III

MI APORTACIÓN AL ESTUDIO DEL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS.

Ilma. Sra. Dra. Dña. Maria Dolores Mateos-Nevado Alonso

Discurso
Leído el 14 de febrero de 2005, en el Solemne Acto de
Recepción Pública como Académica de Número

Y contestación por el
Ilmo. Sr. Dr. D. Juan Antonio Fernandez Tavira

Una vez que el Excmo. Sr. Presidente da posesión de su cargo a la recipiendoria, en nombre de S.M. El Rey, ésta abandona la Presidencia

La Dra. Mateos-Nevado Alonso,
con el Comandante de Marina de Sevilla y el Sr. Presidente

La Dra. Mateos-Nevado Alonso con D. Genaro Acosta Montenegro y Dª Encarnación Duque Barros

Excmo. Sr. Presidente
llmos. Sres. Académicos
Sras. y Sres.
Amigos

Me encuentro hoy ante ustedes para dar cumplimiento a lo prescrito en los Estatutos de esta Real Academia donde se contempla que los Académicos Numerarios electos habrán de leer su discurso de ingreso para poder tomar posesión de su plaza.

Quisiera expresar mi agradecimiento más sincero y profundo a los miembros de esta Corporación por el honor que me han otorgado de hacer realidad un sueño: el de pertenecer a esta Real Academia, a la que tan íntimamente me encuentro unida desde hace muchos años.

Quiero testimoniar públicamente mi alegría y mi profunda gratitud a todos los que con su voto posibilitaron la realidad de hoy y deseo en este acto hacer protestación de mi entusiasmo y de mi disponibilidad absoluta al servicio de la Academia y de sus miembros.

Pero mi agradecimiento en este acto tiene que necesariamente extenderse a quienes han sido los verdaderos artífices de la persona en la que me he convertido, y sin los que sin su incansable entrega, amor, comprensión, desvelos, enseñanzas, inculcación de principios morales y modelo de vida, esto no hubiera sido posible, y me refiero como no a mis padres de los que me siento profundamente orgullosa por haberlos tenido siempre a mi lado, de manera incondicional, apoyándome en todas mis decisiones.

Quisiera también agradecer la labor formadora de aquellas personas que fueron mis profesores y de las que aún sin serlo directamente aprendí de ellas y dejaron en mi una impronta indeleble.

La elección del tema a desarrollar en este discurso no fue tarea fácil. Deseaba elegir un tema ameno, que pudiera interesar a la mayoría de los oyentes, pero que a su vez fuera atractivo y que su contenido tuviera la profundidad científica necesaria para que resultara acorde con las nobles tareas científicas de esta Real Academia. En la medida de lo posible espero haberlo conseguido.

Durante mi licenciatura, el espíritu investigador me había ido cautivando poco a poco, consecuencia en gran medida del entusiasmo que mi padre me había inspirado, y que me llevó a querer profundizar en el conocimiento de la ciencia, al desarrollo de mi tesis doctoral, cuya materia me pareció oportuno que fuese sobre un tema relacionado con la Bromatología, ya que tenía a mi lado el privilegio de contar con un experto conocedor de la misma, además de ser una ciencia vivida muchos años en casa, en conversaciones, en la preparación y profundización de los temas a los que mi padre ha dedicado parte de su vida y que mi madre ponía en práctica en los exquisitos platos que preparaba.

Por otro lado tenía una gran inquietud por estudiar un tema tan apasionante como el conocimiento de los mecanismos que determinan la duración de la vida humana, el saber porqué y como envejecemos a efectos de comprender mejor y poder acercamos a una explicación de tal proceso.

Desde la más remota antigüedad el hombre intentó alargar la vida recurriendo a las más diversas estrategias. La filosofía helenística estaba convencida que el envejecimiento era un truco de la vida para tener más vida. Uno de los anhelos más constantes en la humanidad ha sido retrasar el envejecimiento, recuperar la juventud perdida e incluso alcanzar la inmortalidad.

Esta empresa evidentemente era demasiado amplia, así que era necesario ir acotando los temas que iban a ser objeto de mi estudio a la vez que planear la estrategia y establecer la táctica experimental a seguir.

Así, sin más, entramos, con humildad y reiterando nuestro agradecimiento por el enorme honor que hoy se nos concede, en el tema elegido: **"Mi aportación al estudio del proceso de envejecimiento de las enzimas digestivas".**

Durante el proceso del envejecimiento se producen alteraciones de órganos y tejidos, que van a dar lugar a un declinar de las funciones biológicas. En enzimas de origen y localización diferentes se producen, entren otros muchos, una serie de cambios estructurales y funcionales.

Entre las propiedades que sufren cambios encontramos la actividad enzimática, sensibilidad térmica, propiedades espectrales, cinéticas, sensibilidad e inactivación frente a proteasas. Es la pérdida de actividad en un gran número de enzimas uno de los fenómenos más generales y mejor conocidos de todos los que ocurren durante el envejecimiento, si bien este comportamiento no es general para todas las enzimas, ni se produce en todos los órganos, ya que aunque la mayoría pierden actividad, otras no sufren cambios e incluso en algunas se produce un aumento.

Otras propiedades entre las que se encuentran el peso molecular, la carga eléctrica, el comportamiento electroforético y la inmunodifusión, parecen no sufrir cambio alguno.

Las modificaciones estructurales de las enzimas asociadas al proceso de envejecimiento, así como los mecanismos por los que tienen lugar no se conocen bien, por lo que no se puede formular una teoría sólida de estos hechos, y lo que en realidad existen son hipótesis, que en unos casos más que en otros, dan respuestas parcialmente satisfactorias.

Entre las muchas hipótesis que tratan de explicar el envejecimiento, analizaremos brevemente la de las **modificaciones post-traduccionales no enzimáticas,** que en los últimos años ha ido acumulando importantes evidencias a su favor en la experimentación in vivo, observándose que cuando existe pérdida de actividad enzimática, ésta no suele ir acompañada de una disminución en la cantidad de enzima sino que lo que parece ocurrir es la acumulación de proteínas enzimáticas "alteradas", inactivas o con menor actividad como consecuencia de este tipo de modificaciones.

Entre los tipos de modificaciones post-traduccionales no enzimáticas se han sugerido, entre otros, la glicación y las modificaciones oxidativas como las principales vías responsables de la pérdida de actividad biológica observada en muchas proteínas durante el envejecimiento.

Resulta paradójico, a simple vista, que lo que más necesita la célula viva aerobia, el oxígeno y el compuesto que le sigue en importancia, la glucosa, sean los que van a causar más problemas en el envejecimiento.

La teoría de la glicación propone que la modificación de las proteínas por la glucosa y la reacción de **Maillard,** conducen al entrecruzamiento, polimerización y cambios en la fluorescencia de las proteínas. Para una proteína determinada, el grado de glicación depende de los grupos amino susceptibles de reaccionar y de la concentración de glucosa. Por eso la diabetes, enfermedad que se caracteriza por la presencia de concentración

elevada de glucosa en sangre, va asociada a un mayor deterioro funcional de los tejidos.

Las reacciones consideradas generalmente como responsables de la oxidación no enzimática de las proteínas, son aquellas que conducen a la formación de sustancias oxigenadas activas, entre las que podemos distinguir: los radicales libres oxigenados y los peróxidos. La producción de radicales libres es un factor clave que relaciona el daño oxidativo con el envejecimiento, la peroxidación eleva la susceptibilidad a la agresión oxidativa.

Cada vez parece estar más claro que las proteínas cuyos restos aminoacídicos han sufrido oxidación, presentan una mayor predisposición a la degradación proteolítica. Sin embargo, no está claro el por qué durante el envejecimiento se acumulan las proteínas marcadas o alteradas, si este fenómeno de oxidación, como hemos dicho antes, tiene lugar para favorecer la degradación de las mismas. Este acumulo de proteínas alteradas podría explicarse, entre otras razones, por la disminución del turnover de proteínas, debido a una disminución de la actividad proteolítica porque las proteasas fueran menos activas o se sintetizaran en menor cantidad, o debido a un incremento de la producción de sustancias oxigenadas activas o bien a una disminución de los sistemas de defensa y protección contra estas sustancias oxigenadas activas.

Actualmente a través de los distintos medios de comunicación se ha está realizando una amplia divulgación de la relación descrita anteriormente entre el envejecimiento y la existencia de radicales libres en el organismo, divulgación que ha ido pareja a la aparición en el mercado español de productos que por su contenido en sustancias antioxidantes pueden actuar como coadyuvante s contra el envejecimiento. En este abanico encontramos productos alopáticos provenientes de la industria farmacéutica así como otros relacionados con las medicinas alternativas: homeopatía, naturopatía, etc. Es en el campo de la cosmética donde aparecen íntimamente unidas la acción antirradicales libres a las propiedades antienvejecimiento. Por otro lado y conociendo a través de la ciencia bromatológica que muchas de estas sustancias antirradicalarias se encuentran en cantidades apreciables en determinado tipo de alimentos se está dando una orientación nutricional en este sentido aconsejándose el consumo de frutas y verduras como fuente natural de compuestos protectores de la acción de los radicales libres.

Son en las proteínas intracelulares, donde se han estudiado la mayoría de las manifestaciones que acompañan al proceso de envejecimiento y

que como hemos ido describiendo hasta ahora implican cambios estructurales y funcionales principalmente por modificaciones post-traduccionales no-enzimáticas, entre las que desempeñan un papel muy importante las oxidaciones.

Creyendo posible que el estudio de las disacaridasas del intestino delgado podría conducimos a descifrar al menos parcialmente las razones del envejecimiento celular en las proteínas de membrana, ya que hasta ahora el estudio del envejecimiento se había realizado principalmente en proteínas intracelulares, nos decidimos a iniciar la investigación, aun conociendo sus dificultades y que esto nos llevaría varios años de trabajo, seleccionando el complejo sacarasa-isomaltasa para centrar así en el objeto de nuestra tesis.

Las vellosidades del intestino delgado son proyecciones de la mucosa intestinal en forma de dedo. Las células absorbentes de las vellosidades se caracterizan por poseer en su superficie luminal, un borde estriado que constituye las microvellosidades o borde en cepillo del intestino delgado, y que aumenta entre 14 y 30 veces la superficie absorbente de la célula.

Las enzimas digestivas glicoproteícas, alcanzan diferentes profundidades en la membrana de las microvellosidades. 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.

El complejo sacarasa-isomaltasa constituye alrededor de un 10% de la proteína total de la membrana del borde en cepillo del intestino delgado. Se trata de una enzima compuesta por dos subunidades, sacarasa e isomaltasa.

Para nuestra investigación del complejo anteriormente descrito, se realizaron todos los ensayos en ratas Wistar jóvenes de 3-6 meses y viejas de 24-28 meses de edad, proponiendo una línea de trabajo basada en el siguiente esquema:

En una fase inicial determinamos la influencia de la edad sobre la variación de parámetros fisiológicos y bioquímicos como la longitud, contenido proteico y distribución de las actividades enzimáticas (sacarasa e isomaltasa) en los diferentes segmentos del intestino delgado, obteniendo los siguientes resultados:

La longitud total del intestino delgado no presenta diferencias significativas. El contenido en mucosa raspada, obtenida para un mismo segmento es siempre significativamente mayor en los animales viejos. En todos los segmentos del intestino delgado estudiados, la menor cantidad de mucosa se obtiene en el íleon distal, tanto en animales jóvenes como viejos.

El contenido proteico en homegeneizado de mucosa intestinal aumenta con la edad de una manera estadísticamente significativa,

Mientras que el de las membranas del borde en cepillo no presenta diferencias significativas.

Respecto al estudio de la variación de la actividad específica del complejo sacarasa-isomaltasa con la edad, encontramos que su actividad específica disminuye entre un 27-30%. Los niveles de actividad del complejo SI en el duodeno y yeyuno son significativamente superiores a los encontrados en el íleon, tanto para jóvenes como para viejos.

Esta pérdida progresiva de actividad a medida que el animal envejece, es más pronunciada a partir de los 20 meses de edad, aunque no se considera suficiente para impedir el desarrollo normal de la actividad funcional del organismo en la senectud.

Los resultados obtenidos en esta primera fase eran muy alentadores ya que habíamos comprobado que la perdida de actividad enzimática encontrada para enzimas intracelu1ares también se producía en el complejo SI, enzima de membrana. Los presentamos en el XIV Congreso de la SEB, donde tuvimos el enorme placer de coincidir con el profesor Semenza, de reconocido prestigio internacional en el estudio de las disacaridasas, quien mostró un gran interés por los resultados por nosotros expuesto, la evolución de nuestras investigaciones, y con quien intercambiamos diferentes criterios a seguir en un futuro para profundizar en las posibles causas que provocan la importante pérdida de actividad en esta enzima de membrana.

En una segunda fase se llevó a cabo el proceso de purificación del complejo SI, obteniendo que el porcentaje de recuperación de la actividad total, así como el rendimiento durante la purificación, no presentaba diferencias estadísticamente significativas, independientemente que el complejo proviniera de animales jóvenes o viejos, con 10 que descartábamos con estos resultados que la diferencia encontrada en la actividad específica fuera atribuible a una purificación selectiva de formas alteradas del

complejo enzimático. Una vez purificado procedimos a la separación de las subunidades del complejo mediante citraconilación tanto en jóvenes como en viejos.

La disminución de actividad específica observada con la edad, podría ser debida, a una disminución en la síntesis del complejo o a una acumulación de formas inactivas o menos activas, por 10 que con el fin de dilucidar estos extremos se procedió al estudio de la relación actividad/cantidad de enzima mediante la utilización de anticuerpos policlonales anti-sacarasa-isomaltasa y del anticuerpo monoclonal BBC 1-35/11/2, específico para la subunidad isomaltasa.

Estas investigaciones las llevamos a cabo en USA con una Beca del Ministerio de Educación y Ciencia y posteriormente con una de la Junta de Andalucía durante un periodo de ocho meses en el Centro de Biotecnología Avanzada en la Universidad de Rutgers, New Jersey trabajando con el Profesor Stanley Stein, con quien llevamos a cabo además de los estudios con los anticuerpos, varios proyectos de investigación entre el que destacamos la síntesis del propéptido de subtilisina una serinproteasa, que vieron la luz en publicaciones y congresos internacionales.

Los anticuerpos monoclonales fueron cedidos por el Profesor Quaroni de la universidad de Cornell, Ithaca (USA) estos anticuerpos son específicos de la subunidad isomaltasa.

Obtuvimos que la cantidad de anticuerpos, tanto de los policlonales como de los monoclonales, necesaria para inmunotitular una determinada cantidad de actividad (sacarasa o isomaltasa), es mayor en animales viejos que en jóvenes. Estos resultados evidencian la existencia de una mayor cantidad de moléculas enzimáticas parcial o totalmente inactivas en el tejido de animales viejos.

En una tercera fase se estudió la relación existente entre la pérdida de actividad con la edad y el estado de oxidación del complejo y de las subunidades separadas.

Para ello estudiamos el complejo SI titulando los restos aminoacídicos con sus reactivos específicos, determinando el papel que juega la oxidación de los restos aminoacídicos sobre la pérdida de actividad de este complejo durante el envejecimiento. Realizamos la titulación de grupos sulfidrilos, de restos de lisina, restos de histidina, de arginina, de metionina, por ser dichos restos los más vulnerables fisiológicamente a los procesos de modificación oxidativa. En teoría, si la molécula de joven y

viejo son exactamente iguales, el número de restos accesibles y por tanto titulables serían iguales.

De los resultados obtenidos observamos que existe una mayor sensibilidad de los restos de lisina e histidina, así como de los grupos sulfidrilos a las modificaciones con la edad, obteniendo diferencias estadisticamente significativas, tanto para el complejo como para sus subunidades por separado.

Las modificaciones de estos restos aminoacídicos pueden dar lugar a la formación de los correspondientes derivados carbonílicos, por lo que llevamos a cabo la cuantificación de grupos carbonilos para determinar el estado oxidativo de la molécula, procediendo a su titulación. Los resultados obtenidos re elan que existe un incremento claro del contenido de grupos carbonilos a medida que el animal envejece.

Con el fin de determinar si este hecho se producía en otras proteínas del intestino delgado, se realizaron determinaciones de los grupos carbonilos en homogeneizados de mucosa del intestino delgado, observándose que no es un proceso específico para dicho complejo, sino que parece ser un fenómeno general para todas las proteínas del intestino.

Por ultimo, se realizó el estudio de la inactivación del complejo-SI mediante sistemas de oxidación no enzimáticos catalizados por iones metálicos, denominados sistemas-MCO no enzimáticos, ya que en presencia de metales de transición, cobre o hierro, se producen reacciones que llevan a la formación de sustancias oxigenadas fuertemente citotóxicas.

La inactivación del complejo SI por el sistema-MCO no- enzimático ascorbato/Cu(I1)/02 conduce a una pérdida del 30% de actividad sacarasa y del 13 % de la actividad isomaltasa a las 3 horas de incubación, mientras que con el sistema ascorbatolFe(III)/02 se pierde un 20% de la actividad sacarasa y un 10% de la isomaltasa tras el mismo periodo de incubación.

Nos encontramos con que estos resultados eran totalmente diferentes a los datos presentados por otros investigadores para muchas de las enzimas intracelulares, en las que incubaciones de 1 a 2 horas con estos sistemas de oxidación conducen a una pérdida rápida y total de la actividad enzimática.

Nuestras investigaciones confirman que durante el envejecimiento, en el complejo SI (proteina de membrana) y en las disacaridasas existe una pérdida importante de actividad específica, y que ésta no es debida

a una disminución en la síntesis de la proteína, sino a la existencia de proteínas parcialmente inactivas, debido a una mayor susceptibilidad de restos aminoacidicos de lisina, histidina y grupos sulfidrilos a la oxidación, y que estos restos oxidados conducen a la formación sus derivados carbonilicos. Hemos comprobado que al someter el complejo y sus subunidades a sistemas de oxidación no- enzimáticos catalizados por metales cobre o hierro se producen perdidas ligeras de actividad lo que indica que el efecto de las sustancias oxigenadas activas sobre el complejo SI, así como sobre sus subunidades, no tiene lugar sobre el centro activo ni sobre ningún otro punto que pueda afectar directamente la estructura activa del complejo, por lo que todos estos cambios no influyen drásticamente en la supervivencia de los animales, como ocurre con los cambios acaecidos en otros sistemas, como por ejemplo el cardiovascular .

La técnica de detección inmunológica y de cuantificación de proteínas oxidadas por el método con digoxigenina-X-hidrazida fue puesta a punto por nosotros y publicada en la revista Bioencia, Biotecnología y Bioquímica, sirviendo hoy día como método de referencia internacional en trabajos sobre el en envejecimiento. Este procedimiento es muy específico ya que al no fijarse, en los pocillos de la microplaca, ni los polisacáridos ni los ácidos nucleicos, que interferían en otros ensayos en el caso de muestras no purificadas, se eliminan las dos primeras fuentes de error que presentan la mayoría de los métodos utilizados hasta entonces para la cuantificación de 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-digoxigenina (la fosfatasa alcalina) que permite la detección de grupos carbonilos en cantidades de picomoles. El ensayo cubre un rango de sensibilidad desde 1,26 a 126 picomoles.

Quisiera terminar diciendo que existen amplias evidencias que demuestran que una mayor resistencia al extrés oxidativo conduce a una mayor longevidad. Modificaciones de factores ambientales adversos, tales como la exposición a carcinógenos externos, entre los que encontramos las radiaciones UV o ionizantes y los agentes químicos o la restricción dietética pueden elevar la longevidad al disminuir las situaciones de extrés oxidativo.

Además de pretender añadir años a las expectativas de vida, el objetivo del tratamiento contra el envejecimiento debería ir dirigido a promover y mantener un estado de bienestar somático, psíquico y social adecuado, para que el individuo pueda disfrutar de forma más feliz y placentera

esos años que los avances de las ciencias biomédicas y de las nuevas tecnologías nos permitan ganar. En suma, los fármacos deber ser capaces de prevenir el deterioro progresivo de las funciones orgánicas a fin de que cada vez un número mayor de personas alcancen una vejez en plenas condiciones físicas e intelectuales y con una alta calidad de vida.

El significado de las palabras juventud, madurez y vejez, está íntimamente relacionado a la esperanza de vida, y puede variar mucho según la época, el país y el ambiente. La ancianidad no se presenta solo como una etapa más de la vida, como un reto personal y social y como un periodo privilegiado para el crecimiento personal y el compromiso. Cuando le preguntaron a Arthur Rubinstein, ya anciano, cómo se mantenía en la cumbre pianística mencionó tres estrategias ejemplo de sabiduría: abordar pocas obras, ensayar cada pieza insistentemente, y para compensar la pérdida en la velocidad mecánica de la interpretación, introducir más ritardantos antes de los momentos rápidos, de tal manera que el tempo de la interpretación se perciba más rápido de lo que es en realidad.

Según Jean Vieujeaun en uno de sus libros nos describe que la juventud no es un periodo de la vida, es un estado de espíritu, un efecto de la voluntad, una cualidad de la imaginación, una intensidad emotiva, una victoria del valor sobre la timidez, una predisposición a la aventura por encima de la inclinación a la comodidad. No nos hacemos viejos por haber vivido un cierto número de años. Nos hacemos viejos porque desertamos. Joven es aquel que se sorprende y se maravilla. Pregunta como un niño insaciable: ¿Y después? Desafía los acontecimientos y encuentra la alegría en el juego de la vida. Permanecerá usted joven tanto tiempo como se mantenga en estado de receptividad. Receptividad ante la belleza, a lo que es bueno y grande. Receptividad a los mensajes de la naturaleza, del hombre y del infinito.

Muchas gracias.