viejo

FIGURA 24. INMUNOTITULACION DE LA ACTIVIDAD ISOMALTASA EN HOMOGENEIZADOS DE RATAS JOVENES Y VIEJAS CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL BBC 1-35/11/2.



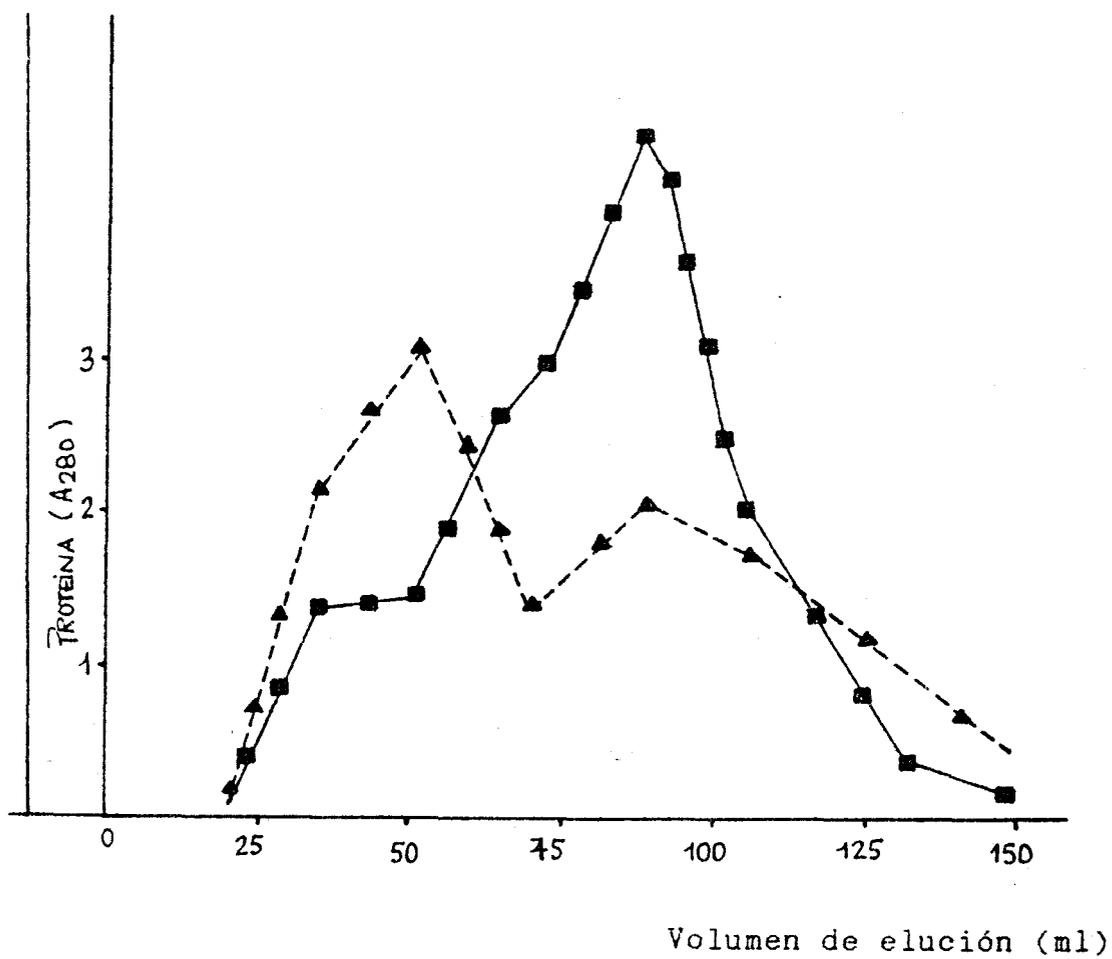
isomaltasa joven

isomaltasa viejo

#### IV.5. PURIFICACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.

El proceso de purificación del complejo sacarasa-isomaltasa mediante cromatografía en columna de Sephadex G-200, y por inmunoafinidad en columna de Sepharosa 4B queda reflejado en las Fig. 25 y 26 respectivamente, así como el rendimiento de la misma para animales jóvenes y viejos (Tabla XI).

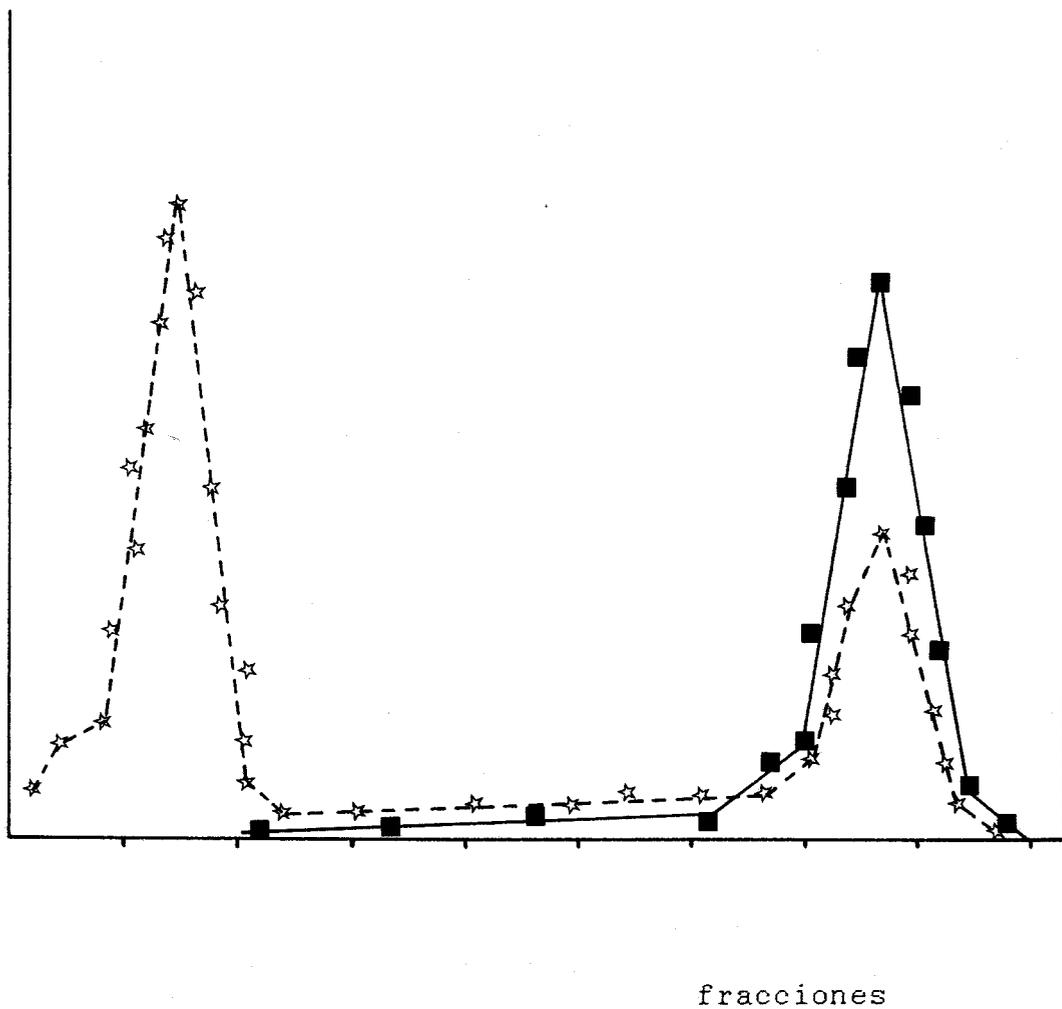
FIGURA 25. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200.



proteína

complejo sacarasa-isomaltasa

FIGURA 26. INMUNOCROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B.



☆ proteina

■ complejo sacarasa-isomaltasa

**TABLA XI. PURIFICACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

Etapa de purificación	Actividad total* (mU)		Actividad específica* (mU/mg proteína)		Recuperación (%)	
	joven	viejo	joven	viejo	joven	viejo
Homogeneizado	243432	169105	483	310	100	100
Papaina	192440	134075	749	479	79	79
Sephadex G-200	126585	86751	1565	981	52	51,3
Inmunofinidad	63049	42445	3106	1888	25,9	25,1

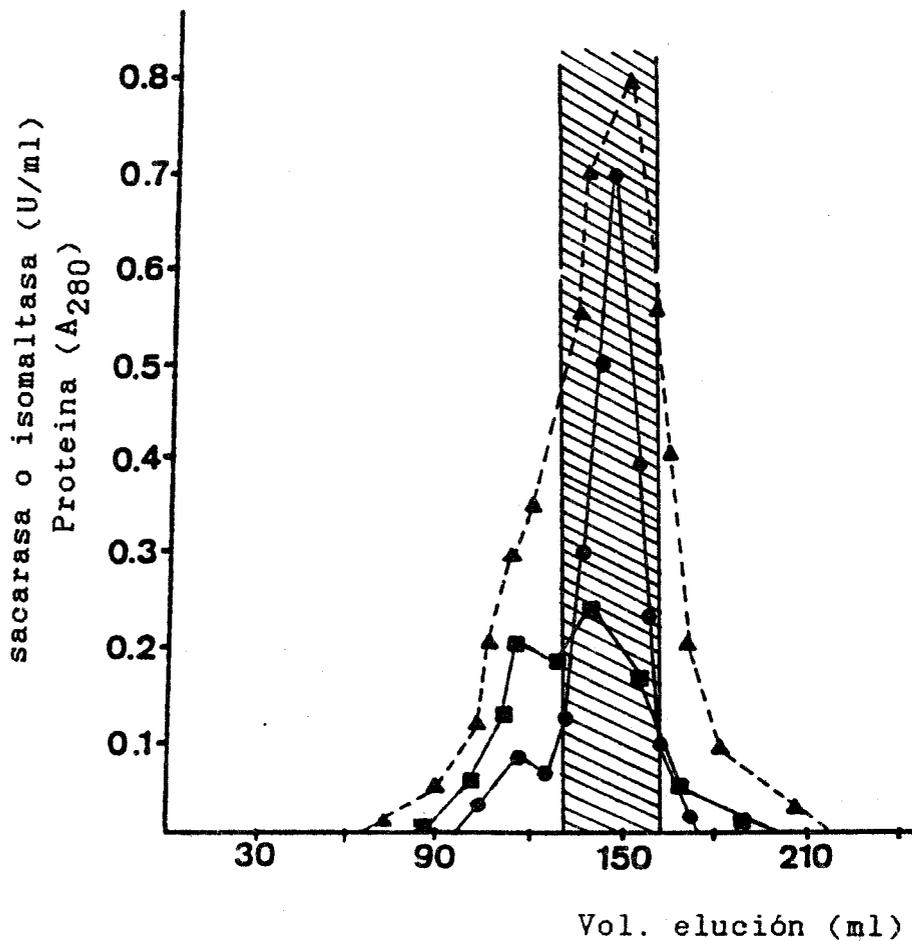
\*actividad del complejo medida como sacarasa.  
n= 5 ratas

#### IV.6. SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA MEDIANTE CITRACONILACION.

La separación de las subunidades mediante citraconilación se realizó tal y como se describe en Material y Métodos, recogándose los resultados en las Fig. 27 y 28.

La Tabla XII muestra los resultados obtenidos en el proceso de separación de las subunidades, mediante citraconilación del complejo en animales jóvenes y viejos, así como los del complejo oxidado de animales jóvenes.

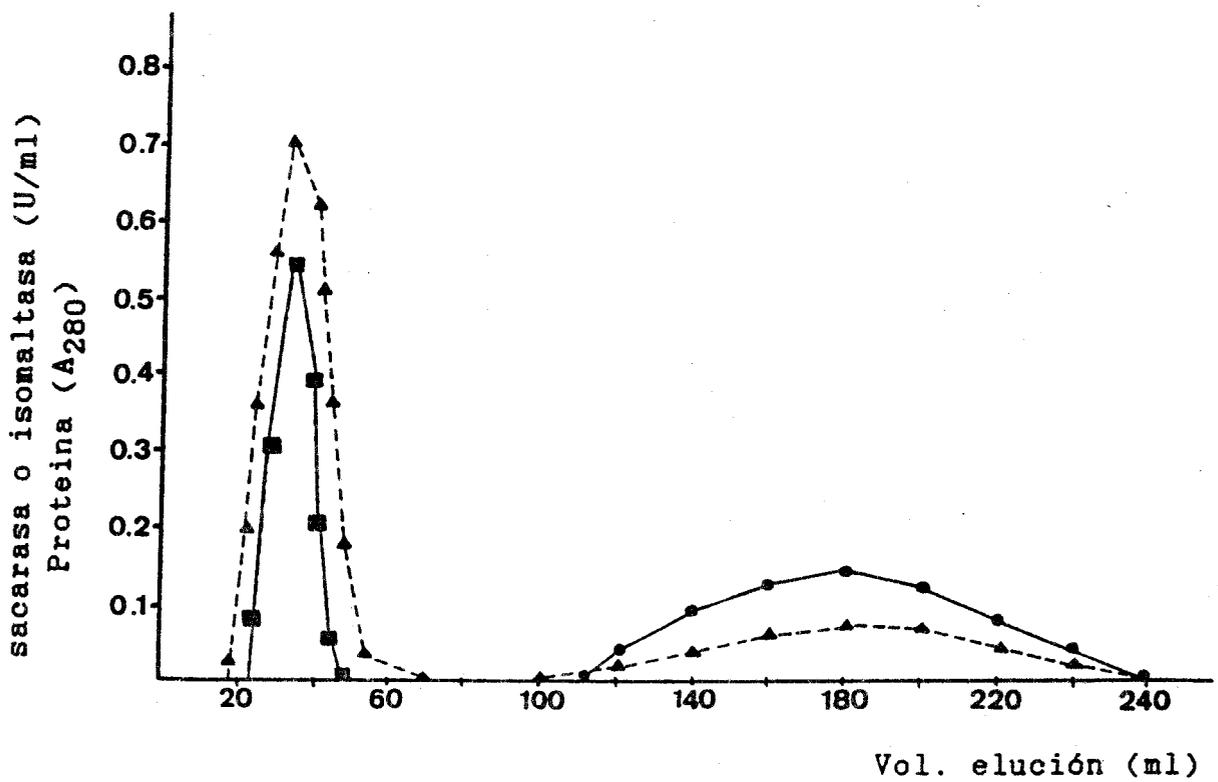
FIGURA 27. FILTRACION EN BIO-GEL P-200 DE LA MEZCLA CITRACONILADA.



- ▲ Proteina
- actividad sacarasa
- actividad isomaltasa

**FIGURA 28. SEPARACION DE LAS SUBUNIDADES CITRACONILADAS  
MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200.**

---



- 
- ▲ Proteina
  - actividad sacarasa
  - actividad isomaltasa
-

**TABLA XII. SEPARACION MEDIANTE CITRACONILACION DE LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA DEL COMPLEJO-SI DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

	Complejo-SI	Sacarasa	Isomaltasa
<b>RATAS JOVENES</b>			
- Sacarasa (*)	100%	87%	-
-Isomaltasa (**)	100%	-	94%
<b>RATAS VIEJAS</b>			
-Sacarasa (*)	100%	85%	-
-Isomaltasa (**)	100%	-	96%
<b>COMPLEJO OXIDADO</b>			
-Sacarasa (*)	100%	82%	-
-Isomaltasa (**)	100%	-	89%

(\*) Medida con sacarosa como sustrato

(\*\*) Medida con palatinosa como sustrato

El sistema de oxidación empleado ha sido el de ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub>, a temperatura ambiente y durante 180 minutos.

#### **IV.7. INACTIVACION DEL COMPLEJO-SI MEDIANTE OXIDACION CON SISTEMAS-MCO NO-ENZIMATICOS.**

Teniendo en cuenta que uno de los modelos más utilizados para la simulación *in vitro* de inactivación de las enzimas es la oxidación de ciertos restos aminoacídicos mediante sistemas-MCO se procedió al estudio de la actividad del complejo sacarasa-isomaltasa y de las subunidades separadas (en animales jóvenes) cuando se someten a este tipo de sistemas.

##### **IV.7.1. INACTIVACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA:**

Los resultados obtenidos para la inactivación del complejo sacarasa-isomaltasa, con los sistemas-MCO: Ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> y Ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub>, se expresan en la Tabla XIII.

##### **IV.7.2. INACTIVACION DE LA SUBUNIDAD SACARASA:**

En la Tabla XIV se contemplan los resultados obtenidos mediante la inactivación de la subunidad sacarasa con los sistemas-MCO: Ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> y Ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub>.

**TABLA XIII. OXIDACION DEL COMPLEJO-SI CON SISTEMAS-MCO NO ENZIMATICOS.**

	Nativo		Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>		Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
0 min.	100%	100%	100%	100%	100%	100%
30 min.	100%	100%	82%	92%	87%	96%
60 min.	98%	100%	78%	90%	85%	94%
120 min.	97%	100%	70%	88%	82%	90%
180 min.	96%	100%	70%	87%	81%	90%
5 horas	93%	98%	nd	nd	62%	73%
24 horas	83%	87%	nd	nd	40%	42%
50 horas	64%	62%	nd	nd	5%	3%

(S)= actividad sacarasa usando sacarosa como sustrato

(I)= actividad isomaltasa usando palatinosa como sustrato

**TABLA XIV. OXIDACION DE LA SUBUNIDAD SACARASA CON SISTEMAS-MCO NO-ENZIMATICOS.**

	Nativa	Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>
0 min.	100%	100%	100%
30 min.	100%	84%	87%
60 min.	98%	80%	82%
120 min.	97%	70%	78%
180 min.	98%	65%	73%
5 horas	90%	nd	62%
24 horas	80%	nd	31%
50 horas	53%	nd	0%

#### IV.7.3. INACTIVACION DE LA SUBUNIDAD ISOMALTASA:

Los resultados de la inactivación de la subunidad isomaltasa por los sistemas-MCO anteriormente utilizados para la oxidación de la subunidad sacarasa vienen reflejados en la Tabla XV.

**TABLA XV. OXIDACION DE LA SUBUNIDAD ISOMALTASA CON SISTEMAS-MCO NO-ENZIMATICOS.**

	Nativa	Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>
0 min.	100%	100%	100%
30 min.	100%	94%	96%
60 min.	98%	92%	94%
120 min.	97%	92%	94%
180 min.	97%	88%	90%
5 horas	92%	nd	81%
24 horas	82%	nd	26%
50 horas	40%	nd	0%

#### IV.8. ESTUDIO DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA MEDIANTE LA UTILIZACION DE REACTIVOS ESPECIFICOS DE AMINOACIDOS.

Con el fin de estudiar el papel de los distintos restos aminoacídicos en relación con la actividad del complejo-SI y su variación con la edad, se procedió a la titulación de los restos accesibles con reactivos específicos del complejo y sus subunidades separadas, tanto en animales jóvenes como en viejos.

Para determinar el papel que juega la oxidación de los restos aminoacídicos sobre la pérdida de actividad descrita para este complejo, se procedió a estudiar el comportamiento del complejo de joven oxidado *in vitro* mediante un sistema-MCO no-enzimático y de sus respectivas subunidades (oxidadas con el mismo sistema), frente a distintos reactivos específicos de aminoácidos.

##### IV.8.1. TITULACION DE GRUPOS -SH.

Con el fin de determinar el número de grupos -SH accesibles y su reactividad en el complejo-SI y en sus subunidades, éstos se han sometido a la acción del reactivo DTNB, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla XVI, tanto para el complejo en su forma nativa como en su forma desnaturalizada.

**TABLA XVI. VALORACION DE LOS GRUPOS -SH EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA, DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

	Número de grupos -SH por mol (1)		
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
<b>NATIVO:</b>			
Joven			
-60 min.	0.0	0.0	0.0
-120 min.	0.4±0.1	0.0	0,5±0,1
Viejo			
-60 min.	0,0	0,0	0,0
-120 min.	0,3±0,1	0,0	0,3±0,2
<b>DESNATURALIZADO:</b>			
Joven	12,8±0,7	7,3±0,4	5,1±0,6
Viejo	9,1±0,8**	5,2±0,7*	4,2±0,8*
Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	7,8±0,6*	5,3±0,4*	3,1±0,4*
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	7,5±0,7*	4,7±0,5*	3,9±0,3*

(1)= Valores medios de tres experimentos

Tiempo de reacción= 60 y 120 min. para la nativa y 120 min. para la desnaturalizada.

Desnaturalización con Clorhidrato de Guanidina 6M.

Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:

\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

#### **IV.8.2. TITULACION DE RESTOS DE LISINA.**

El estudio de los grupos amino en el complejo-SI, así como en cada una de las subunidades, se realizó mediante la titulación con el reactivo TNBS. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XVII.

En las Tablas XVIII, XIX y XX, puede observarse como varía la actividad a medida que transcurre la modificación de los restos con TNBS, para el complejo, la subunidad sacarasa citraconilada y la subunidad isomaltasa citraconilada, respectivamente.

#### **IV.8.3. TITULACION DE RESTOS DE HISTIDINA.**

En la Tabla XXI se expresan los resultados obtenidos para la titulación de grupos histidina con DEPC, tanto en el complejo como en las subunidades separadas.

En las Tablas XXII, XXIII y XXIV, puede apreciarse la variación en la actividad producida por modificación de los restos de histidina en el complejo sacarasa-isomaltasa y en sus subunidades separadas, tanto en el complejo-SI de joven como en el de viejo y en el complejo oxidado de animales jóvenes.

**TABLA XVII. VALORACION DE GRUPOS AMINOS EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA CITRACONILADAS, DE INTestino DELGADO DE RATA.**

	Número de grupos aminos por mol (1)		
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
Joven	42,2±2,7	25,4±1,6	28,0±2,9
Viejo	40,8±3,1	21,0±2,0*	24,1±2,1
Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	36,2±1,4*	17,3±2,4*	23,4±2,1*
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	37,4±2,3*	16,9±0,9*	23,1±2,5*

(1)= Valores medios de tres experimentos.

Tiempo de reacción= 120 min.

Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:

\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

**TABLA XVIII. ACTIVIDAD REMANENTE DEL COMPLEJO-SI TRAS SU MODIFICACION CON TNBS.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes		Viejos		Oxidado	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2,1	96%	96%	98%	100%	-	-
2,2	-	-	-	-	98%	100%
5,0	85%	91%	87%	95%	-	-
5,1	-	-	-	-	83%	94%
7,1	46%	52%	42%	43%	44%	50%
20,0	15%	23%	18%	16%	23%	25%
35,8	-	-	-	-	5%	3%
40,2	7%	3%	6%	4%	-	-

**TABLA XIX. ACTIVIDAD REMANENTE DE LA SUBUNIDAD SACARASA TRAS SU MODIFICACION CON TNBS.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes	Viejos	Oxidado
0	100%	100%	100%
2,2	85%	86%	83%
5,0	63%	62%	-
5,2	-	-	60%
7,1	34%	27%	23%
10,0	5%	4%	2%
20,2	0%	0%	0%

**TABLA XX. ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD ISOMALTASA TRAS SU MODIFICACION CON TNBS.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes	Viejos	Oxidado
0	100%	100%	100%
2,1	94%	97%	96%
2,3	-	-	96%
5,0	57%	56%	-
5,1	-	-	52%
7,1	23%	20%	22%
10,0	2%	4%	0%
20,0	0%	0%	0%

**TABLA XXI. VALORACION DE LOS GRUPOS HISTIDINA EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA CITRACONILADAS, DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

	Número de grupos histidina por mol (1)		
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
Joven	18,2±0,5	14,2±0,5	12,3±0,3
Viejo	16,7±0,4*	10,4±0,3**	12,0±0,4
Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	15,2±0,6*	9,2±0,4**	8,3±0,5**
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	15,0±0,5*	8,0±0,8**	10,4±0,3*

(1)= Valores medios de tres experimentos  
 Tiempo de reacción= 120 min.  
 Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:  
 \*  $p \leq 0,05$   
 \*\*  $p \leq 0,001$

**TABLA XXII. ACTIVIDAD REMANENTE DEL COMPLEJO-SI TRAS SU MODIFICACION CON DEPC.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes		Viejos		Oxidado	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1,1	97%	100%	-	-	-	-
1,3	-	-	92%	100%	90%	98%
3,1	-	-	74%	95%	-	-
3,2	75%	96%	-	-	72%	75%
5,1	40%	43%	42%	40%	-	-
5,2	-	-	-	-	38%	27%
7,1	15%	16%	-	-	-	-
7,2	-	-	19%	18%	9%	6%
11,0	12%	8%	-	-	-	-
15,1	2%	0%	3%	4%	0%	0%

**TABLA XXIII. ACTIVIDAD REMANENTE DE LA SUBUNIDAD SACARASA  
 TRAS SU MODIFICACION CON DEPC.**

Nº grupos modificados	Jóvenes	Viejos	Oxidado
0	100%	100%	100%
1,3	96%	94%	90%
3,3	43%	42%	-
3,4	-	-	39%
4,7	-	-	18%
4,8	28%	20%	-
6,2	-	8%	4%
9,7	5%	-	-

**TABLA XXIV. ACTIVIDAD REMANENTE DE LA SUBUNIDAD ISOMALTASA TRÁS SU MODIFICACION CON DEPC.**

Nº grupos modificados	Jóvenes	Viejos	Oxidado
0	100%	100%	100%
1,2	99%	-	97%
1,3	-	100%	-
2,2	-	77%	85%
2,4	76%	-	-
3,8	-	-	36%
4,2	-	27%	-
4,7	23%	-	-
5,1	16%	-	12%
10,3	8%	4%	6%

#### **IV.8.4. TITULACION DE RESTOS DE ARGININA.**

Los resultados obtenidos en el estudio de los restos de arginina con el p-NPG en el complejo-SI y en sus subunidades separadas, quedan reflejados en la Tabla XXV.

Las variaciones de actividad encontrada a medida que se produce la modificación de los restos arginina se muestra en la Tabla XXVI.

Debido a la estabilidad frente a la modificación de este tipo de restos no se ha procedido a su estudio en las subunidades separadas.

#### **IV.8.5. TITULACION DE RESTOS DE METIONINA.**

Los restos de metionina se modificaron con cloramina-T. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XXVII. La Tabla XXVIII expresa la actividad remanente según el número de grupos metionina modificados.

**TABLA XXV. VALORACION DE LOS GRUPOS ARGININA EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA CITRACONILADAS, DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

	Número de grupos argininas por mol (1)		
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
Joven	39±1,7	18,7±1,6	15,0±0,9
Viejo	40±1,9	17,6±1,3	15,3±0,8
Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	37±1,2	16,7±1,7	15,3±1,3
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	36±0,9*	16,1±0,4*	16,0±0,9

(1)= Valores medios de tres experimentos

Tiempo de reacción= 120 min.

Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:

\*  $p \leq 0,05$

**TABLA XXVI. ACTIVIDAD REMANENTE DEL COMPLEJO-SI TRAS SU MODIFICACION CON p-NPG.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes		Viejos		Oxidado	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
5,2	99%	100%	100%	99%	100%	100%
8,3	97%	100%	100%	100%	100%	100%
14,2	-	-	-	-	80%	87%
16,1	77%	85%	72%	86%	-	-
28,0	60%	53%	62%	56%	45%	43%
42,0	33%	29%	33%	26%	27%	30%

**TABLA XXVII. VALORACION DE LOS GRUPOS METIONINA EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA CITRACONILADAS, DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

Número de grupos metionina por mol (1)			
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
Joven	8,2±1,7	6,7±0,6	5,0±0,9
Viejo	8,1±1,9	5,6±1,3	5,3±0,8
Ascórb./Cu(II)/O <sub>2</sub>	5,0±1,2*	4,7±1,7	4,3±1,3
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	6,0±0,9	4,3±0,4*	4,0±0,9

(1)= Valores medios de tres experimentos

Tiempo de reacción= 120 min.

Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:

\*  $p \leq 0,05$

**TABLA XXVIII. ACTIVIDAD REMANENTE DEL COMPLEJO-SI TRAS SU MODIFICACION CON CLORAMINA-T.**

N <sup>o</sup> grupos modificados	Jóvenes		Viejos		Oxidado	
	(S)	(I)	(S)	(I)	(S)	(I)
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2,2	100%	100%	100%	100%	-	-
2,3	-	-	-	-	100%	100%
3,1	92%	100%	94%	100%	80%	83%
4,2	86%	92%	83%	90%	-	-
5,4	-	-	-	-	63%	70%
8,1	-	-	33%	40%	-	-
8,2	23%	35%	-	-	-	-

#### **IV.9. ESTUDIO DEL ESTADO DE OXIDACION DEL COMPLEJO-SI DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS.**

De los resultados obtenidos en la titulación con reactivos específicos, se observa que para la titulación de restos de histidina y lisina, se obtienen diferencias estadísticamente significativas, bien en el complejo-SI o bien en alguna de las subunidades por separado, y teniendo en cuenta que las modificaciones oxidativas de los restos aminoacídicos de las proteínas tienen lugar, entre otros motivos, por la oxidación de restos de lisina, histidina, arginina y prolina fundamentalmente, se procedió a la titulación de grupos carbonilos en el complejo sacarasa-isomaltasa y en las subunidades separadas.

##### **IV.9.1. TITULACION DE LOS GRUPOS CARBONILOS.**

Los resultados obtenidos de la titulación de grupos carbonilos del complejo en animales jóvenes, viejos y en el complejo oxidado de animales jóvenes, se recogen en la Tabla XXIX.

La Fig. 29 muestra la evolución del contenido en grupos carbonilos del complejo-SI con la edad.

**TABLA XXIX. VALORACION DE LOS GRUPOS CARBONILOS EN EL COMPLEJO-SI Y EN LAS SUBUNIDADES SACARASA E ISOMALTASA CITRACONILADAS, DE INTESTINO DELGADO DE RATA.**

	Número de grupos carbonilos por mol (1)		
	Complejo-SI	Subunidad-S	Subunidad-I
Joven	12,2±0,7	7,7±0,5	6,2±0,3
Viejo	16,4±1,5*	9,2±0,7*	8,4±0,2**
Ascórb./Fe(III)/O <sub>2</sub>	17,8±1,6*	10,3±0,8*	9,2±0,6**

(1)= Valores medios de tres experimentos

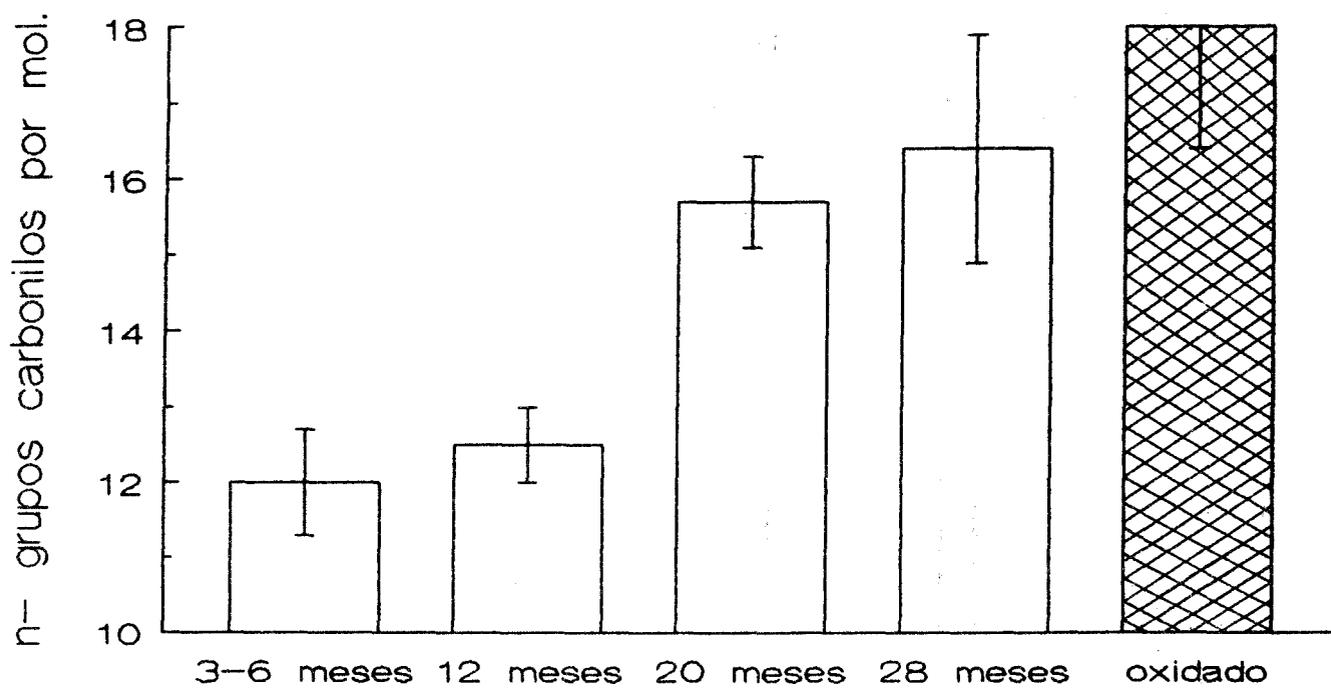
Tiempo de reacción= 120 min.

Significación estadística con relación a los valores de jóvenes:

\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

FIGURA 29. EVOLUCION EN EL CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILOS, DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA, CON LA EDAD.



\*  $p \leq 0,05$

\*\*  $p \leq 0,001$

#### IV.10. ESTADO DE OXIDACION DE LAS PROTEINAS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.

Hemos visto que el complejo sacarasa-isomaltasa de ratas viejas presenta un mayor contenido de grupos carbonilos -lo que sugiere un mayor grado de oxidación- que el complejo sacarasa-isomaltasa de ratas jóvenes. Con el fin de determinar si esto es cierto sólo para el complejo-SI o se produce también en otras proteínas del intestino delgado, se realizan determinaciones de los grupos carbonilos en homogeneizados de la mucosa del intestino delgado de ratas de diferentes edades, mostrándose los resultados obtenidos en la Fig. 30.

#### **IV.11. ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EL INTESTINO DELGADO.**

La actividad proteolítica en el intestino se ha medido tanto para la actividad proteolítica de origen pancreático como para la actividad proteolítica propia del intestino, localizada sobre la mucosa.

##### **IV.11.1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA PANCREATICA.**

La actividad proteolítica de origen pancreático se ha medido en el jugo intestinal (lavado del intestino), en ratas de diferentes edades (3, 9, 12, 24 y 28 meses). Los resultados se muestran en la Fig. 31.

##### **IV.11.2. ACTIVIDAD PROTEOLITICA INTESTINAL**

La actividad proteolítica de origen intestinal se ha medido a pH 5,5 (actividad proteolítica ácida) y a pH 8,8 (actividad proteolítica alcalina), tal como se describe en Material y Métodos, en ratas de diferentes edades (3, 9, 12, 18, 24 y 28 meses). Esta actividad proteolítica intestinal es la que existe, al margen de las proteasas pancreáticas, en la propia mucosa intestinal. La Fig.32 muestra los resultados obtenidos.

FIGURA 31. ACTIVIDAD PROTEOLITICA PANCREATICA EN EL INTESTINO DELGADO DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

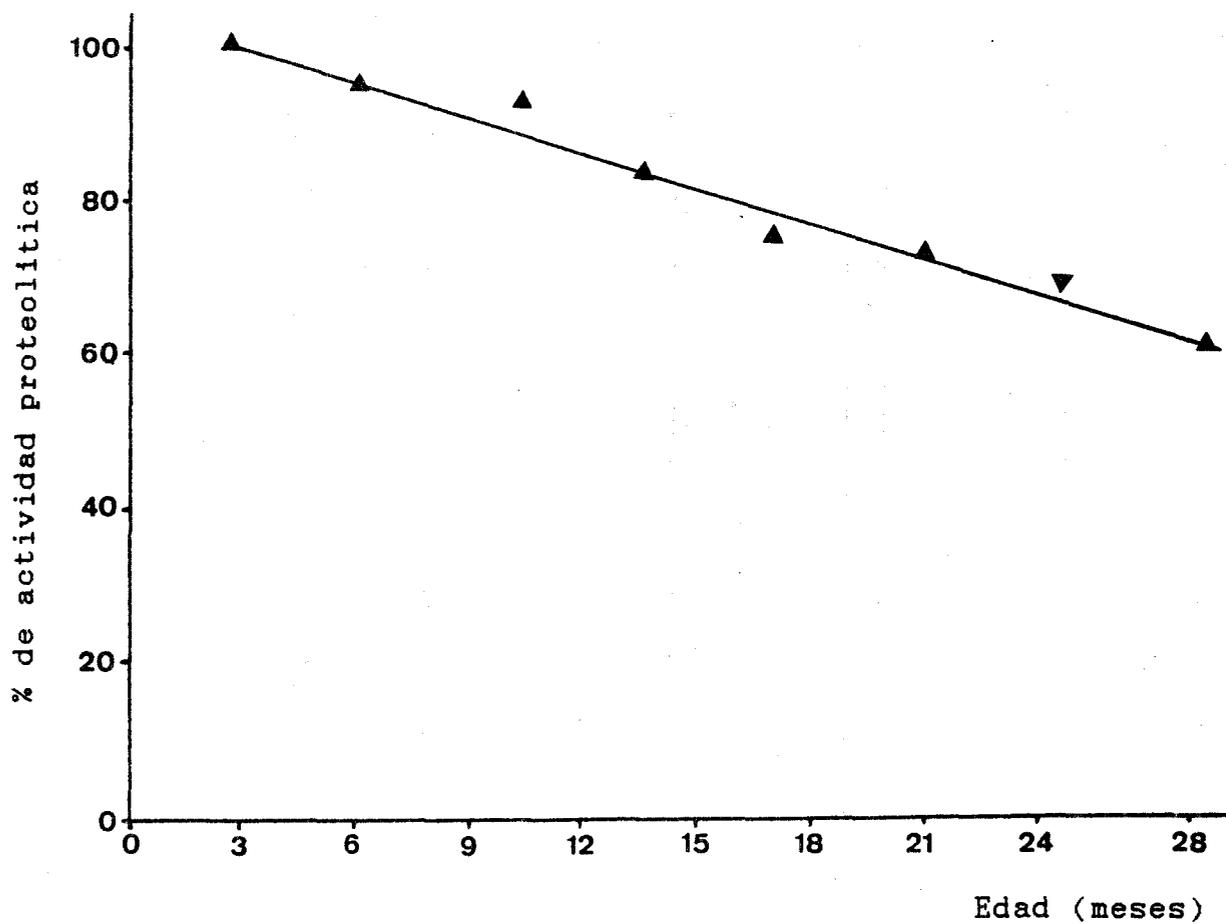
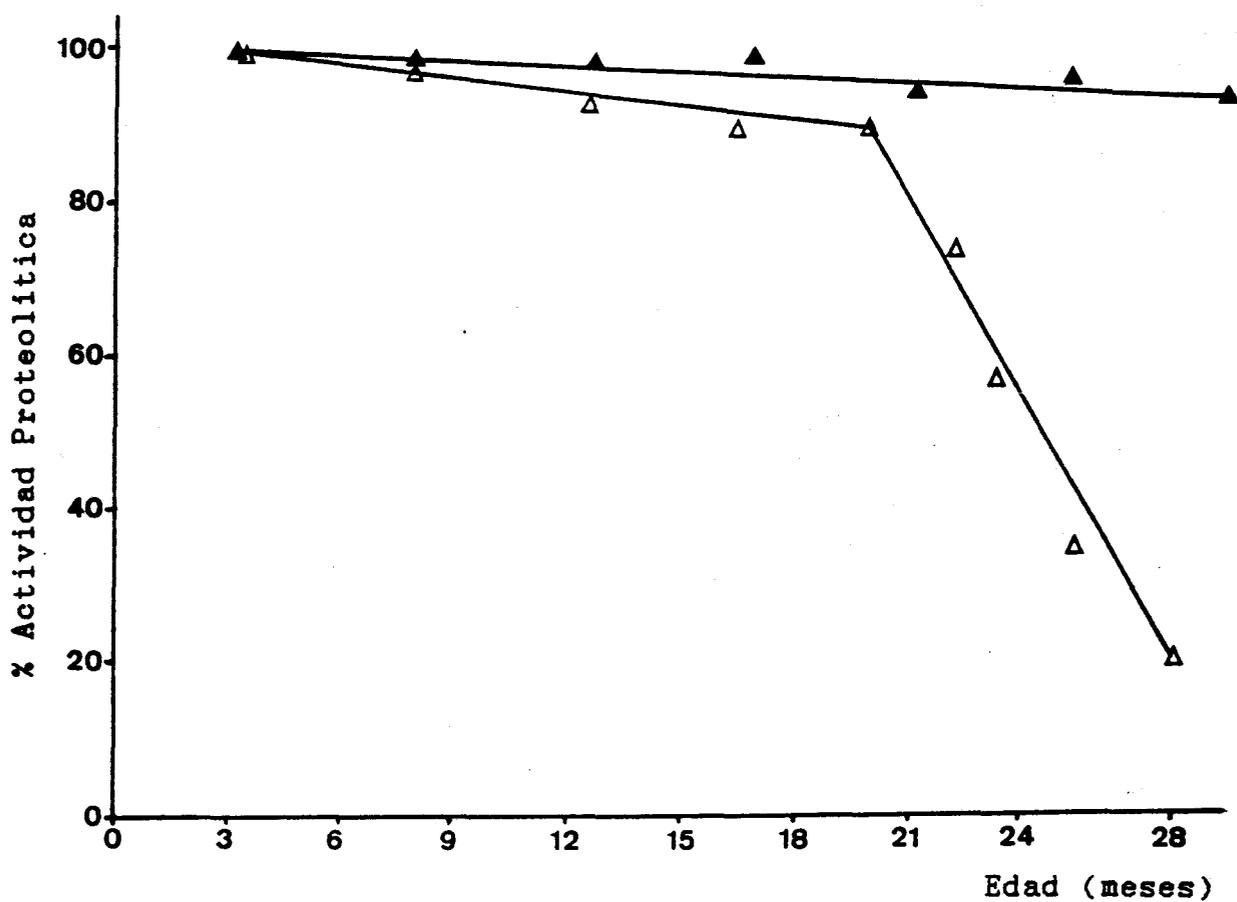


FIGURA 32. ACTIVIDAD PROTEOLITICA INTESTINAL ACIDA Y ALCALINA DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.



▲ actividad proteolítica intestinal ácida (pH 5,5)

△ actividad proteolítica intestinal alcalina (pH 8,8)

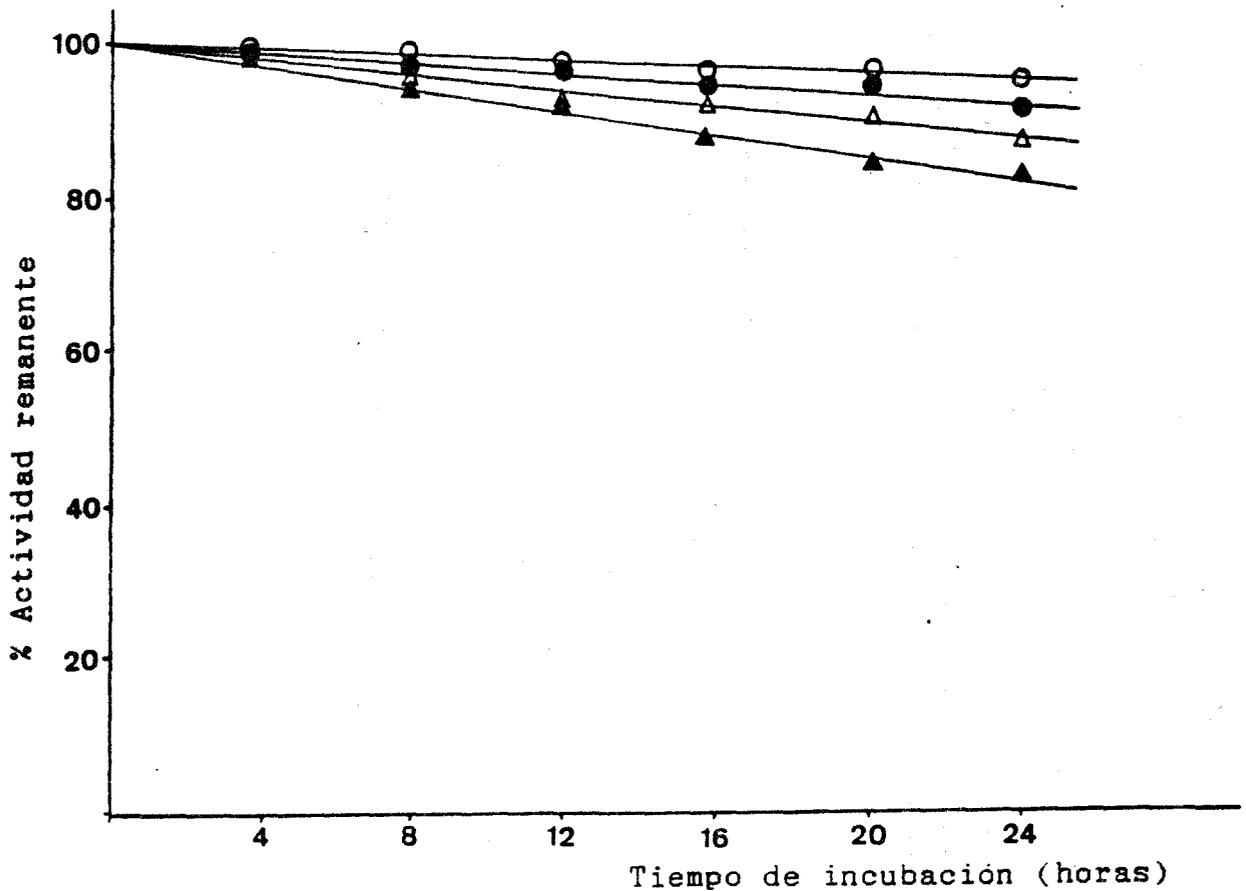
#### IV.12. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA FRENTE A PROTEASAS PACREATICAS.

La estabilidad frente a proteasas pancreáticas se ha estudiado en homogeneizados de mucosa (complejo sacarasa-isomaltasa unido a membrana) y en el complejo sacarasa-isomaltasa purificado.

En la Fig. 33 se representa la actividad del complejo-SI, de joven y viejo, unido a membrana, cuando se somete a un tratamiento con proteasas pancreáticas, a concentraciones bajas similares a las encontradas *in vivo*.

El tratamiento con proteasas pancreáticas a concentraciones relativamente altas, superiores a las encontradas *in vivo*, se realizó en el homogeneizado de mucosa de jóvenes y viejos (Fig.34); en el complejo purificado (Fig.35) de jóvenes y viejos y en el complejo oxidado de joven, tanto en homogeneizado de mucosa como en el purificado (Fig.36).

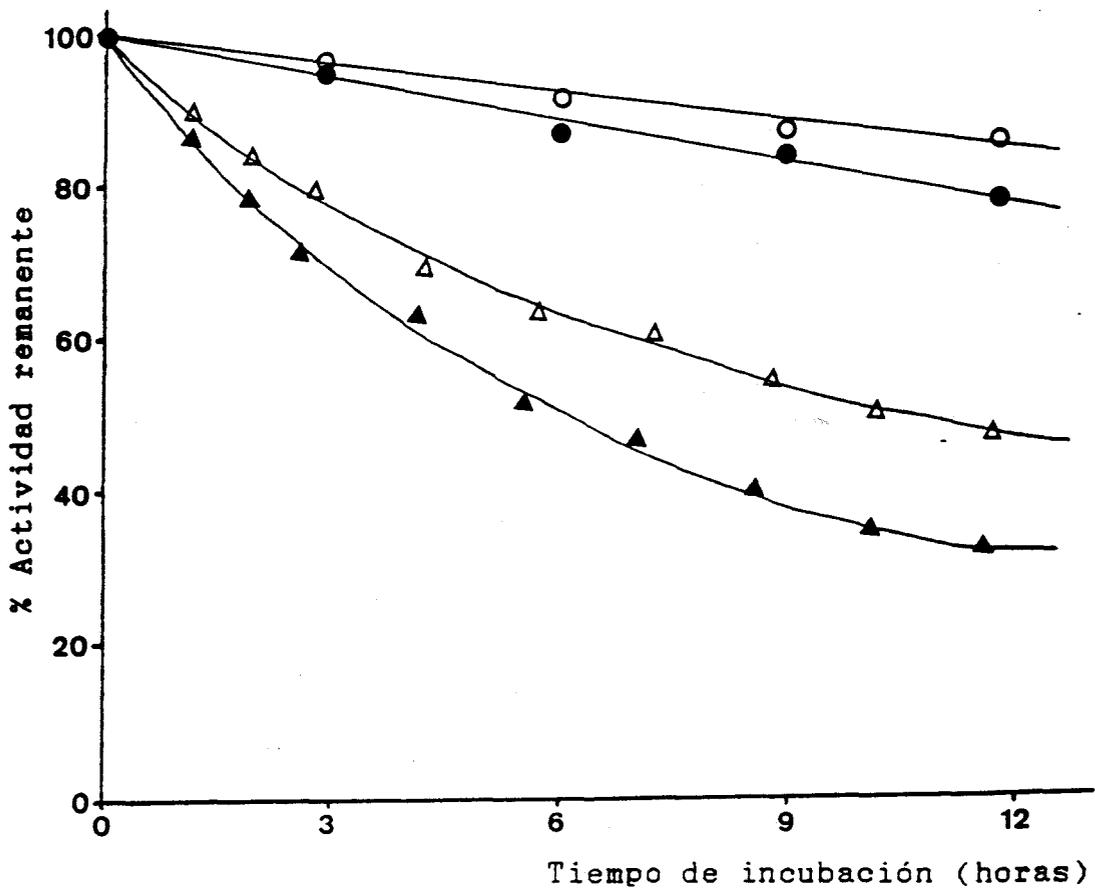
FIGURA 33. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA AL TRATAMIENTO CON TRIPSINA A CONCENTRACIONES SIMILARES A LAS FIDIOLOGICAS EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA, DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS.



jóvenes:  
 Δ actividad sacarasa  
 O actividad isomaltasa

viejos:  
 ▲ actividad sacarasa  
 ● actividad isomaltasa

FIGURA 34. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA AL TRATAMIENTO CON TRIPSINA A ALTAS CONCENTRACIONES EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA, DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS.



jóvenes:

Δ actividad sacarasa  
○ actividad isomaltasa

viejos:

▲ actividad sacarasa  
● actividad isomaltasa

FIGURA 35. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA PURIFICADO DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS, AL TRATAMIENTO CON TRIPSINA A ALTAS CONCENTRACIONES.

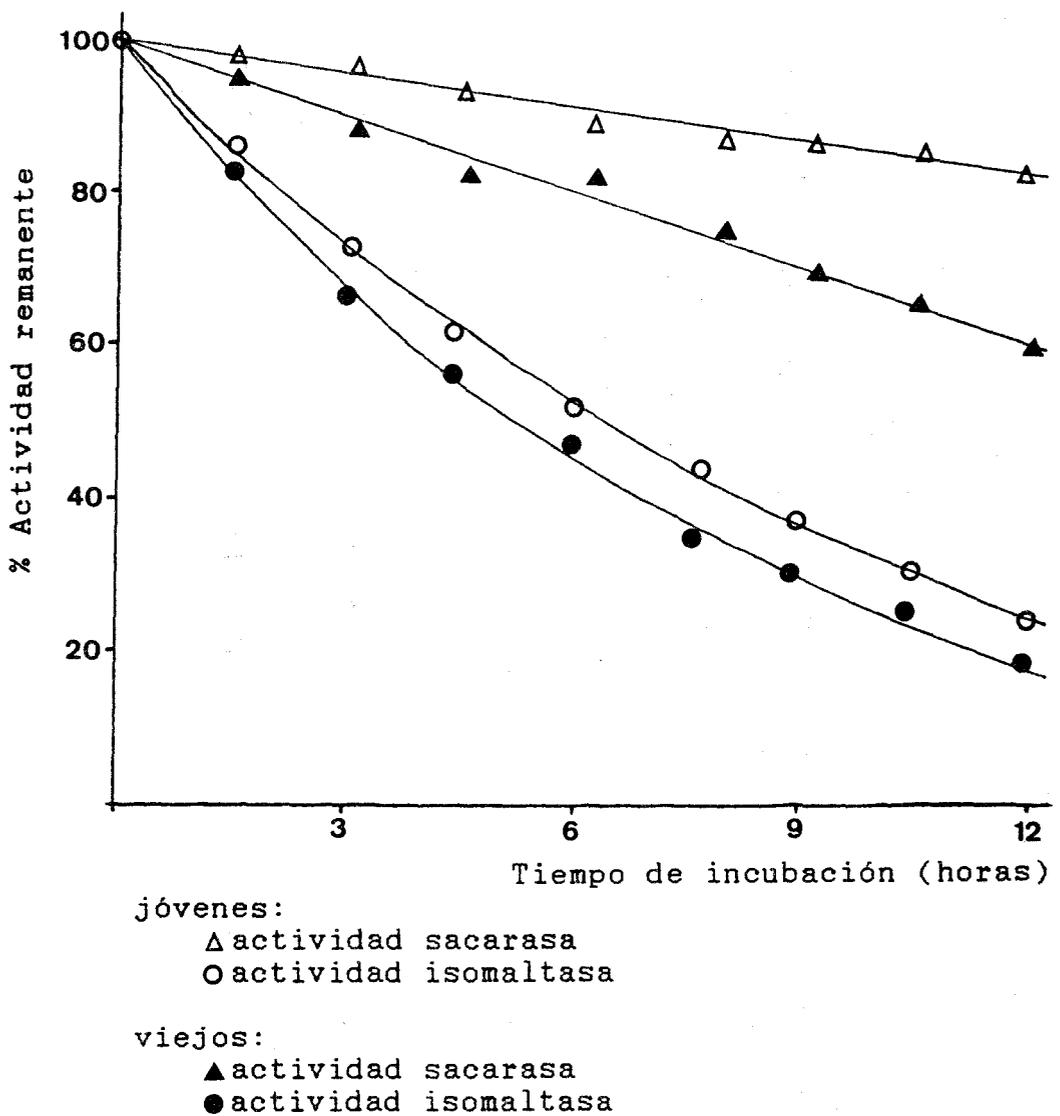
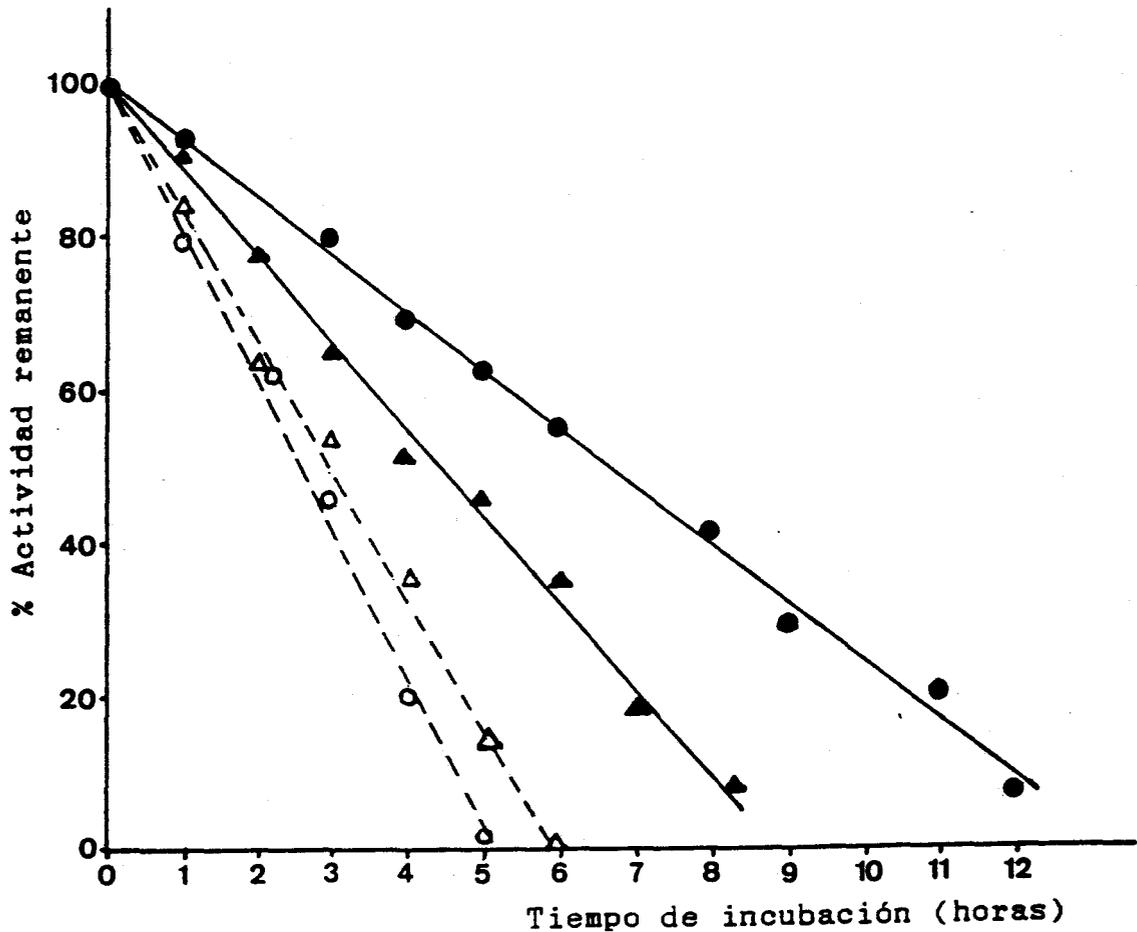


FIGURA 36. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA OXIDADO AL TRATAMIENTO CON TRIPSINA A ALTAS CONCENTRACIONES EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA.



Homogeneizado de mucosa:

- actividad isomaltasa
- ▲ actividad sacarasa

Purificado:

- actividad isomaltasa
- △ actividad sacarasa

#### IV.13. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO-SI FRENTE A LAS PROTEASAS INTESTINALES.

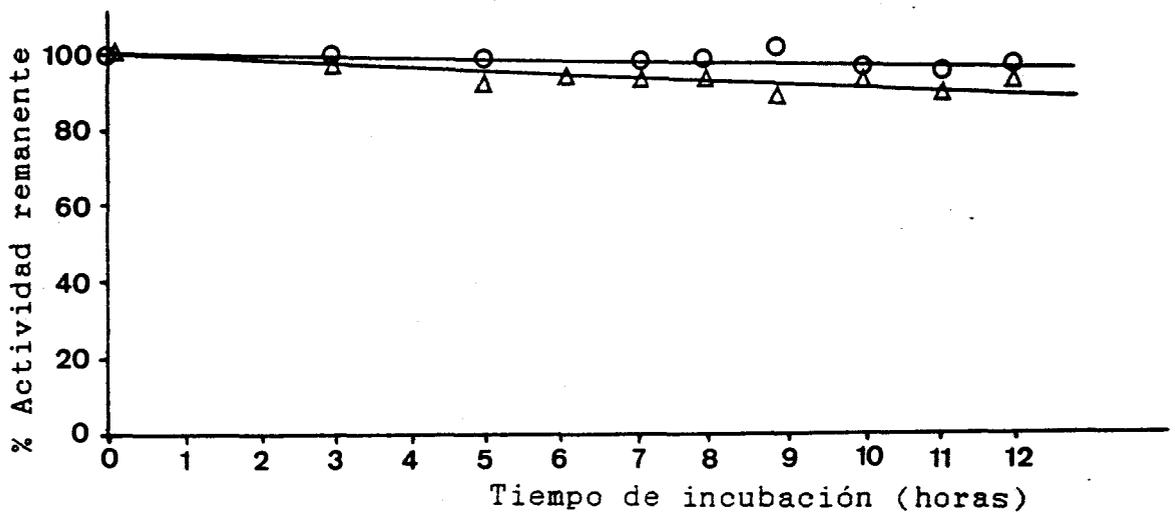
Este estudio se ha realizado con el complejo-SI unido a membrana y con el complejo-SI purificado.

La sensibilidad del complejo-SI unido a membrana frente a las proteasas alcalinas intestinales se ha estudiado para el complejo-SI de animales jóvenes y viejos, así como para el complejo oxidado (durante 3 horas con el sistema-MCO: Fe(III)/Ascorbato/O<sub>2</sub>, tal como se describe en Material y Métodos). Los resultados obtenidos se reflejan en las Fig.37, 38 y 39 (se considera que la actividad inicial de la mezcla a tiempo cero es del 100%).

La sensibilidad del complejo purificado se ha estudiado tanto en animales jóvenes como en animales viejos y en complejo oxidado de jóvenes. Los resultados se muestran en las Fig.40, 41 y 42.

FIGURA 37. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA A PROTEASAS INTESTINALES EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA DE ANIMALES JOVENES.

---



Δ actividad sacarasa  
○ actividad isomaltasa

---

FIGURA 38. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA A PROTEASAS INTESTINALES EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA DE ANIMALES VIEJOS.

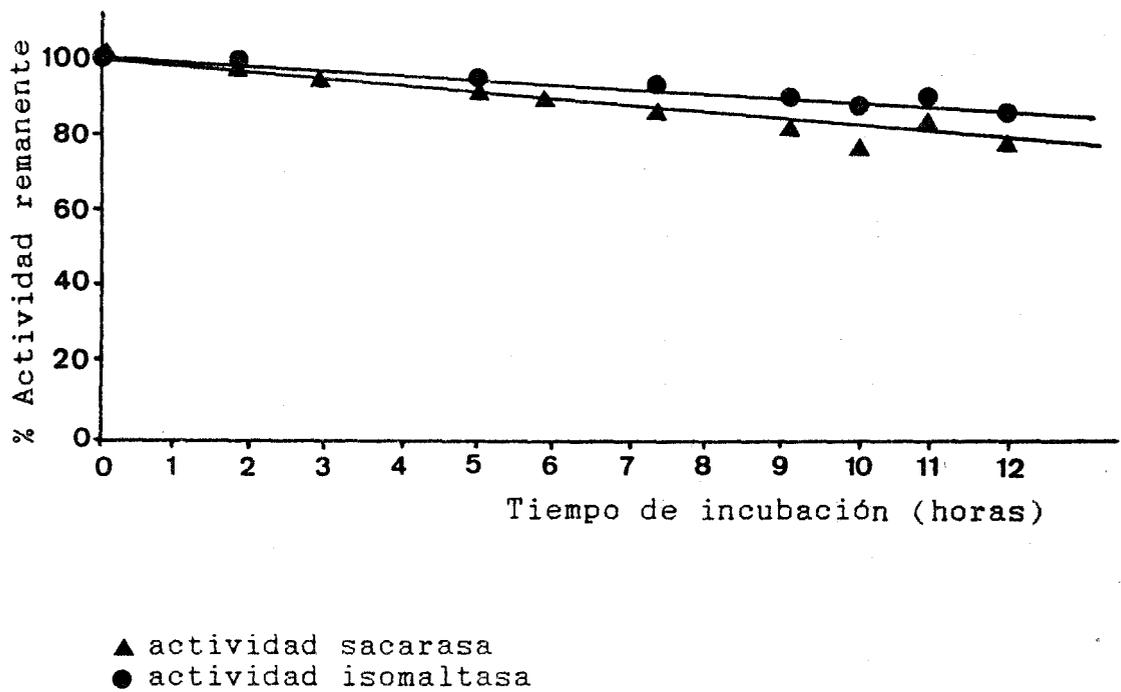


FIGURA 39. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA OXIDADO A PROTEASAS INTESTINALES EN HOMOGENEIZADO DE MUCOSA.

---

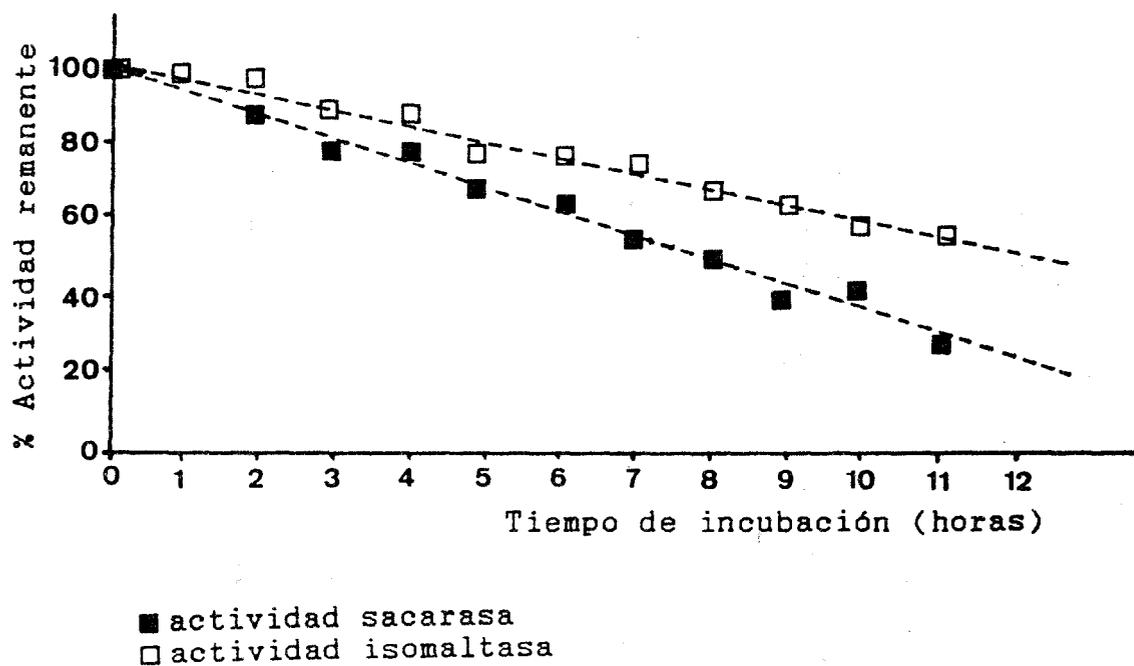
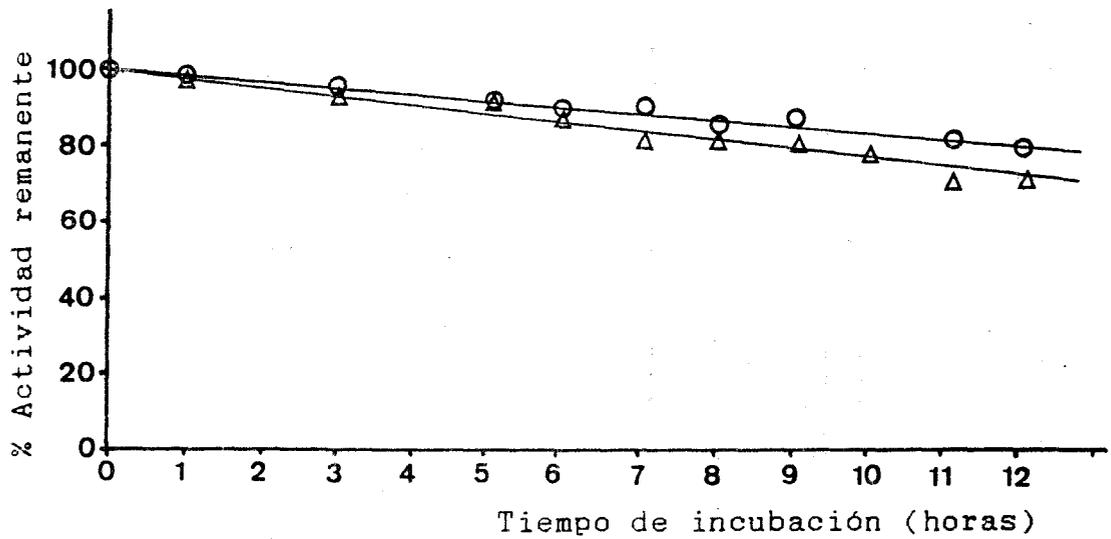


FIGURA 40. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA PURIFICADO DE ANIMALES JOVENES FRENTE A PROTEASAS INTESTINALES.

---



△ actividad sacarasa  
○ actividad isomaltasa

---

FIGURA 41. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA PURIFICADO DE ANIMALES VIEJOS FRENTE A PROTEASAS INTESTINALES.

---

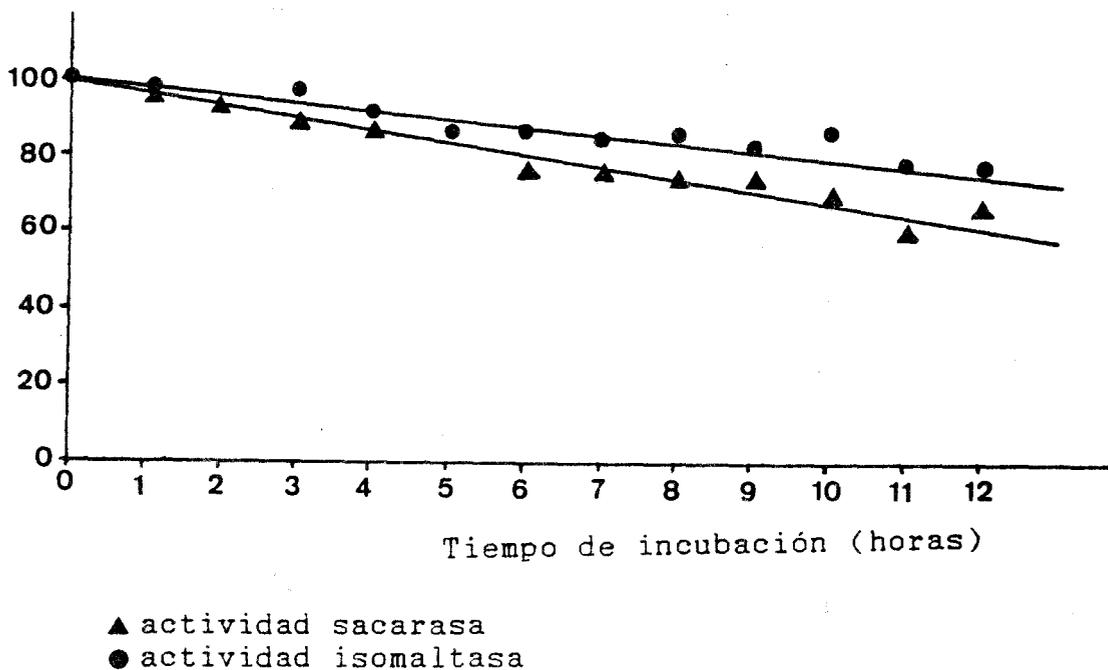
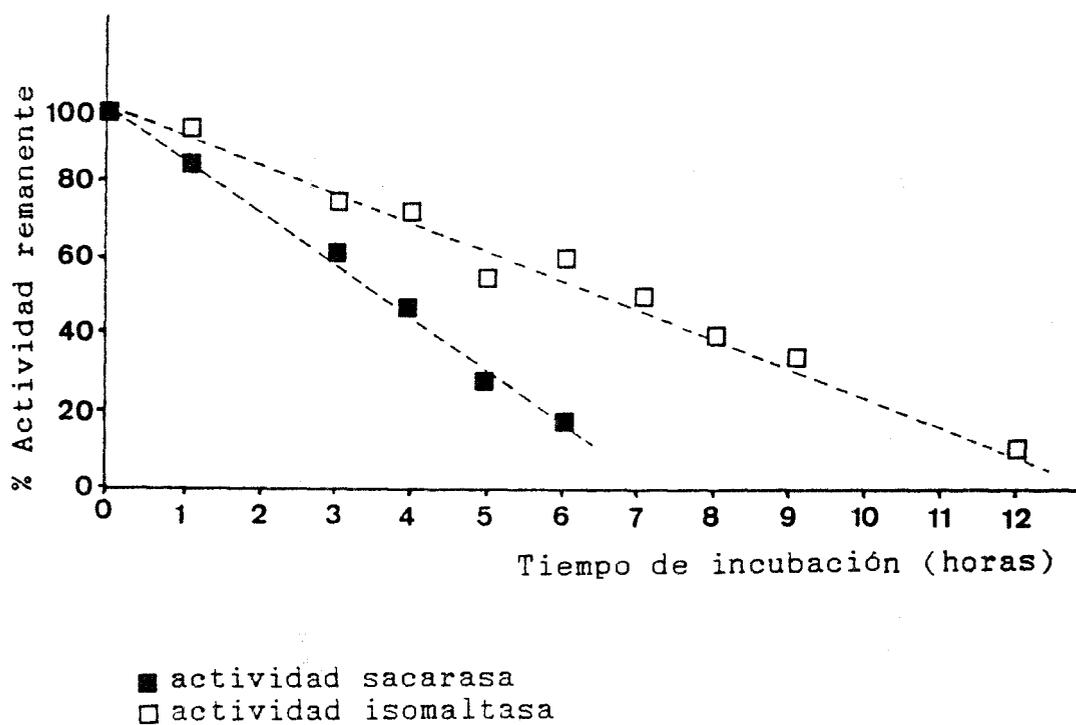


FIGURA 42. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA, PURIFICADO Y OXIDADO, FRENTE A PROTEASAS INTESTINALES.

---

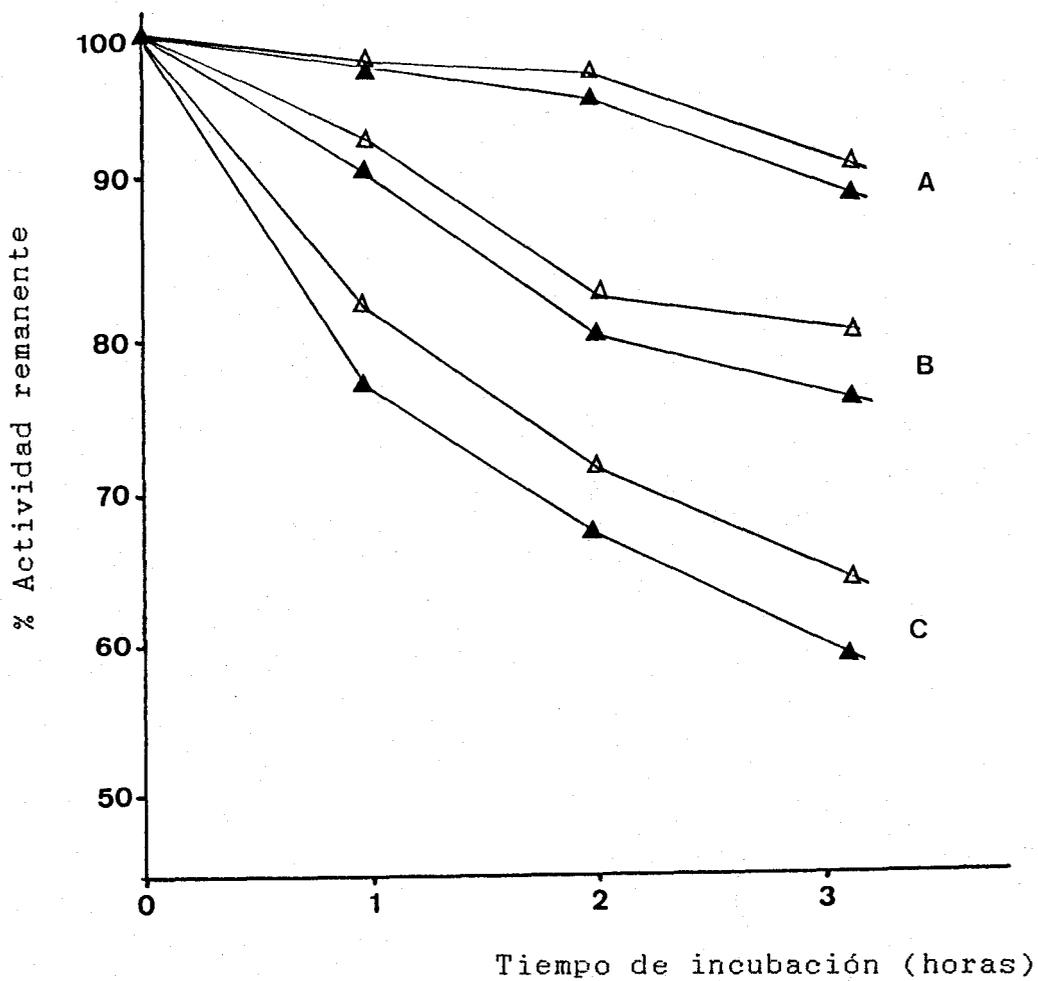


#### IV.14. INACTIVACION TERMICA DEL COMPLEJO-SI.

Las Fig.43 y 44 reflejan las curvas de inactivación del complejo-SI de joven y viejo, medido como actividad sacarasa e isomaltasa respectivamente, y sometidos a diferentes temperaturas.

La Fig.45 muestra la inactivación térmica del complejo oxidado de animales jóvenes (con diferentes tiempos de oxidación), medido como actividad sacarasa, a 45°C.

FIGURA 43. SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD SACARASA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

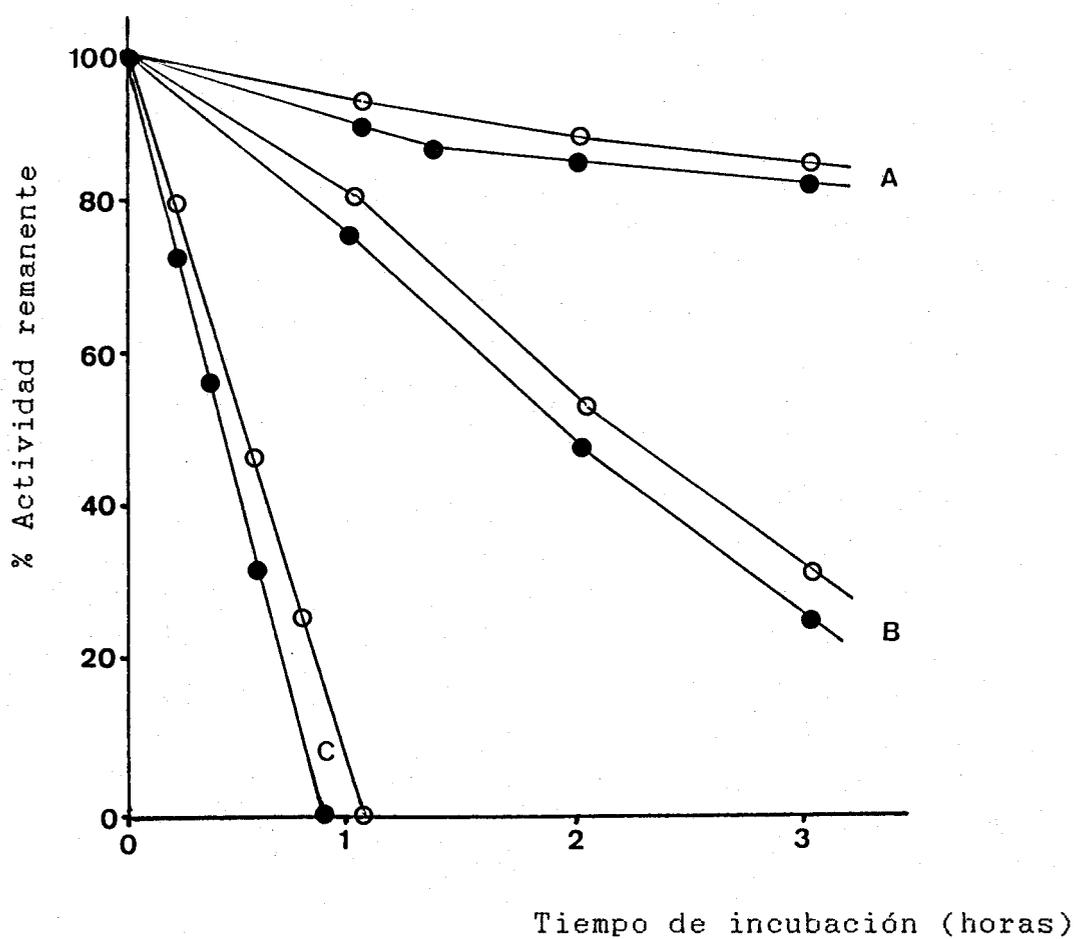


A a 25°C  
B a 37°C  
C a 45°C

△ sacarasa joven

▲ sacarasa viejo

FIGURA 44. SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD ISOMALTASA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA DE ANIMALES JOVENES Y VIEJOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.



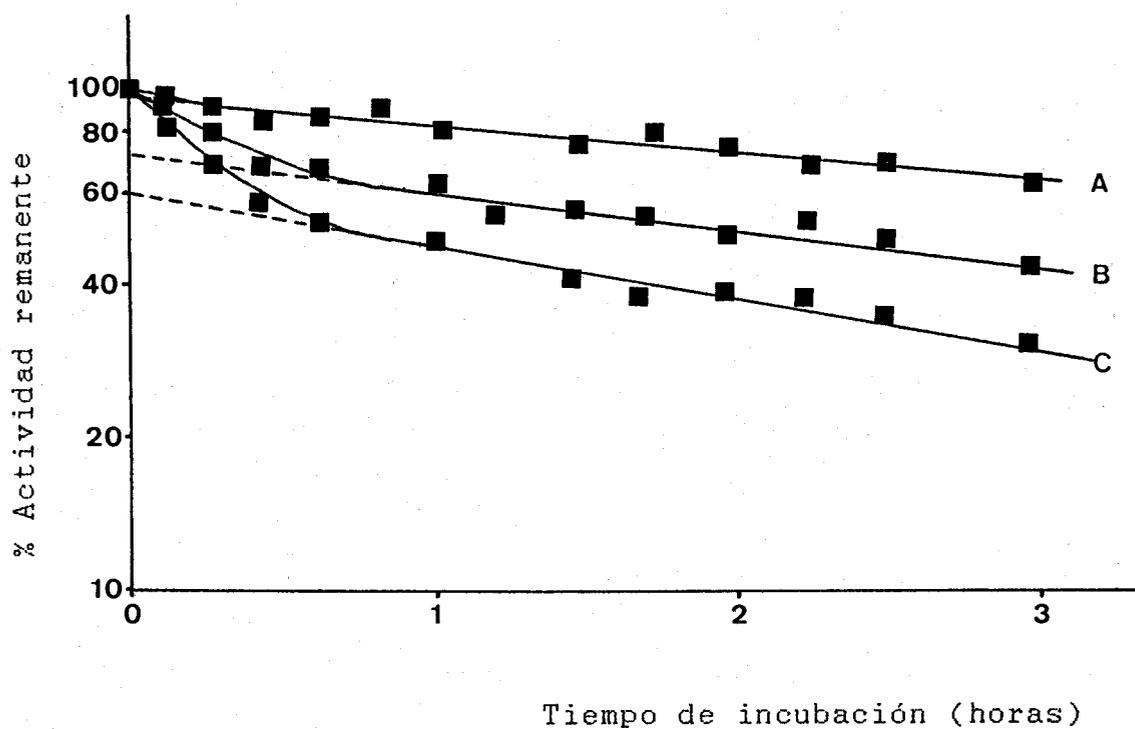
A a 25°C  
B a 37°C  
C a 45°C

○ isomaltasa joven

● isomaltasa viejo

FIGURA 45. INACTIVACION A 45°C, DEL COMPLEJO-SI DE JOVEN OXIDADO A DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO, MEDIDA COMO ACTIVIDAD SACARASA.

---



A: oxidación a tiempo cero

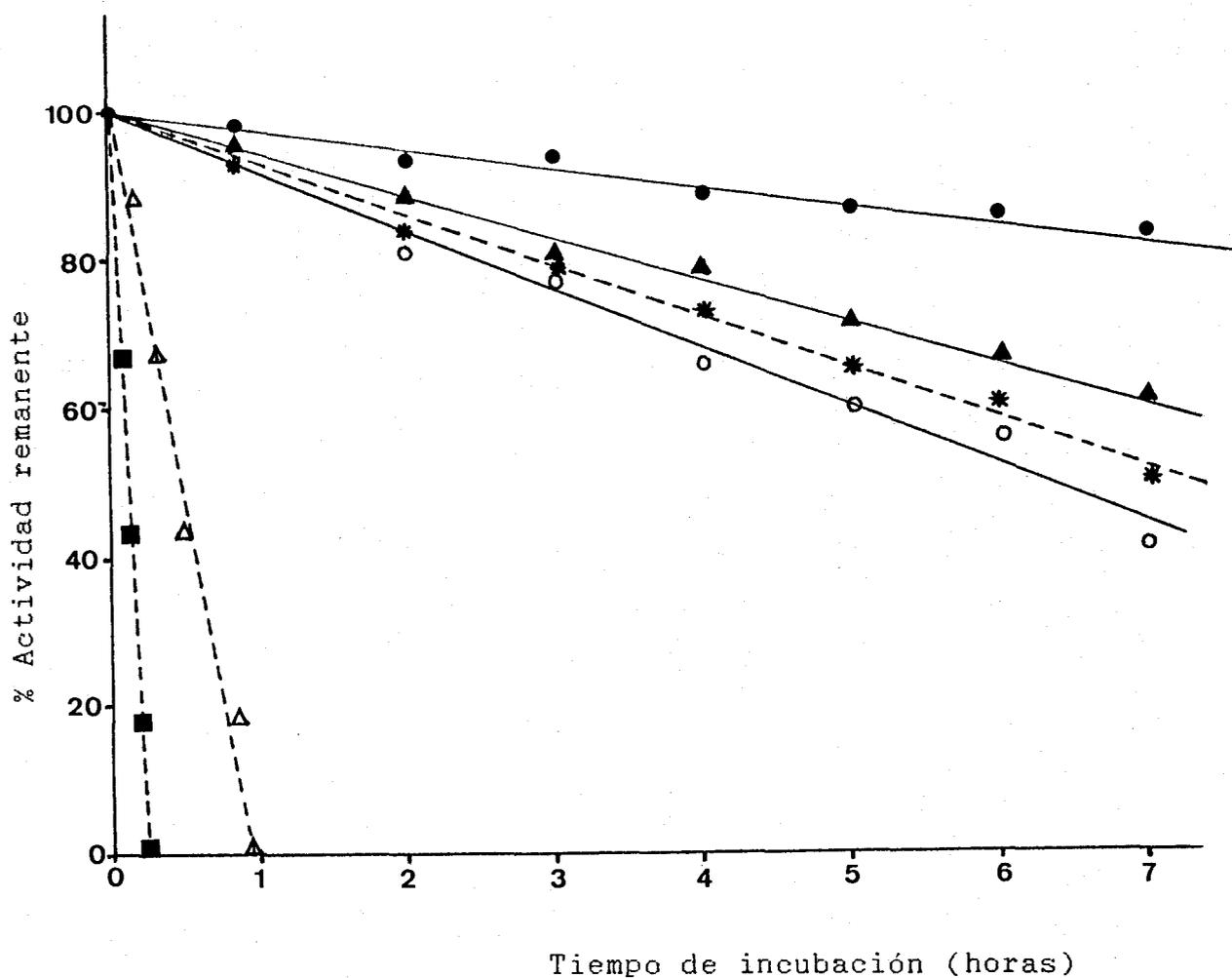
B: oxidación a tres horas

C: oxidación a cinco horas

#### IV.15. EFECTO DE LA GLUCOSILACION SOBRE LA SENSIBILIDAD A PROTEASAS DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA.

Diversos autores han sugerido que la glucosilación de algunas proteínas se realiza como medio de defensa o protección ante el ataque de proteasas. Para confirmar este hecho se procedió a la desglucosilación del complejo-SI de joven y a su posterior oxidación y tratamiento con proteasas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.46.

FIGURA 46. EFECTO DE LA GLUCOSILACION SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO PURIFICADO, MEDIDA COMO SACARASA, FRENTE A PROTEASAS.



Experimento realizado en el complejo-SI purificado de:

- joven
- ▲ viejo
- \* desglucosilado
- joven oxidado a 3 horas
- △ joven desglucosilado y oxidado a 1/2 hora
- joven desglucosilado y oxidado a 3 horas

## **DISCUSSION**

## V. DISCUSION.

### V.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EDAD SOBRE DISTINTOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS DEL INTESTINO DELGADO DE LA RATA.

A lo largo de la vida de la rata, se han observado una serie de cambios tanto estructurales como funcionales en el tracto gastrointestinal (Thomson y Keelan, 1986). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en otros sistemas, como en el caso del cardiovascular, el tracto gastrointestinal no revela un deterioro estructural y funcional que sea dramático para la supervivencia del animal. Existen controversias sobre los cambios tanto morfológicos como funcionales que se producen durante el proceso de envejecimiento en el intestino delgado.

En la Tabla XXX se resumen los diferentes resultados obtenidos para el peso, y longitud del intestino de ratas jóvenes y viejas, así como para el peso de mucosa, contenido de proteína tanto en homogeneizado como en vesículas.

Como era de esperar y se observa en dicha Tabla, el

peso de las ratas aumenta con la edad de las mismas, de una manera clara y estadísticamente significativa, pasando de  $251,1 \pm 17,4$  g en los animales jóvenes, a  $448 \pm 15,86$  g en los animales viejos. Estos resultados son totalmente análogos a los encontrados por otros autores para ratas Wistar (Holt y col. 1984; Espósito y col., 1985; Holt y col., 1985; Raul y col., 1988).

Los datos disponibles sobre la variación del tamaño y la longitud del intestino delgado de la rata con la edad son escasos (Raul y col. 1988). Nuestros datos muestran que la longitud total del intestino delgado, medido desde la unión piloroduodenal hasta la válvula ileocecal, se mantiene prácticamente constante, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas, existiendo sólo pequeñas variaciones entre las medidas del intestino delgado de los animales viejos con respecto a los de jóvenes, obteniéndose  $111,0 \pm 3,8$  cm y  $110,7 \pm 3,2$  cm respectivamente. Estos resultados son totalmente análogos a los encontrados por Penzes (1984).

El contenido en mucosa raspada, expresado como peso húmedo, aumenta con la edad en todos los tramos intestinales estudiados, de una manera estadísticamente significativa, en todos los segmentos intestinales estudiados, pasando, de  $0,41 \pm 0,05$ ,  $0,44 \pm 0,07$ ,  $0,42 \pm 0,05$  y  $0,35 \pm 0,05$  en duodeno,

yeyuno, ileon proximal e ileon distal de animales jóvenes a  $0,51 \pm 0,08$ ,  $0,52 \pm 0,07$ ,  $0,50 \pm 0,06$  y  $0,40 \pm 0,05$  g en duodeno, yeyuno, ileon proximal e ileon distal de animales viejos.

En todos los casos estudiados, la menor cantidad de mucosa obtenida mediante raspado se obtiene en el ileon distal, tanto en animales jóvenes como viejos, siendo la cantidad de mucosa en el resto de los segmentos estudiados, para un mismo grupo -jóvenes o viejos-, del mismo orden, si bien, como ya se ha indicado, la cantidad de mucosa obtenida para un determinado segmento es siempre mayor en los animales viejos. Estos resultados están de acuerdo con los resultados encontrados en ratón por Moog (1977), y en rata Fischer (Holt y col., 1984). Este aumento en la cantidad de mucosa podría ser consecuencia del incremento observado con la edad para la submucosa y el espesor de las vellosidades encontrado por Raul y col., 1988.

En la Tabla XXX se muestran también los resultados encontrados para el contenido proteico de la mucosa obtenida mediante raspado de los distintos segmentos intestinales estudiados, tanto en animales jóvenes como en animales viejos, así como el contenido proteico de las membranas del borde en cepillo del intestino delgado.

Como se puede observar, el contenido proteico de la

mucosa intestinal, varia de una manera estadísticamente significativa con la edad. Por el contrario, en las membranas del borde en cepillo, con la edad, no se observa diferencia estadísticamente significativa en el contenido proteico.

## **V.2. ESTUDIO DE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA CON LA EDAD.**

Hemos encontrado que la actividad específica del complejo sacarasa-isomaltasa disminuye entre un 27-30% en el intestino de la rata Wistar con la edad, como queda reflejado en las Fig.17, 18 y 19. Estos resultados que están de acuerdo con los obtenidos por otros (Rommel y Böhmer, 1972; Höhn y col., 1978; Holt, 1985), están, sin embargo, en desacuerdo con los obtenidos por Raul y col. (1988), que han aportado resultados totalmente contrarios, encontrando un aumento de actividad enzimática para este tipo de enzimas en el intestino de ratas viejas y con los aportados por Welsh y col., 1978 que recogen un mantenimiento de la misma.

La actividad enzimática de las distintas disacaridasas intestinales, no es uniforme a lo largo del intestino delgado (Triadou y col., 1983; Thomson y Keelan, 1986a, b). Como puede observarse, de los resultados expuestos en la

Fig.16 los niveles de actividad específica sacarasa encontrados en el duodeno y yeyuno son significativamente superiores a los encontrados en el íleon, donde dichas actividades son relativamente bajas, como consecuencia que la mayor parte de la digestión y absorción de glúcidos se realiza en los segmentos anteriores, por lo que en las determinaciones sobre el complejo sacarasa-isomaltasa posteriores a la determinación de actividades específicas en los diferentes segmentos intestinales y su variación con la edad, sólo se ha utilizado los segmentos de intestino correspondientes al duodeno y yeyuno.

En cuanto a la relación con la variación de la actividad específica del complejo sacarasa-isomaltasa durante el proceso de envejecimiento, se observa que mientras que en el duodeno, yeyuno e íleon proximal tiene lugar una disminución significativa (del 32%, 38% y 21% respectivamente) de la actividad específica sacarasa, en el íleon es muy pequeña, pero prácticamente, no se modifica; sin embargo, para la actividad isomaltasa se observa una disminución generalizada a lo largo de todo el intestino delgado (del 28% en duodeno, 28% en yeyuno, 16% en íleon proximal y 36% en íleon distal).

La Fig. 17 contempla que la pérdida de actividad es progresiva a medida que el animal envejece, siendo más

pronunciada esta pérdida en la etapa final, a partir de los 20 meses de edad, si bien esta pérdida de actividad específica, que se alcanzan en la senectud, parece no ser suficiente para impedir el desarrollo normal de la actividad funcional del organismo completo.

Dado que la disminución de actividad específica observada con la edad, podría ser debida entre otras causas, a la disminución de la síntesis del complejo o a la acumulación de formas inactivas o menos activas (Gershon y col., 1979), se procedió al estudio de la relación actividad/cantidad de enzima mediante inmunotitulación (Gordillo, 1988). Las inmunotitulaciones se realizaron en homogeneizados de mucosa intestinal, utilizando para ello anticuerpos policlonales anti-sacarasa-isomaltasa y el anticuerpo monoclonal BBC 1-35/11/2, específico para la subunidad isomaltasa. Debido a que en el homogeneizado del intestino delgado pueden existir, en teoría, complejo sacarasa-isomaltasa unido a la membrana; subunidad isomaltasa unida a la membrana; subunidad isomaltasa y subunidad sacarasa separadas o formando complejo, desprendidas en el lumen intestinal, cuando utilizamos los anticuerpos policlonales, inmunotitularemos todas estas posibilidades, ya que reconocerán tanto a una como a otra subunidad. Ahora bien, con el monoclonal BBC 1-35/11/2, al ser específicos de la subunidad isomaltasa, sólo

inmunotitularemos la isomaltasa que se encuentre unida o no a membrana, ya esté separada o formando parte del complejo, e indirectamente reconocerá la sacarasa que se encuentre unida a la isomaltasa, ignorando la que se encuentre libre.

Como se observa de los resultados expuestos en las Fig. 20 y 21, para inmunotitular con los policlonales, una determinada cantidad de actividad sacarasa (100 mU) en homogeneizado de ratas jóvenes se necesitan 38 ul de antisuero, mientras que para inmunotitular la misma actividad en homogeneizado de ratas viejas se necesitan 51 ul del antisuero, es decir 1,34 veces más cantidad de anticuerpo que en el homogeneizado de ratas jóvenes. Resultados análogos se obtienen para la inmunotitulación de 60 mU de actividad isomaltasa, donde en homogeneizado de joven se necesitan 45 ul de antisuero frente a 65 ul para el homogeneizado de viejos, es decir 1,44 veces más cantidad de antisuero para inmunotitular el homogeneizado de viejos.

Los resultados obtenidos para la inmunotitulación de la sacarasa e isomaltasa en una muestra de homogeneizado de mucosa intestinal de animales jóvenes y viejos, con el monoclonal, se muestran en las Fig. 22 y 23, y como puede verse, el anticuerpo BBC 1-35/11/2 precipita la actividad isomaltasa, e indirectamente la actividad sacarasa correspondiente a la subunidad sacarasa que se encuentre

unida a la subunidad isomaltasa, es decir la que se encuentra formando el complejo sacarasa-isomaltasa. Sin embargo y como puede apreciarse en las figuras mencionadas el anticuerpo precipita toda la actividad isomaltasa presente pero queda actividad remanente sacarasa en el sobrenadante lo que indica que existen subunidades sacarasa libres, no unidas a la subunidad isomaltasa en el homogeneizado.

En la Fig. 24 podemos ver que la cantidad de anticuerpo necesario para precipitar la misma cantidad de actividad enzimática isomaltasa en homogeneizado de mucosa intestinal de viejos, es mayor (72 ul) que la necesaria para precipitar la misma cantidad de actividad (100 mU) en homogeneizado de mucosa intestinal de jóvenes (51 ul). Esto se podría interpretar suponiendo la existencia de una mayor cantidad de moléculas enzimáticas no activas o menos activas en el tejido de los animales viejos como se ha descrito para otras proteínas (Levine y col., 1981; Dice, 1982; Stadtman, 1986; Davies, 1987; Davies y Goldberg, 1987; Davies y Lin, 1988; Stadtman, 1988, 1990; Gordillo y col. 1989, 1990).

### V.3. PURIFICACION DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA Y CITRACONILACION.

La existencia de formas inactivas y/o menos activas también se puede poner de manifiesto por métodos puramente bioquímicos, tales como son los métodos cromatográficos de purificación. La actividad específica para el complejo de animales viejos es un 32% menor que la encontrada para el complejo de animales jóvenes, en el complejo purificado. Esta diferencia, no es sin embargo, atribuible a la purificación selectiva de formas alteradas del complejo enzimático, ya que el porcentaje de recuperación de la actividad total, así como el rendimiento durante la purificación, es prácticamente igual, independientemente de que el complejo proceda de animales jóvenes o de animales viejos, como se pone de relieve en la Tabla XI.

En la Tabla XII se muestran los resultados obtenidos en el proceso de separación de las subunidades por citraconilación, y como puede observarse, la recuperación de la actividad es prácticamente igual para el complejo aislado de animales jóvenes y para el aislado de animales viejos e incluso para el complejo oxidado, si bien también puede observarse que la recuperación de la actividad isomaltasa es mayor que la de la subunidad sacarasa, probablemente debido a su mayor estabilidad frente a la agresión por

sustancias oxigenadas y a la proteolisis, lo que indirectamente nos podría indicar que la oxidación actúa como señal previa a la proteolisis.

#### V.4. ESTUDIO DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA MEDIANTE LA UTILIZACION DE REACTIVOS ESPECIFICOS DE AMINOACIDOS.

Dado que diferentes autores han visto que la pérdida de actividad de ciertas enzimas va asociada a la modificación de ciertos restos aminoacídicos, se procedió a titular restos de lisina, histidina, metioninas, argininas, y grupos sulfidrilos por ser dichos restos los más vulnerables fisiológicamente a los procesos de modificación especialmente a los oxidativos.

El objeto de utilizar estos reactivos, es el emplearlos como sondas con el fin de acceder a los restos aminoacídicos que por la topología del complejo o de las subunidades están situados en la superficie accesible de la molécula. En teoría, si la molécula de joven y viejo son exactamente iguales, el número de restos accesibles/ titulables cabría esperar que fueran iguales. Si por alguna causa la conformación y/o estructura de las proteínas de joven y viejo difieren, lo más probable es que el número de restos accesibles varíe. Consecuentemente el número de restos titulables en la proteína de animales jóvenes y en la de animales viejos, probablemente, no serán iguales. Por regla general, se ha encontrado que para muchas enzimas el número de restos titulados en proteínas de animales viejos es menor que el encontrado en proteínas de animales jóvenes, pero

esto no descarta la posibilidad de las otras dos opciones, es decir, que en ciertos casos, se titulen los mismos o más restos aminoacídicos en proteínas de animales viejos que en las correspondientes proteínas de animales jóvenes.

En la Tabla XVI se observa que en su forma nativa, ni el complejo-SI ni sus subunidades poseen **grupos -SH** libres, y sólo tras un periodo largo de incubación (60 min) empieza a observarse reacción, probablemente debido a la desnaturalización de las moléculas y por tanto a la consecuente exposición de algunos grupos -SH, que en condiciones normales o nativas están ocultos en el interior de la molécula. También podemos observar los resultados obtenidos para el complejo-SI y sus subunidades separadas, tras la correspondiente desnaturalización con clorhidrato de guanidina 6M, valorándose 12,8 restos en el complejo de animales jóvenes, 9,1 restos en el correspondiente a animales viejos y 7,8 restos en el complejo oxidado. Resultados análogos se obtienen con las subunidades separadas.

En la Tabla XVII puede observarse que prácticamente todos los **grupos lisina** presentes en cada una de las moléculas (48 para el complejo-SI, 25 para la subunidad sacarasa y 28 para la isomaltasa) son titulables con este reactivo. En las Tablas XVIII, XIX y XX se observa que a

partir de la titulación de 5 restos en el complejo y en las subunidades sacarasa e isomaltasa, se observa una rápida pérdida de actividad, probablemente debida a cambios conformacionales en las moléculas, que conducen a la desnaturalización de la proteína, facilitándose así el acceso del reactivo.

En la Tabla XXI se muestran los resultados obtenidos para la titulación de **grupos histidina**. Las reacciones que se producen con el reactivo DEPC pueden ser atribuidas exclusivamente a la modificación de restos de histidina, ya que en las condiciones utilizadas no reaccionan ni los restos tirosina ni los grupos -SH, como se deduce del espectro UV que presenta un máximo a 245 nm característico de la N-carboxihistidina, sin observarse variación en el rango de 280 nm y de la ausencia de grupos -SH titulables en la forma nativa tanto del complejo como de sus subunidades separadas. Como puede verse, en el complejo-SI de joven y viejo, el número de restos histidina es de 18,2 y 16,7 respectivamente. Cuando se trata el complejo-SI con el sistema de oxidación Ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub>, el número de grupos histidina valorables se reduce significativamente a un valor de 15,2. Mientras que para la subunidad isomaltasa se observa un comportamiento semejante al descrito para el complejo completo, para la subunidad sacarasa se observa una diferencia significativa, según se trate de la procedente de

animales jóvenes o viejos. Así, mientras que para la sacarasa de ratas jóvenes se titulan 11,2 restos, en la de ratas viejas sólo se logran titular 8,7 restos. En las subunidades oxidadas se sigue observando un descenso significativo de los grupos histidina. En la Tabla XXII puede apreciarse que la modificación de más de tres restos de los grupos histidina en el complejo-SI conduce a una rápida pérdida de actividad tanto para el de joven como para el de viejo y el oxidado. En las subunidades separadas, el efecto de la modificación sobre la subunidad sacarasa es más significativo que sobre la subunidad isomaltasa. La modificación de más de dos restos de histidina en la subunidad sacarasa (Tabla XXIII) induce un rápido cambio de actividad, mientras que para la subunidad isomaltasa es preciso la modificación de tres o más restos de histidina para observar el mismo resultado (Tabla XXIV).

Respecto a la titulación de **restos de arginina**, en la Tabla XXV puede apreciarse que el número de restos titulados con este reactivo es prácticamente igual en el complejo de animales jóvenes que de viejos, observándose sólo una pequeña disminución en el complejo oxidado, lo que indica que, **para nuestra enzima**, este tipo de resto aminoacídico es altamente resistente a la oxidación por sustancias oxigenadas activas. La pérdida de actividad como puede observarse en la Tabla XXVI, empieza a ser significativa

sólo tras la modificación de un elevado número de restos arginina (16 para el complejo-SI de jóvenes y viejos y 14 en el complejo oxidado).

De los resultados expuestos en la Tabla XXVII con respecto a la titulación de **restos metionina**, se observa que no existe diferencia entre el complejo de animales jóvenes y viejos, mientras que para el complejo oxidado si existe diferencia, lo que revela la sensibilidad de este tipo de resto aminoacídico frente a sustancias oxigenadas activas. No obstante, como se aprecia en la Tabla XXVIII, la oxidación de estos restos de metionina no implica una pérdida apreciable de la actividad sacarasa e isomaltasa del complejo-SI y sólo tras la modificación de más de la mitad de los restos titulables, la actividad comienza a perderse rápidamente.

En las Tablas XXXI y XXXII se resumen los datos obtenidos en la titulación de los restos aminoacídicos en el complejo-SI y sus subunidades separadas, de animales jóvenes, viejos y oxidado, señalando si las diferencias encontradas son estadísticamente significativas. Como podemos observar sólo para los restos de **lisina, histidina y grupos -SH** encontramos algún tipo de diferencias estadísticamente significativa. Para el caso de los **restos de lisina** encontramos que no existe diferencia

estadísticamente significativa entre el complejo de joven y de viejo pero al titular las subunidades por separado encontramos diferencia estadísticamente significativa para la subunidad sacarasa. Respecto a los **restos de histidina** encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto en el complejo como en la subunidad sacarasa. Por último respecto a los **grupos -SH** encontramos diferencias estadísticamente significativas en la subunidad sacarasa y en la subunidad isomaltasa. En cuanto a la titulación del complejo sacarasa-isomaltasa y de sus subunidades por separado en animales jóvenes y en oxidado encontramos diferencias significativas para la mayoría de las titulaciones realizadas.

Estos resultados parecen estar sugiriendo una mayor sensibilidad de los restos de lisina e histidina así como de los grupos -SH a las modificaciones con la edad. Esto concuerda con lo encontrado por otros autores para otras proteínas, que sugieren que los grupos -SH son altamente sensibles a los procesos oxidativos (Chang y Chueh, 1980; Hightower y col., 1989) así como los restos de histidina y lisina que son susceptibles de ser oxidados *in vivo* por diferentes sistemas de oxidación, que implican la intervención de sustancias oxigenadas activas, dando lugar a los correspondientes derivados carbonílicos (Stadman, 1986, 1990; Levine, 1981; Amici y col., 1989; Gordillo y col.,

1988, 1989).

De los datos anteriormente expuestos, observamos que para todos los restos titulados, salvo para la arginina, se encuentra como denominador común, que la suma de los restos titulados para la subunidad sacarasa y para la subunidad isomaltasa por separado son superiores a los restos titulados para las dos subunidades formando el complejo, lo que podría indicar que dichos restos se encuentran en la zona de interacción entre las dos subunidades, aunque esto no tiene por que indicar que dichos restos estén directamente implicados en la interacción de las subunidades, sino que se encuentran en una zona que no está directamente accesible al reactivo utilizado cuando se está titulado al complejo y que cuando separamos las subunidades, manteniendo su actividad, y por tanto su estructura, estos restos quedan accesibles al reactivo utilizado, o que las subunidades por separado presenten una configuración distinta a la que presentan cuando están formando parte del complejo. En el caso de los restos de arginina la suma de los restos titulados para las subunidades separadas es inferior a los restos titulados para el complejo, esto podría explicarse por el cambio conformacionan indicado más arriba, en el que con la nueva conformación ciertos restos que en el caso de estar formando el complejo son accesibles al reactivo, ahora con la nueva conformación no lo son.

## **V.5. ESTUDIO DEL ESTADO DE OXIDACION DEL COMPLEJO-SI DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS.**

De los resultados obtenidos en la titulación con reactivos específicos, se observa que para la titulación de restos de histidina y lisina, se obtienen diferencias estadísticamente significativas, bien en el complejo-SI o bien en alguna de las subunidades por separadas, y teniendo en cuenta que las modificaciones oxidativas de los restos aminoacídicos de las proteínas tienen lugar preferentemente sobre restos de lisina, histidina, arginina y prolina (Amici, 1989; Stadman, 1990; Gordillo, 1988, 1989), dando lugar a la formación de los correspondientes derivados carbonílicos, por lo que se procedió a la titulación de grupos carbonilos en el complejo-SI y en las subunidades separadas.

### **V.5.1. TITULACION DE LOS GRUPOS CARBONILOS.**

La medida de grupos carbonilos es un buen parámetro para determinar el estado oxidativo de una molécula, por lo que se procedió a su titulación por el método de la **Digoxigenina-X-hidrazida** (Bautista, comunicación personal). Este procedimiento es altamente específico ya que al no fijarse, en los pocillos de la microplaca, ni los

polisacáridos ni los ácidos nucleicos, que interfieren en el ensayo, -en el caso de muestras no purificadas-, se eliminan las dos principales fuentes de error que presentan la mayoría de los métodos utilizados para la cuantificación de grupos carbonilos en proteínas. Valorandose específicamente los grupos carbonilos presentes en las proteínas. Por otro lado, la sensibilidad del método viene determinada por la sensibilidad de la enzima acoplada al anticuerpo anti-Digixigenina (la fosfatasa alcalina) que permite la detección de grupos carbonilos, en muestras, hasta con 10 ug de proteína.

Como podemos observar, en la Tabla XXXII la suma de los grupos carbonilos titulados para las subunidades separadas es ligeramente superior a los de los grupos titulados para el complejo-SI del que provienen lo que podría ser indicativo de la existencia de restos aminoacídicos fácilmente oxidables en la zona de interacción entre las subunidades, o que, en el caso de que las subunidades separadas presenten una configuración distinta a la que presentan cuando están asociadas formando el complejo, el número de restos oxidables sea mayor.

En relación con el contenido de grupos carbonilos del complejo-SI con la edad, en la Fig. 29 puede observarse la evolución, incrementándose claramente el contenido en grupos carbonilos en las etapas finales de la vida de la rata.

## V.5.2. INACTIVACION DEL COMPLEJO-SI MEDIANTE OXIDACION CON SISTEMAS-MCO NO-ENZIMATICOS.

### V.5.2.1. Inactivacion del complejo sacarasa-isomaltasa:

Los resultados obtenidos para la inactivación del complejo sacarasa-isomaltasa, con los sistemas-MCO: ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> y ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub>, se muestran en la Tabla XIII.

La inactivación del complejo-SI por el sistema-MCO no-enzimático ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> conduce a una pérdida de actividad sacarasa del 30% y del 13% de la actividad isomaltasa a las 3 horas, mientras que el sistema ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub> conduce a un 20% de pérdida de actividad sacarasa y del 10% de la actividad isomaltasa tras el mismo periodo de incubación, y sólo tras incubaciones prolongadas de hasta 50 horas las pérdidas de actividad son practicamente totales. Estos resultados son totalmente diferentes a los observados para las enzimas intracelulares que tras incubaciones de 60-120 min., prácticamente ya han perdido toda su actividad.

Estos resultados parecen reflejar una mayor estabilidad de las proteínas de membrana frente a estos sistemas y el que los restos susceptibles de oxidación no son esenciales

para la actividad del complejo y sólo tras incubaciones prolongadas cuando el número de restos oxidados es grande, probablemente, se induzcan cambios conformacionales que serían los responsables de la pérdida de actividad. Pero para que esto tenga lugar es necesario que los cambios sean grandes, es decir que la oxidación sea masiva.

Esto es lógico, ya que estas moléculas deben presentar mayores estabilidades, debido a que por su situación fisiológica están sometidas a un mayor estrés *in vivo*.

#### V.5.2.2. Inactivación de la subunidad sacarasa:

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos por la inactivación de la subunidad sacarasa con los sistemas-MCO: ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> y ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub>.

Como puede observarse, la inactivación de la subunidad sacarasa con el sistema no enzimático: ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> conduce a una pérdida de actividad del 35% a las 3 horas, mientras que el sistema ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub> conduce a una pérdida de actividad del 27% tras el mismo periodo de incubación. De nuevo y al igual que ocurre con el complejo-SI, sólo tras periodos de incubación prolongados, 50 h, la pérdida de actividad es prácticamente completa.

### V.5.2.3. Inactivación de la subunidad isomaltasa:

Los resultados de la inactivación de la subunidad isomaltasa, por los sistemas-MCO anteriormente utilizados para la oxidación de la subunidad sacarasa, vienen reflejados en la Tabla XV.

La oxidación con el sistema ascorbato/Cu(II)/O<sub>2</sub> de la subunidad isomaltasa conduce a una pérdida de actividad del 9% a las 3 horas, mientras que con el sistema ascorbato/Fe(III)/O<sub>2</sub> se produce una pérdida de actividad del 7% tras el mismo periodo de incubación, y sólo tras un periodo de incubación de 50 h la pérdida de actividad es completa.

Estos resultados parecen indicar que el efecto de las sustancias oxigenadas activas sobre el complejo-SI, así como sobre las subunidades separadas, no tiene lugar sobre el centro activo de las subunidades ni sobre ningún otro punto que pueda afectar directamente la estructura activa del complejo. Por ello, estas sustancias oxigenadas activas deben actuar sobre restos aminoacídicos que no se encuentren directamente implicados, ni en los centros activos, ni que desempeñen funciones estructurales esenciales para las moléculas, al contrario de lo que han observado otros autores (Levine y col., 1981; Horecker y col., 1985;

Gordillo y col., 1988, 1989) para otras clases de enzimas, fundamentalmente deshidrogenasas y quinasas, para quienes el tratamiento con estos sistemas de oxidación conduce a una pérdida rápida y total de la actividad enzimática.

Por otra parte, estos resultados indican también que para que pueda observarse una pérdida de actividad clara, de un 20-30%, en el complejo-SI y/o en las subunidades por separado, es necesario realizar una larga incubación - aproximadamente unas 3 horas- de las enzimas con el sistema de oxidación, y que la subunidad más sensible es la subunidad sacarasa.

#### **V.6. ESTADO DE OXIDACION DE LAS PROTEINAS DEL INTESTINO DELGADO DE RATA.**

Dado que el complejo-SI de ratas viejas presenta un mayor contenido de grupos carbonilos -lo que sugiere un mayor grado de oxidación- que el complejo-SI de joven, y para ver si éste es o no un fenómeno específico para el complejo-SI, se ha procedido a medir el nivel de grupos carbonilos en homogeneizados de mucosa de ratas de diferentes edades, mediante el método de la Digoxigenina-X-hidrazida.

Como se observa de los resultados expuestos en la Fig.30, el estado de oxidación de las proteínas de la mucosa del intestino delgado de la rata aumenta con la edad y al igual que se ha observado para el complejo-SI purificado. Los fenómenos de oxidación parecen tener lugar de una forma más intensa en los últimos meses de vida de la rata (a partir de los 20 meses).

Si bien, en este caso observamos que el contenido de grupos carbonilos por mg de proteína es bastante mayor que en el caso del complejo-SI purificado, lo que parece indicar que el complejo-SI es más resistente a los procesos de oxidación, o bien que en el intestino existen proteínas bastante más sensibles a la oxidación que el complejo-SI.

## **V.7. ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EL INTESTINO DELGADO.**

La actividad proteolítica en el intestino se ha medido tanto para la actividad proteolítica de origen pancreático como para la actividad proteolítica propia del intestino, localizada sobre la mucosa.

### **V.7.1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA PANCREATICA.**

La actividad proteolítica de origen pancreático se ha medido en el jugo intestinal (lavado del intestino), de ratas de diferentes edades (3, 9, 12, 24, 28 meses). Como se observa de los resultados expuestos en la Fig. 31, dicha actividad presenta una disminución prácticamente lineal con la edad de la rata. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por otros autores (Holt y col., 1985). La disminución de esta actividad explicaría en parte la acumulación de proteínas alteradas (oxidadas) en el intestino con la edad, como anteriormente ya se ha indicado al discutir el contenido proteico de la mucosa raspada, en los diferentes segmentos intestinales.

### **V.7.2. ACTIVIDAD PROTEOLITICA INTESTINAL**

La actividad proteolítica de origen intestinal se ha medido en homogeneizado de mucosa (sin tratar con papaina) en ratas de diferentes edades (3, 9, 12, 18, 24 y 28 meses),

a pH 5,5 (actividad proteásica ácida) y a 8,8 (actividad proteásica alcalina (Rivett, 1985).

Como se observa de los resultados expuestos en la Fig.32 la actividad proteásica ácida es muy baja y, prácticamente no varia con la edad, mientras que la actividad proteásica alcalina a partir de una determinada edad (20 meses) experimenta un declive muy pronunciado, reduciendose prácticamente, a los 28 meses, a un 20% de la actividad presente a los 3 meses. Estos resultados son análogos a los encontrados por otros autores, en trabajos realizados con proteína citoplasmáticas (Starke-Reed y Oliver, 1989). Si bien parece lógico que la actividad proteásica ácida sea baja, ya que este tipo de actividad es fundamentalmente de origen microsomal.

#### **V.8. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO SACARASA-ISOMALTASA FRENTE A PROTEASAS PANCREATICAS.**

La estabilidad frente a proteasas pancreáticas se ha estudiado en homogeneizados de mucosa (complejo-SI unido a membrana) y en el complejo-SI purificado.

Como se observa en la Fig. 33 el complejo-SI unido a membrana es muy resistente cuando se somete al tratamiento con proteasas pancreáticas a concentraciones bajas,

similares a las encontradas *in vivo*. Estos resultados concuerdan plenamente con los esperados, teniendo en cuenta la localización de dicho complejo enzimático en las membranas del enterocito, donde, al encontrarse en el lumen intestinal, están expuestas *in vivo* a la acción de distintas proteasas digestivas existentes en el jugo pancreático y en la propia pared intestinal, y además porque se logra solubilizar el complejo, manteniendo la mayor parte de su actividad cuando se le somete a la acción de la papaina, que rompe sólo a nivel del péptido de anclaje a la membrana, dejando intacto el resto del complejo.

Sin embargo, cuando se realiza el tratamiento con proteasas a concentraciones relativamente altas, 10 veces superiores a las encontradas *in vivo*, los resultados son diferentes, según el ensayo se realice en homogeneizado de mucosa o con el complejo purificado.

Cuando se estudia el comportamiento del complejo-SI en homogeneizado de mucosa frente a proteasas pancreáticas, se observa una pérdida acentuada de la actividad sacarasa, mientras que para la actividad isomaltasa sólo se observan ligeras pérdidas (Fig. 34), independientemente de que el estudio se realice en jóvenes o en viejos, aunque el complejo de viejos siempre muestra ser ligeramente más sensible a las proteasas.

Cuando el complejo-SI purificado y en condiciones nativas, se somete a una digestión con tripsina a concentración alta (10 veces la fisiológica) y manteniendo la temperatura a 37°C se observa una marcada diferencia entre la desaparición de la actividad sacarasa y de la actividad isomaltasa, invirtiéndose la sensibilidad de las subunidades frente a las proteasas con respecto a lo que le ocurría al homogeneizado (Fig. 35). Al igual que en el caso del complejo unido a membrana, el complejo de viejo muestra una mayor sensibilidad frente a las proteasas.

El complejo-SI de joven oxidado, en homogeneizado de mucosa, se trata con tripsina a 37°C a alta concentración, y se obtiene un aumento significativo en la pérdida de actividad tanto sacarasa como isomaltasa, si bien la pérdida de actividad sacarasa es significativamente mayor (Fig. 36), que la isomaltasa.

Para el complejo-SI purificado y oxidado (Fig. 37), sometido a la acción de tripsina en las mismas condiciones que para el complejo oxidado del homogeneizado de mucosa, vemos que la sensibilidad a proteasas se ha incrementado con respecto al complejo purificado sin oxidar. En este caso, al igual que para el complejo purificado de joven y viejo, también se observa la misma inversión para la sensibilidad de las subunidades frente a las proteasas.

Los resultados obtenidos, de la sensibilidad del complejo (de joven, viejo, y oxidado) frente a proteasas pancreáticas a alta concentración, podrían explicarse si tenemos en cuenta la topología del complejo que *in vivo* se encuentra anclado a la membrana por la subunidad isomaltasa y expuesto al lumen intestinal, con lo que la subunidad sacarasa estaría más accesible a la acción de agentes exógenos que la subunidad isomaltasa, que por su posición se encontraría más protegida. En el caso del complejo purificado, en el que tanto para el complejo de joven, como para el de viejo, y el oxidado, se observa una inversión de la sensibilidad de las subunidades frente a las proteasas, que podría explicarse, suponiendo un cambio conformacional del complejo en el que ahora la subunidad isomaltasa, sería más sensible a dichos agentes hidrolíticos. Esto explicaría también, en parte, la presencia de subunidades sacarasa libres en el lumen intestinal.

#### **V.9. SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO-SI FRENTE A LAS PROTEASAS INTESTINALES.**

En este caso, al igual que en el caso anterior, el estudio se ha realizado con el complejo-SI unido a membrana y con el complejo-SI purificado.

En el estudio de la sensibilidad, frente a proteasas intestinales alcalinas, del complejo unido a membrana, de animales jóvenes y viejos, el mismo homogenizado actúa directamente como fuente de proteasas. Sin embargo, en el caso del complejo oxidado, se mezclan 1 ml de complejo oxidado (homogenado-oxidado) con 1 ml de complejo nativo (homogenado). Tomándose como actividad inicial (100%) la actividad de la mezcla a tiempo cero.

La sensibilidad del complejo purificado se ha estudiado tanto en el purificado de animales jóvenes como de animales viejos y oxidado, utilizando como fuente de proteasas el propio homogenado ( 100 ul -0,5 mg/ml de proteína-/ml de muestra -1 mg/ml de proteína).

Como se observa, de los resultados expuestos en las Fig. 37 a 42, el complejo-SI de viejo, tanto unido a membrana como purificado, parece ser ligeramente más sensible a las proteasas intestinales que el complejo de joven, si bien la sensibilidad es bastante menor que la observada para el complejo-oxidado.

En este caso no se observa la inversión de sensibilidad detectada frente a las proteasas pancreáticas, siendo más sensible la subunidad sacarasa que la isomaltasa, tanto en el complejo-SI unido a membrana como purificado, lo que

sugiere un mecanismo de acción, para estas proteasas, diferente al de las proteasas pancreáticas (fundamentalmente la tripsina).

#### V.10. INACTIVACION TERMICA DEL COMPLEJO-SI.

De las curvas de inactivación del complejo-SI de joven y viejo, sometido a diferentes temperaturas, se observa, que la subunidad isomaltasa es mucho más inestable que la subunidad sacarasa para unas condiciones y temperatura dadas. Así, la sacarasa pierde un 40% de su actividad tras 3 horas de incubación a 45°C mientras que la isomaltasa en 1 hora ha perdido la totalidad de su actividad (Fig. 43 y 44).

En cuanto a la inactivación térmica del complejo-SI oxidado (Fig.45), puede observarse que entre mayor es el grado de oxidación, mayor es la inestabilidad térmica del complejo.

Para determinar el componente termolabil se ha extrapolado la zona lineal de la curva a tiempo cero, pasándose de un valor de 6,7% a tiempo cero, a un valor de 40% a las cinco horas.

Estos resultados reflejan un comportamiento semejante entre el complejo de viejos y el oxidado si bien el

componente termolábil es mayor en el complejo oxidado, lo que parece sugerir que la termolabilidad venga determinada por la modificación (oxidación) de determinados restos aminoácidos (Oliver y Wittenberger, 1985; Oliver y col., 1987b).

#### **V.11. EFECTO DE LA GLUCOSILACION SOBRE LA SENSIBILIDAD A PROTEASAS DEL COMPLEJO-SI.**

De los resultados obtenidos hasta ahora se ha observado que si bien la oxidación da lugar a la aparición de estructuras moleculares que presentan un comportamiento cualitativo semejante al complejo aislado de viejo, desde el punto de vista cuantitativo se observan importantes diferencias entre el complejo oxidado y el de viejo por lo que parece ser que además de la oxidación, que de hecho debe actuar como señal, debe existir algún otro componente implicado en la inactivación/degradación del complejo alterado.

Diferentes autores han sugerido la presencia de formas desglucosiladas (Quaroni y col., 1985; Byatt y col., 1990) que son rápidamente degradadas cuando se trabaja en ausencia de inhibidores de las proteasas (Bautista y col., comunicación personal). Para confirmar este hecho, hemos

procedido a la desglucosilación del complejo-SI de joven y a su posterior oxidación y tratamiento con proteasas. De los resultados indicados en la Fig. 46, se observa que la desglucosilación, por sí misma, conduce a sensibilidades semejantes a la del complejo oxidado, pero cuando la desglucosilación va acompañada de oxidación del complejo, la sensibilidad a proteasas se dispara rápidamente y ésta es posiblemente la causa por la que no se encuentran formas desglucosiladas estables en las muestras estudiadas. Las formas alteradas que encontramos serán formas ligeramente oxidadas pero no desglucosiladas, ya que estas últimas serían rápidamente eliminadas.

## **CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES.

1.- Los niveles de actividad específica sacarasa e isomaltasa, encontrados en duodeno y yeyuno, son significativamente superiores a los encontrados en ileon.

2.- La actividad específica del complejo sacarasa-isomaltasa disminuye entre un 27-30%, en el intestino delgado de la rata Wistar, con la edad.

3.- Esta pérdida de actividad es progresiva a medida que el animal envejece, siendo más pronunciada a partir de los 20 meses de edad, aunque no llega a impedir el desarrollo normal de la actividad funcional del organismo completo.

4.- La cantidad de anticuerpo necesaria para inmutitular una determinada cantidad de actividad (sacarasa o isomaltasa), es mayor en viejos que en jóvenes, lo que indica la existencia de moléculas inactivas o con menor actividad.

5.- La diferencia observada, durante el proceso de envejecimiento, para la actividad específica del complejo purificado, no es atribuible a la purificación selectiva de formas alteradas, ya que el porcentaje de recuperación de la actividad total, así como el rendimiento durante la

purificación, es prácticamente igual en animales jóvenes o en viejos.

6.- Los resultados obtenidos en la titulación con reactivos específicos de aminoácidos, indican que las modificaciones tienen lugar preferentemente sobre restos de lisina e histidina, los cuales pueden dar lugar a la formación de los correspondientes derivados carbonílicos.

7.- La cuantificación de grupos carbonilos por el método de la Digoxigenina-X-hidrazida, indica que éstos incrementan con la edad, siendo este aumento mucho más evidente en las etapas finales de la vida de la rata.

8.- La inactivación, por sistemas-MCO no-enzimáticos, del complejo-SI y de las subunidades separadas, es limitada, y sólo incubaciones prolongadas, hasta de 50 horas, conducen a la inactivación casi total de la enzima.

9.- La oxidación de complejo-SI en el intestino delgado de rata no es un proceso específico para dicho complejo, sino que parece ser un fenómeno general para todas las proteínas del intestino. Es más, el complejo-SI parece ser más resistente que el resto de las proteínas del intestino delgado.

10.- La subunidad isomaltasa es mucho más inestable que la subunidad sacarasa para unas condiciones y temperatura dadas.

## **BIBLIOGRAFIA**

## VII. BIBLIOGRAFIA.

- Adelman, R.C. and Sartin, J.L. Changes in endocrine status during aging. *Mod. Aging Res.* **6**: 101-113, 1984.
- Ahn, B., Rhee, S.G. and Stadtman, E.R. Use of fluorescein hydrazide thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **161**: 245-257, 1987.
- Alpers, D.H. and Tedesco, F.J. The possible role of pancreatic proteases in the turnover of intestinal brush border proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **401**: 28-40, 1975.
- Alpers, D.H., Helms, D., Seetharan, S., May, V.L. and Strauss, A.W. In vitro traslation of intestinal sucrase-isomaltase and glucoamilase. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **134**: 37-43, 1986.
- Amici, A., Levine, R.L., Tsai, L. and Stadtman, E.R. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **264**: 3341-3346, 1989.
- Auricchio, S., Semenza, G. and Rubino, A. Multiplicity of human intestinal disaccharidases. II. Characterization of the individual maltases. *Biochim. Biophys. Acta* **96**: 498-507, 1965.
- Ballard, F.J. and Hopgood, M.F. Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) by liver extracts. *Biochem. J.* **154**: 717-724, 1976.
- Barrows, C.H. and Hokkonen G.C. Nutrition and aging: human and animal laboratory studies. *Aging (NY)* **26**: 279-322, 1984.
- Bateman, R.C., Jr., Youngblood, W.W., Busby, W.J., Jr. and Kizer, J.S. Non enzymatic peptide  $\alpha$ -amidacion. *J. Biol. Chem.* **260**: 9088-9091, 1985.

- Bordier, C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**: 1604-1607, 1981.
- Braun, H., Cogoli, A. and Semenza, G. Dissociation of small-intestinal sucrase-isomaltase complex into enzymatically active subunits. *Eur. J. Biochem.* **52**: 475-480, 1975.
- Braun, H., Cogoli, A. and Semenza, G. Carboxyl groups at the two active centers of sucrase-isomaltase from rabbit small intestine. *Eur. J. Biochem.* **73**: 437-442, 1977.
- Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1315-1321, 1988.
- Brunner, J., Hauser, H., Braun, H., Wilson, K.L., Wacker, H., O'Neill, B and Semenza, G. The mode of association of the enzyme complex sucrase-isomaltase with the intestinal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* **254**: 1821-1828, 1979.
- Cerami, A., Vlassara, H. y Brownlee, M. Protein glycosylation and the pathogenesis of atherosclerosis. *Metabolism* **34**: 37-44, 1985.
- Cerami, A., Vlassara, H. and Brownlee, M. Glucosa y envejecimiento. *Investigación y Ciencia* pp. 52-59, 1987.
- Cezard, J.P., Conklin, K.A., Das, B.C. and Gray, G.M. Incomplete intracellular forms of intestinal surface membrane sucrase-isomaltase. *J. Biol. Chem.* **254**: 8969-8975, 1979.
- Cheftel, J.C., Cheftel, H. y Besançon, P. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos. Vol.1 pp.291-305, 1989.
- Climent, I., Tsai, L. and Levine, R.L. Derivatization of  $\gamma$ -glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal. Biochem.* **182**: 226-232, 1989.
- Cogoli, A., Mosimann, H., Vock, C., von Balthazar, A.-K. and Semenza, G. A simplified procedure for the isolation of the sucrase-isomaltase complex from rabbit intestine. Its aminoacid and sugar composition. *Eur. J. Biochem.* **30**: 7-14, 1972.

- Cogoli, A. and Semenza, G. A probable oxocarbanium ion in the reaction mechanism of small intestinal sucrase and isomaltase. *J. Biol. Chem.* **250**: 7802-7809, 1975.
- Conklin, K.A., Yamashiro, K.M. and Gray, G.M. Human intestinal sucrase-isomaltase. Identification of free sucrase and isomaltase and cleavage of the hybride into active distinct subunits. *J. Biol. Chem.* **250**: 5735-5741, 1.975.
- Cutler, R.G. Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 4664-4668, 1975.
- Dahlqvist, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **7**: 18-25, 1964.
- Dahlqvist, A. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **22**: 99, 1968.
- Dahlqvist, A. Assay of intestinal disaccharidases. *Enz. Biol. Clin.* **11**: 52, 1970.
- Dahlqvist, A. Assay of intestinal disaccharidases. *Scand. J. Clin. Invest.* **44**: 169-172, 1984.
- Dahlqvist, A., Auricchio, S., Semenza, G. and Prader, A. Human intestinal disaccharidases and hereditary disaccharide intolerance. The hydrolysis of sucrose, isomaltose, palatinose (isomalturose), and a 1,6-a-oligosaccharide (isomalto-oligosaccharide) preparation. *J. Clin. Invest.* **42**: 556-562, 1963.
- Danzin, C. and Ehrhard, A. Time-dependent inhibition of sucrase and isomaltase from rat small intestine by castanospermine. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**: 472-475, 1987.
- Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* **262**: 9895-9901, 1987.
- Davies, K.J.A. and Goldberg, A.L. Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 8227-8234, 1987a.
- Davies, K.J.A. and Delsignore, M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and terciary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9902-9907, 1987b.

- Dice, J.F. Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **257**: 14624-14627, 1982.
- Doell, R.G. and Kretchmer, N. Studies of small intestine during development. I. Distribution and activity of  $\beta$ -galactosidase. *Biochim. Biophys. Acta* **62**: 353-362, 1962.
- Doubek, W.G. and Ambrecht. Changes in intestinal glucose transport over the lifespan of the rat. *Mech. Ageing Dev.* **39**: 91-102, 1987.
- Dubs, R., Gitzelmann, R. and Lindenmann, J. Catalytically inactive sucrase antigen of rabbit small intestine: the enzyme precursor. *Helv. Paediat. Acta* **30**: 89-102, 1975.
- Farber, J.M. and Levine, R.L. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **261**: 4574-4578, 1986.
- Feracci, H. and Maroux, S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* **599**: 448-463, 1980.
- Flodin, N.W. The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis. *Mech. Ageing Dev.* **27**: 15-27, 1984.
- Forstner, G. and Forstner, J. Segmental distribution of soluble neutral maltase activity in suckling rat intestine. Levels vary independently of membrane-bound maltase and lysosomal enzymes during development. *Biochim. Biophys. Acta* **586**: 250-257, 1979.
- Francis, G.L. and Ballard, F.J. Enzyme inactivation via disulphide-thiol exchange as catalysed by a rat liver membrane protein. *Biochem. J.* **186**: 581-590, 1980.
- Frank, G., Brunner, J., Hauser, H., Wacker, H., Semenza, G. and Zuber, H. The hydrophobic anchor of small-intestinal sucrase-isomaltase. N-terminal sequence of the isomaltase subunit. *FEBS Lett.* **96**: 183-88, 1978.
- Friedenauer, S. and Berlet, H.H. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal. Biochem.* **178**: 263-268, 1989.

- Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J. and Stadtman, E.R. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 1521-1525, 1983.
- Fulcher, I.S., Pappin, D.J. and Kenny, A.J. The N-terminal amino acid sequence of pig kidney endopeptidase-24.11 shows homology with pro-sucrase-isomaltase. *Biochem. J.* **240**: 305-308, 1986.
- Gafni, A. Location of age-related modifications in rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **256**: 8875-8877, 1981.
- Gafni, A. Molecular origin of the aging effects in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **742**: 91-99, 1983.
- Gershon, D. Current status of age-altered enzymes: alternative mechanisms. *Mech. Ageing Dev.* **9**: 189, 1979.
- Gershon, H.E. and Gershon, D. Detection of inactive enzyme molecules in aging organisms. *Nature* **227**: 1214-1217, 1970.
- Gershon, H. and Gershon, D. Inactive enzyme molecules in aging mice: liver aldolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 909-913, 1973.
- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15, 1983.
- Ghera, P., Huber, P., Semenza, G. and Wacker, H. Cell-free synthesis, membrane integration, and glycosylation of pro-sucrase-isomaltase. *J. Biol. Chem.* **261**: 7969-7974, 1986.
- Gorin, P., Reznick, A., Reiss, U. and Gershon, D. Comparison of the isoelectric properties of nematode aldolase and rat liver superoxide dismutase from young and old animals. *FEBS Letters* **84**: 83-86, 1977.
- Golstein, S. and Harvey, C.B. In vitro studies of age-associated disease. *Fred. Proc.* **38**: 1862-1867, 1979.
- Gordillo, E., Ayala, A., Fernandez-Lobato, M., Bautista, J. and Machado, A. Possible involvement of histidine residues in the loss of enzymatic activity of rat liver malic enzyme during aging. *J. Biol. Chem.* **263**: 8053-8057, 1989.

- Gracy, R.J., Yüksel, K.V., Chapman, M.L., Cini, J.K., Jahani, M., Lu, H.S., Oray, B., and Talent, J.M. In Modification of proteins during aging. Adelman, R.C. and Dekker, E. eds. pp 1-18, 1985. Liss, New York.
- Hanover, J.A. and Lennarz, W.J. Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **211**: 1-19, 1981.
- Harding, J.J. Nonenzymatic covalent posttranslational modification of protein in vivo. In Advances in protein Chemistry vol. 37, 247 - 334, 1985. Academic Press.
- Harman, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7124-7128, 1981.
- Hartmann, C. Les gènes de la mort. *La Recherche* **167**: 838-839, 1985.
- Hauer-Jensen, M., Christensen, K., Wilson, H.D. and Schedl, H.P. Intestinal disaccharidase activity following pancreatic duct occlusion in the rat. *Pancreas* **2**: 295-302, 1987.
- Hauri, H.P., Quaroni, A. and Isselbacher, K.J. Biogenesis of intestinal plasma membrane: Posttranslational route and cleavage of sucrase-isomaltase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5183-33, 1979.
- Hauri, H.P., Quaroni, A. and Isselbacher, K. Biogenesis of intestinal plasma membrane: posttranslational route and cleavage of sucrase-isomaltase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 6629, 1980.
- Hauri, H.P. and Bucher, K. Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal. Biochem.* **159**: 386-389, 1986.
- Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A.M. and Marxer, A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **101**: 838-851, 1985.
- Hauri, H.P., Wacker, H., Rickli, E.E., Bigler-Meier, B., Quaroni, A. and Semenza, G. Biosynthesis of sucrase-isomaltase. *J. Biol. Chem.* **257**: 4522-4528, 1982.
- Hauser, H. and Semenza, G. Sucrase-isomaltase: a stalked intrinsic protein of the brush border membrane. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **14**: 319-345, 1983.

- Helenius, A. and Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79, 1975.
- Higgins, P.J. and Bunn, H.F. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **256**: 5204-5208, 1981.
- Holt, P.R. and Kotler, D.P. Adaptative changes of intestinal enzymes to nutritional intake in the aging rat. *Gastroenterology* **93**: 295-300, 1987.
- Hu, C., Spiess, M. and Semenza, G. The mode of anchoring and precursor forms of sucrase-isomaltase and maltase-glucoamilase in chicken intestinal brush-border membrane. Phylogenetic implications. *Biochim. Biophys. Acta* **896**: 275-286, 1987.
- Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G. and Lodish, H.F. The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. *Cell* **46**: 227-234, 1986.
- James, W.P.T., Alpers, D.H., Gerber, J.E. and Isselbacher, K.J. The turnover of disaccharidases and brush border proteins in rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **230**: 194-203, 1971.
- Kenny, J.A. and Maroux, S. Topology of microvillar membrane hidrolases of kidney and intestine. *Physiol. Rev.* **62**: 91-128, 1982.
- Kessler, H., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M. and Semenza, G. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **506**: 136, 1978.
- Knook, D.L. Aging of cells: accident or programme?. *Endeavour* **6**: 162-167, 1982.
- Koenig, R.L. and Cerami, A. Hemoglobin A<sub>1c</sub> and diabetes mellitus. *Ann. Rev. Med.* **31**: 29-34, 1980.
- Kolinska, J. and Semenza, G. Studies on intestinal sucrase and on intestinal sugar transport. V. Isolation and properties of sucrase-isomaltase from rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **146**: 181-195, 1967.

- Kraml, J., Kolinska, J., Kadlecova, L., Zakostelecka, M. and Lojda, Z. Analytical isoelectric focusing of rat intestinal brush-border enzymes: postnatal changes and effect of neuraminidase in vitro. *FEBS Letters* **151**: 193-196, 1983.
- Kuonen, D.R., Roberts, P.J. and Cottingham, I.R. Purification and analysis of mitochondrial membrane proteins on nondenaturing gradient polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **153**: 221-226, 1986.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *T4. Nature* **227**: 680-685, 1970.
- Lavie, L., Reznick, A. and Gershon, D. Decreased protein and puromycinyl-peptide degradation in livers of senescent mice. *Biochem. J.* **202**: 47-51, 1982.
- Lee, L. and Forstner, G. Quaternary structure of intestinal maltase-glucoamilase in pancreatectomized rats. *Cell Biol.* **65**: 392-397, 1987.
- Leichter, J. Intestinal disaccharidase activities in adult rats after chronic ethanol ingestion. *Biochem. Arch.* **3**: 337-342, 1987.
- Lenz, A.G., Costabel, U., Shaltiel, S. and Levine, R.L. *Anal. Biochem* **177**: 419-425, 1989.
- Levine, R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* **258**: 11823-11828, 1983.
- Levine, R.L. In *Methods in enzymology*. Wold, F. and Moldave, K. eds. 107: pp. 370-376, 1984. Academic Press, New York.
- Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M. and Stadtman, E.R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 2120-2124, 1981.
- Levitzki, A., Anbar, M. and Berger, A. Specific oxidation of peptides via their copper complexes. *Biochemistry* **6**: 3757-3765, 1967.
- Lischwe, M.A. and Ochs, D. A new method for partial mapping using N-Chlorosuccinimide/Urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **127**: 453-457, 1982.

- Lloyd, M.L. and Olsen, W.A. A study of the molecular pathology of sucrase-isomaltase deficiency. *N.Engl. J. Med.* **316**: 438-442, 1987.
- Lorenzsonn, V, Korsmo, H. and Olsen, W.A. Localization of sucrase-isomaltase in the rat enterocyte. *Gastroenterology* **92**: 98-105, 1987.
- Lund, E.K. and Smith, M.W. rat jejunal disaccharidase activity increases biphasically during early post-natal development. *J. Physiol.* **391**: 487-497, 1987.
- Ludwig, F.C. and Masoro, E.J. The measurement of biological age. *Exp. Aging Res.* **9**: 219-220, 1983.
- Machado, A., Satrústegui, J., Andrés, A., Vitorica, J., Cano, J. and Fabregat, I. Age related changes in enzyme activities linked to energy metabolism. In cardiology and ageing. Ed. by Platt, pp. 65-80. F.R.Schattauer Verlag. Sttugar-New York, 1983.
- Martinez del Rio, C. and Stevens, B.R. Intestinal brush border membrane-bound disaccharidases of the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**: 751-754, 1988.
- Martinez del Rio, C. and Stevens, B. Physiological constraint on feeding behavior: intestinal membrane disaccharidases of the starling. *Science* **243**: 794-796, 1989.
- Mizumo, K., Moriuchi, S. and Hosoya, N. Demonstration of sucrase-isomaltase complex in chick intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* **28**: 599-608, 1982.
- Monnier, V.M. and Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and browning of proteins in vivo. In: The maillard reaction in foods and nutrition. Waller GR, Feeather MS (eds). American Chemical Society Symposium series, 215. Am. Chem. Soc., Washington, 1983.
- Montgomery, R.K., Sybicki, M.A., Forcier, A.G. and Grand, R.J. Rat intestinal microvillus membrane sucrase-isomaltase is a single high molecular weight protein and fully active enzyme in the absence of luminal factors. *Biochim. Biophys. Acta* **661**: 346-349, 1981.

- Naim, H.Y., Roth, J. Sterchi, E.E., Lentze, M., Milla, P., Schmith, J. and Hauri, H.P. Sucrase-isomaltase deficiency in humans. Different mutations disrupt intracellular transport, processing and function of an intestinal brush border enzyme. *J. Clin. Invest.* **82**: 667-679, 1988.
- Nakamura, K., Oliver, C.N. and Stadtman, E.R. Inactivation of glutamine synthetase by a purified liver microsomal cytochrome P-450 system. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**: 319-239, 1985.
- Neville, D.M., Jr. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.* **246**: 6328-6334, 1971.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361-363, 1980.
- Offermann, M.K., McKay, M.J., Marsh, M.W. and Bond, J.S. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6 biphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **259**: 8886-8891, 1984.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Wittenberger, M.E. and Stadtman, E. Oxidative inactivation of enzymes: implication in protein turnover and aging. In: Cellular Regulation and Malignant Growth. Ebashi S (ed). Tokyo, Japan Scientific Societies Press, Berlin, Springer-Verlag, 1985, pp 320-331.
- Orgel, L.E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **49**: 517-521, 1963.
- Plaxton, W.C. and Moorhead, G.B.G. Peptide mapping by CNBr fragmentation using a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **178**: 391-393, 1989.
- Prakash, K., Patil, S.D. and Hegde, S.N. *Arch. International Physiol. Biochim.* **90**: 255-264, 1982.
- Quaroni, A. and Semenza, G. Partial amino acid sequences around the essential carboxylate in the active sites of the intestinal sucrase-isomaltase complex. *J. Biol. Chem.* **251**: 3250-3253, 1976.

- Reddy, M.K., Heda, G.D. and Reddy, J.K. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from rat pancreatic acinar carcinoma. *Biochem. J.* **242**: 681-687, 1987.
- Reinhart, M.P. and Malamud, D. Protein transfer from isoelectric focusing gels: the native blot. *Anal. Biochem.* **123**: 229-235, 1982.
- Reznick, A. and Gershon, D. The effect of age on the protein degradation system in the nematode, *Turbatrix aceti*. *Mech. Age. Dev.* **11**: 403, 1979.
- Reznick, A., Lavie, L., Gershon, D. and Gershon, H.E. Age-associated accumulation of altered FDP aldolase B in mice. *FEBS letters* **128**: 221-224, 1981.
- Riby, J.E. and Kretchmer, N. Effect of dietary sucrose on synthesis and degradation of intestinal sucrase. *Am. J. Physiol.* **246**: G757-G763, 1984.
- Riby, J.E. and Kretchmer, N. Participacion of pancreatic enzymes in the degradation of intestinal sucrase-isomaltase. *J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.* **4**: 971-979, 1985.
- Rivett, A.J. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* **260**: 300-305, 1985a.
- Rivett, A.J. Purification of liver alkaline protein which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **260**: 12600-12606, 1985b.
- Rivett, A.J. Roselman, J.E., Oliver, C.N., Levine, R.L. and Stadtman, E.R.. Covalent modification of proteins by mixed-function oxidation: Recognition by intracellular proteases. In: *Intracellular Protein catabolism*. Khairallah EA, Bond JS, Bird JWC (eds). New York, Alan R Liss, 1985, pp 317-326.
- Rodriguez, I.R., Tavarel, F.R. and Whelan, W.J. Characterization and function of pig intestinal sucrase-isomaltase and its separate subunits. *FEBS Letters* **145**: 575-582, 1984.
- Roseman, J.E. and Levine, R.L. Purification and characterization of an *E. coli* protease which degrades oxidized glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **262**: 2101-2110, 1987.

- Rothstein, M. In Biochemical Approaches to aging. Academic Press 1980.
- Rothstein, M. The alteration of enzymes in aging animals. In: Molecular Biology of Aging. Woodhead AD, Blackett AD, Hollaender A (eds). New York, Plenum Press, 1985, pp 193.
- Rothstein, M., Coppens, M. and Sharma, H.R. Effect of aging in enolase from rat muscle, liver and heart. *Biochem. Biophys. Acta* **614**: 591-600, 1980.
- Rothstein, M. In approaches to aging. Academic Press 1982.
- Rubino, A., Zimbalatti, F. and Auricchio S. Intestinal disaccharidase activities in adult and suckling rats. *Biochim. Biophys. Acta* **92**: 305-311, 1964.
- Salim, A.S. Gastric mucosal cytoprotection in the rat by cysteine. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**: 553-555, 1987.
- Schneider, L. Cell replication and aging: in vitro and in vivo studies. *Fed. Proc.* **38**: 1857-1861, 1979.
- Sebastio, G., Hunkizer, W., O'Neill, B., Malo, C., Menard, D., Auricchio, S. and Semenza, G. The biosynthesis of intestinal sucrase-isomaltase in human embryo is most likely controlled at the level of transcription. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **149**: 830-839, 1987.
- Sebastio, G., Hunziker, W., Ballabio, A., Auricchio, S. and Semenza, G. On the primary site of control in the spontaneous development of small-intestinal sucrase-isomaltase after birth. *FEBS Letters* **208**: 460-464, 1986.
- Semenza, G. Molecular pathophysiology of small-intestinal sucrase-isomaltase. *Clin. Gastroenterol.* **10**: 691, 1981.
- Semenza, G. Intestinal oligo- and disaccharidases. In: Carbohydrate Metabolism and its Disorders. vol. 3. Randle PJ, Steiner DF and Whelan WJ (eds) Academic Press. London 1981, pp 425.
- Semenza, G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**: 255-313, 1986.

- Semenza, G., Auricchio, S. and Rubino, A. Multiplicity of human intestinal disaccharidases. I. Chromatographic separation of maltases and of two lactases. *Biochim. Biophys. Acta* **96**: 487-497, 1965.
- Senegas-Balas, F., Balas, D., Bouisson, M. and Ribet, A. Effect of pancreatic duct ligation on the hamster intestinal mucosa. *Digestion* **21**: 83-91, 1981.
- Sharma, H.K. and Rothstein, M. Altered enolase in aged *Turbatrix acetii* from conformational changes in the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 5865-5868, 1980.
- Sia, C.L. and Horecker, B.L. Dissociation of protein subunits by maleylation. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **31**: 731-737, 1968.
- Sigrist, H., Ronner, P. and Semenza, G. A hydrophobic form of the small-intestinal sucrase-isomaltase complex. *Biochim. Biophys. Acta* **406**: 433-446, 1975.
- Sjöström, H., Norén, O., Christiansen, L., Wacker, H. and Semenza, G. A fully active, two-active-site, single-chain sucrase-isomaltase from pig small intestine. *J. Biol. Chem.* **255**: 11332-11338, 1980.
- Sjöström, H., Norén, O., Christiansen, L.A., Wacker, H., Spiess, M., Bibler-Meier, B., Rickli, E.E. and Semenza, G. N-Terminal sequences of pig intestinal sucrase-isomaltase and pro-sucrase-isomaltase. *FEBS Letters* **148**: 321-325, 1982.
- Spiess, M., Hauser, H., Rosenbusch, J.P. and Semenza, G. Hydrodynamic properties of phospholipid vesicles and of sucrase isomaltase-phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **256**: 8877-8882, 1981.
- Spiess, M., Brunner, J. and Semenza, G. Hydrophobic labeling, isolation, and partial characterization of the NH<sub>2</sub>-terminal membranous segment of sucrase-isomaltase complex. *J. Biol. Chem.* **257**: 2370-2377, 1982.
- Stadtman, E.R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *TIBS* **11**: 11-12, 1986.
- Stadtman, E. R. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **43**: B112-B120, 1988

- Stadtman, E.R. In *Medical, Biochemical and Chemical aspects of free radicals* pp. 11-19, 1989. Hayaishi, O., Niki, E., Kondo, M. and Yoshikawa, T. Eds. Elsevier, Amsterdam.
- Stadtman, E. R. Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochem.* **29**: 6323-6331, 1990.
- Stadtman, E.R. and Wittenberger, M.E. Inactivation of *Escherichia coli* glutamine synthetase by xanthine oxidase, nicotinate hydroxylase, horseradish peroxidase or glucose oxidase: effects of ferredoxin, putidaredoxin, and menadione. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**: 379-387, 1985.
- Swallow, A.J. In *Radiation Chemistry of Organic Compounds*. Swallow, A.J., Ed. pp. 221-224, 1960. Pergamon Press, New York.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R. and Shifrin, S. *Anal. Biochem.* **98**: 231-237, 1979.
- Taborsky, G. Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. Effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products. *Biochemistry* **12**: 1341-1348, 1973.
- Thankur, M.K. Age-related changes in the structure and function of chromatin: a review. *Mech. Ageing Dev.* **27**: 263-286, 1984.
- Thomson, A.B.R. and Keelan, M. The development of the small intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 13-29, 1986a.
- Thomson, A.B.R. and Keelan, M. The aging gut. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **64**: 30-38, 1986b.
- Tiruppathi, C., Alpers, D.H. and Seetharam, B. Phase separation of intestinal brush border membrane proteins using Triton X-114. *Anal. Biochem.* **153**: 330-335, 1986.
- Toncheva, E., Profirov, Y. and Voynova, R. Disaccharidase activity in intestine epithelium microvilli membranes of lambs during the first month after birth. *Arch. Anim. Nutr.* **37**: 321-326, 1987.

- Towbin, H. and Gordon, J. Immunoblotting and dot immunobinding- current status and outlook. *J. Immunol. Methods* **72**: 313-340, 1984.
- Triadou, N., Bataille, J. and Schmitz, J. Longitudinal study of the human intestinal brush border membrane proteins. Distribution of the main disaccharidases and peptidases. *Gastroenterology* **85**: 1326-1332, 1983.
- Triadou, N., Bataille, J. and Schmitz, J. Longitudinal study of the human intestinal brush border membrane proteins. Distribution of the main disaccharidases and peptidases. *Gastroenterology* **85**: 1326-1332, 1983.
- Triadou, N. Antigenic cross-reactions among human intestinal brush-border enzymes revealed by the immunoblotting method and rabbit anti-enzyme sera. *J. Immunol. Methods* **73**: 283- 291, 1984.
- Trout, G.E. *Anal. Biochem.* **93**: 419, 1979.
- Trugnan, G., Rousset, M., Chantret, I., Barbat, A. and Zweibaum, A. The posttranslational processing of sucrase-isomaltase in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. *J. Cell Biol.* **104**: 1199-1205, 1987.
- Tuengler, T. and Pfluetderer, G. *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 1-8, 1977.
- Uchida, K. and Kawakishi, S. Selective oxidation of imidazole ring in histidine residues by the ascorbic acid-copper ion system. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **138**: 659-665, 1986.
- Uchida, K. and Kawakishi, S. Ascorbate-mediated specific oxidation of the imidazole ring in a histidine derivative. *Biorganic Chem.* **17**: 330-343, 1989.
- Vinardell, M.P. Age influences on intestinal sugar absorption. *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**: 617-623, 1987.
- Vitorica, J., Andres, A., Satrústegui, J. and Machado, A. Age-related quantitative changes in enzyme activities of rat brain. *Neurochem. Res.* **6**: 127-136, 1981.
- Vitorica, J., Cano, J., Satrústegui, J. and Machado, A. Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart. *Mech. Ageing Dev.* **16**: 105-116, 1981.

- Vitorica, J., Satrústegui, J. and Machado, A. Metabolic implications of ageing: changes in activities of key lipogenic and gluconeogenic enzymes in the aged rat liver. *Enzyme* **26**: 144-152, 1981.
- Wacker, H., Jaussi, R., Sonderegger, P., Dokow, M., Ghera, P., Hauri, H.P., Christen, P. and Semenza, G. Cell-free synthesis of the one-chain precursor of a major intrinsic protein complex of the small-intestinal brush border membrane (pro-sucrase-isomaltase). *FEBS Letters* **136**: 329- 331, 1981.
- Wacker, H., Aggeler, R., Kretchmer, N., O'Neill, B., Takesue, Y. and Semenza, G. A two active site one-polypeptide enzyme: the isomaltase from sea lion small intestinal brush-border membrane. *J. Biol. Chem.* **259**: 4878-4884, 1984.
- Wojtyk, R.I. and Goldstein, S. *J. Cell. Physiol.* **103**: 299-303, 1980.
- Wold, F. and Moldave, K. (Ed) *Meth. Enzymol.* vol 106, 1984.
- Wolff, S.P., Garner, A. and Dean, R.T. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 27-31, 1986.
- Wright, B.E. and Davidson, P.F. Mechanisms of development and aging. *Mech. Aging Res.* **12**: 213-219, 1980.
- Yamasaki, R.B. y col.. *Anal. Biochem.* **111**: 220, 1981.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. María Dolores Mateos-Negado Negado Alonso titulada "Estudio de los cambios producidos durante el envejecimiento en las principales proteínas enzimáticas implicadas en los procesos digestivos" acordó otorgarle la calificación de Aptor Cum Laude

Sevilla, 27 de Junio

1991

El Vocal,

El Presidente

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,

El Doctorado,