

Aminopeptidasas séricas humanas Una hipótesis de trabajo

M. Ramírez / I. Prieto / J. M. Martínez / M.^a J. Ramírez / A. Martínez
E. Hermoso / F. Alba

Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El término es básicamente sinónimo a los de *proteasas*, *proteinasas* y *peptidasas*, si bien éste último se refiere preferentemente a aquellos enzimas que utilizan péptidos (breves cadenas de aminoácidos) como sustrato, mientras que los sustratos de los dos primeros son proteínas de mayor peso molecular. Clásicamente estos enzimas se han dividido en *exopeptidasas* y *endopeptidasas*. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían en el interior de la proteína, sobre enlaces distantes a los extremos de la cadena (1). Debido a la amplia especificidad de sustrato de muchos de es-

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas distribuidos ubicuamente por tejidos y fluidos corporales, capaces de separar por hidrólisis, aminoácidos cercanos al terminal amino de pequeños péptidos y polipéptidos, así como de hidrolizar sustratos artificiales del tipo de las arilamidas, nitroanilidas u otros. Debido a su acción catalítica, no sólo pueden actuar inactivando péptidos, sino cambiando su actividad biológica, dando lugar a un nuevo péptido con propiedades diferentes a su precursor. En el presente trabajo nos centraremos brevemente en la descripción de las características bioquímicas y fisiológicas de algunas aminopeptidasas con funciones reguladoras sobre diversos péptidos circulantes y que además, han sido descritas como útiles en el diagnóstico de diversas patologías. No obstante, el objetivo fundamental se dirige a especular en torno a diversos aspectos de la regulación de estos enzimas a nivel general, pero más particularmente a nivel sérico, basándonos esencialmente en investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

tos enzimas y a la aparición de proteinasas que forman parte de complejos multicatalíticos (proteasomas) (2), deberíamos referirnos más bien a actividades más que a la acción de un enzima concreto, ya que un mismo enzima puede actuar sobre diferentes sustratos.

Las exopeptidasas que requieren un grupo alfa-amino libre se denominan *aminopeptidasas* (AP) si liberan aminoácidos individualmente, *di-*

peptidil aminopeptidasas, si liberan dipéptidos intactos, y *tripeptidil aminopeptidasas* si liberan tripéptidos enteros.

Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxílico terminal no sustituido de los péptidos se denominan *carboxipeptidasas*, si liberan aminoácidos libres y *dipeptidil carboxipeptidasas*, si liberan dipéptidos intactos.

Palabras clave: Aminopeptidasas. Suero. Esteroides sexuales.

Fecha de recepción: Marzo 1997.

Las *omega* peptidasas son una nueva clase de exopeptidasas capaces de separar residuos terminales que, o bien carecen de un grupo alfa-amino o alfa-carboxilo libre (por ejemplo: piroglutamil aminopeptidasa), o bien forman un enlace que afecta a un grupo carboxílico o amino no unido a un carbono alfa (por ejemplo: gamma-glutamil aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las AP se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un particular aminoácido N-terminal. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces alanil N-terminal se denominaría alanil aminopeptidasa. Similarmente, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos simples sirven para identificar sus requerimientos o preferencias por un residuo C-terminal (1). En el presente trabajo nos centraremos brevemente en la descripción de algunas aminopeptidasas con funciones reguladoras sobre diversos péptidos circulantes y que además, han sido descritas como útiles en el diagnóstico de diversas patologías. No obstante, el objetivo fundamental se dirige a especular en torno a diversos aspectos de la regulación de estos enzimas a nivel general, pero más particularmente a nivel sérico, basándonos esencialmente en resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

Aminopeptidasas

Leucina aminopeptidasa

La leucina aminopeptidasa (LeuAP) (EC 3.4.11.1) hidroliza preferentemente, pero no exclusivamente, enlaces peptídicos adyacentes a un residuo de leucina amino-terminal. Principalmente se ha estudiado en lente bovina y en hígado de cerdo. Es un zinc-metaloenzima, localizado generalmente en el citosol y que ha demostrado estar presente en hígado, pulmón, estómago, riñón, intestino, cerebro, suero y leucocitos, así como en otros tejidos (1). Se ha propuesto que la actividad enzimática de LeuAP puede actuar sobre sustratos endógenos del tipo de

las encefalinas (3), dinorfinas (4) o sustancia P (5). La LeuAP humana tiene un pH óptimo de 10, es activada por Mg^{2+} y Mn^{2+} e inhibida por Zn^{2+} , Co^{3+} , bestatina y amastatina (1).

La leucina aminopeptidasa es un enzima citosólico hepático y por lo tanto, un marcador de ruptura celular hepática. Incluso se ha sugerido que es un marcador de la hepatitis aguda, más sensible que las aminotransferasas. Los mayores niveles de LeuAP en suero se han encontrado en pacientes con hepatitis aguda debida a diversas causas. Niveles relativamente altos también se han encontrado en sueros de pacientes con hepatitis prolongada o crónica y con cirrosis. Sin embargo, sólo niveles ligeramente elevados se encontraron en enfermedades obstructivas hepáticas. Por otro lado, las actividades de LeuAP, alanina aminopeptidasa y γ -glutamylaminotransferasa fueron mayores en células linfoides que en linfocitos normales. Se ha postulado por tanto que la LeuAP sérica puede ser un marcador de proliferación linfocítica en infecciones virales agudas (6).

Alanina aminopeptidasa

La alanina aminopeptidasa (AlaAP) (EC 3.4.11.14) (aminopeptidasa M) cataliza la liberación de aminoácidos N-terminales, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y diferentes aminoácil- β -naftilamidas (arilamidas), con preferencia por derivados de la Ala, Met, Phe y en menor medida, otros aminoácidos. Se encuentra en gran cantidad de tejidos y fluidos del cuerpo y su pH óptimo es de 6.8. Varios isoenzimas órgano-específicos se localizan en el suero (6). La mayoría de la actividad circulante se cree que procede del hígado, mientras que la actividad encontrada en orina, parece que tiene su origen en el riñón. Sus niveles séricos están elevados en ciertas patologías, como adenocarcinoma de colon y páncreas, síndrome nefrótico y también en el embarazo (1). Su actividad aumenta significativamente en enfermedades hepato-biliares (7). En química clínica la determinación de AlaAP

en suero se usa para detectar o confirmar una obstrucción hepato-biliar (8). Además la AlaAP puede hidrolizar bradicinina (6), encefalinas (9) y también ha sido descrita como actividad angiotensinasa (10). Se confunde fácilmente con la LeuAP, sobre todo cuando se utiliza Leu-b-naftilamida como sustrato, aunque se sabe que son dos enzimas distintos. Puede también confundirse con la AlaAP unida a membrana, con la que posee muchas propiedades en común. La AlaAP está elevada durante la infancia y disminuye después de la pubertad. Sus valores son mayores en hombres que en mujeres y se ha descrito que aumenta con el consumo de alcohol y drogas, y en fumadores (6).

Arginina aminopeptidasa

La arginina aminopeptidasa (ArgAP) (EC 3.4.11.6) (aminopeptidasa B) está ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos. Cataliza específicamente la hidrólisis de residuos N-terminales Arg- y Lys- de péptidos y derivados de la β -naftilamida. Es típicamente activada por iones Cl^- , es inhibida competitivamente por la bestatina, pero no por puromicina ni por amastatina y su pH óptimo es 7 (1). Debido a su actividad exopeptidasa se le ha implicado en el metabolismo de la Met-encefalina (11) y angiotensina III (10). Sin embargo, la ArgAP también posee actividad endopeptidásica, habiéndose según esto implicado en el metabolismo de la neurotensina (12).

Cistina aminopeptidasa

La cistina aminopeptidasa (CysAP) (EC 3.4.11.3) hidroliza los enlaces peptídicos entre una cistina N-terminal y el residuo adyacente. En el caso de la oxitocina, su presunto sustrato fisiológico, el residuo adyacente es la tirosina. Por la acción de éste enzima se destruye la actividad biológica de esta hormona neurohipofisaria. Exhibe una amplia especificidad sobre diferentes a- β -naftilamidas. Es insensible a la bestatina y a aminoácidos hidrofóbicos, a diferencia

de otras AP séricas. Se ha localizado exclusivamente en el plasma de mujeres embarazadas y en la placenta humana y de otros primates. Sin embargo, el suero fetal y el fluido amniótico están libres de esta actividad enzimática. Sólo se han encontrado trazas en sangre de mujeres no embarazadas y ninguna en sangre de hombres. La placenta es una fuente rica en enzimas, pero la cistinil aminopeptidasa es una de las pocas relativamente específica de este tejido. Durante el embarazo la placenta libera la enzima en la circulación materna. Los niveles permanecen bajos en el primer trimestre y aumentan progresivamente durante el segundo y tercer trimestre hasta alcanzar un máximo cerca del embarazo a término, y declinan después del parto. Se cree que estos niveles elevados de CysAP son los responsables de prevenir un comienzo prematuro de las contracciones uterinas mediante la destrucción de la oxitocina. En los embarazos anormales, el aumento de la actividad de CysAP es a menudo inadecuado y errático. Cada vez se piensa más que la medida de actividad de CysAP sérica en mujeres embarazadas durante el curso de su embarazo, puede servir como indicador de la función feto-placentaria y su desarrollo, y que esta medida podría reemplazar otros métodos laboriosos que requieren la determinación de estrógenos totales urinarios o de pregnandiol (1). Por otro lado, se han detectado niveles bajos de CysAP sérica en la insuficiencia crónica placentaria antes de un parto prematuro. También ha demostrado poseer actividad angiotensinasa, habiéndose detectado niveles relativamente elevados en casos de pre-eclampsia y niveles bajos en el último estadio de una pre-eclampsia grave. En éste sentido, la aspartato aminopeptidasa, que también posee actividad angiotensinasa, muestra un descenso significativo en casos de pre-eclampsia. La CysAP también se ha descrito que aumenta en sueros de mujeres con adenocarcinoma ovárico, pero esto no está del todo demostrado (6). Hay que indicar además, que se ha descrito la actuación de la CysAP sobre la vasopresina neu-

rohipofisaria (13), aunque también podría sugerir su actuación sobre otros péptidos cuyo residuo N-terminal es la cistina, como es el caso de las endotelinas.

Glutamato aminopeptidasa

La glutamato aminopeptidasa (GluAP) (EC 3.4.11.7) (aminopeptidasa A) (angiotensinasa A), cataliza específicamente la hidrólisis de residuos no sustituidos de Glu- y Asp- β -naftilamidas y de péptidos. Es típico que los residuos glutamilos sean más fácilmente hidrolizados que los aspartilos. Tanto el grupo alfa-amino como el gamma-carboxilo deben estar libres, lo que se demuestra por la falta de actividad sobre residuos piroglutamilos, gamma-glutamilos, o de glutamina. Se inhibe por agentes quelantes como EDTA y EGTA así como por la amastatina. También la inhiben Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} . Es activada por Mn^{2+} y Ca^{2+} y ligeramente por Mg^{2+} y su pH óptimo es de 7.5. Se encuentra en suero y diferentes órganos de animales y es probablemente la aminopeptidasa responsable de la rápida destrucción de la angiotensina II. El incremento de la angiotensinasa observado durante el embarazo puede atribuirse probablemente al aumento de la síntesis de este enzima por la placenta (1). La aminopeptidasa A (GluAP y AspAP), parece estar, fundamentalmente unida a membrana y muy distribuida en tejidos corporales pero es especialmente abundante a nivel renal (14). La única aminopeptidasa que ha sido descrita como específica para aminoácidos dicarboxílicos es la GluAP y no hidroliza derivados arilamidas que contengan aminoácidos diferentes al glutámico o al aspártico, siendo esta actividad extensible a las angiotensinas naturales (15). Como veremos a continuación, la actividad de otro enzima, la aspartato aminopeptidasa, también podría ser responsable de la hidrólisis de residuos Asp- amino-terminales.

Aspartato aminopeptidasa

La aspartato aminopeptidasa (AspAP) (EC 3.4.11.-) (angiotensinasa), cataliza la hi-

drólisis del aminoácido N-terminal de péptidos y arilamidas, siempre que éste sea un aminoácido dicarboxílico. Los restos aspartilos son hidrolizados más rápidamente que los restos glutamilos y no afecta a otros aminoácidos. Tiene un pH óptimo de actuación, de 7.5 y es activada por Mn^{2+} , pero, a diferencia de la GluAP, no se afecta por Ca^{2+} , ni es inhibida por EDTA (15). Al igual que la GluAP, la AspAP parece ser un enzima fundamentalmente unido a membrana y muy abundante a nivel renal (16). Su rápida acción sobre los residuos de ácido aspártico N-terminales de los péptidos sugiere, al igual que la GluAP, una posible función fisiológica en la degradación de la angiotensina II y su conversión en angiotensina III (15). Pero además, la AspAP tiene el potencial de actuar sobre residuos de Asp amino-terminales de péptidos diferentes a la Ang II, como podrían ser el octapéptido colecistocinina (26-33) o el tetrapéptido colecistocinina (26-29). Por último, ya hemos comentado anteriormente que la aspartato aminopeptidasa, muestra un descenso significativo en casos de pre-eclampsia (6).

Piroglutamato aminopeptidasa

La piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) (EC 3.4.19.3), con un pH óptimo de 7.5, es una omega peptidasa que cataliza la liberación hidrolítica de grupos piroglutamilos (pGlu-) N-terminales de arilamidas y de pequeños péptidos y polipéptidos. Este enzima está ampliamente distribuido en la escala animal en los tejidos y fluidos corporales y ha demostrado actuar sobre diversos péptidos biológicamente activos como son fundamentalmente la TRH y la LHRH. Potenciales sustratos naturales pueden ser también la neurotensina, bombesina o el péptido anorexogénico. Además, actúa sobre sustratos artificiales del tipo de las aminoacil-b-naftilamidas (17-19).

Hipótesis de trabajo

Históricamente, la ruptura enzimática de las proteínas se ha asociado generalmente

con la digestión proteica y pronto atrajo la atención de fisiólogos y bioquímicos, cuyo interés se dirigió hacia el proceso de digestión de proteínas en animales y seres humanos. Por lo tanto, las proteasas digestivas de las secreciones gástricas y pancreáticas, se encuentran entre los enzimas mejor caracterizados y gran parte del conocimiento actual sobre la estructura proteica y sobre la función enzimática, se ha derivado del estudio de éstos enzimas proteolíticos. Más recientemente, la atención de los investigadores se ha focalizado sobre el papel regulador de los enzimas proteolíticos en una amplia variedad de procesos fisiológicos, entre los que podemos citar la cascada de la coagulación, el sistema renina-angiotensina, el sistema de las cininas etc. (20).

Efectivamente, los enzimas proteolíticos gozan de un interés muy extendido entre la comunidad científica debido a que pueden ser utilizados como herramientas muy valiosas desde diversos puntos de vista. Para los químicos y clínicos, las proteasas son herramientas o sondas para estudiar la estructura de las proteínas, o para relacionarlas con procesos patológicos. Para los bioquímicos o fisiólogos, su interés se dirige hacia el estudio de las propiedades intrínsecas de éstos enzimas y para el análisis de las modificaciones que inducen en los sistemas fisiológicos. Los enzimas proteolíticos están implicados en múltiples e importantes procesos fisiológicos que van desde la activación o inactivación de péptidos biológicamente activos, hasta la completa disolución proteica en sus componentes aminoácidos y han llegado a ser objetivos de un amplio rango de investigaciones básicas y también aplicadas a la terapéutica (21).

Centrándonos en el marco específico de las aminopeptidasas, como ya hemos indicado anteriormente, son enzimas proteolíticos distribuidos ubicuamente en tejidos y fluidos corporales, capaces de separar por hidrólisis, aminoácidos cercanos al terminal amino de péptidos, así como hidrolizar sustratos artificiales del tipo de las arilamidas, nitroamidas u otros. Debido a su acción

catalítica, no sólo pueden actuar inactivando péptidos, sino también, dando lugar a un nuevo péptido con propiedades diferentes a su precursor. Un ejemplo muy ilustrativo de ésta doble propiedad, es el de su participación en la cascada enzimática del sistema renina-angiotensina (22) (fig. 1), pero además, existen otros múltiples ejem-

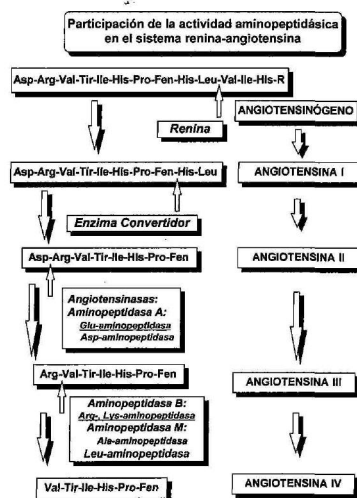


Figura 1.—Participación de la actividad aminopeptidásica en el sistema renina-angiotensina. La renina, una endopeptidasa que actúa en el interior de la cadena peptídica del sustrato angiotensinógeno, da lugar a la angiotensina I. Sobre éste péptido aún inactivo, actúa el enzima convertidor de angiotensina, una dipeptidil-carboxipeptidasa que separa el dipéptido carboxi-terminal His-Leu, para dar lugar al péptido más activo del sistema, la angiotensina II. Esta es hidrolizada por diversas angiotensinasas, principalmente por la glutamato aminopeptidasa, separando el Asp amino-terminal y dando lugar a la angiotensina III, que también posee actividad biológica. A continuación, sobre la Ang III actuarían otras aminopeptidasas, principalmente la aminopeptidasa B, para separar la Arg N-terminal y dar lugar a la angiotensina IV, que también ha demostrado poseer actividad biológica.

plos que ilustran las propiedades funcionales de las aminopeptidasas. Podríamos citar su participación en el sistema de las cininas, la activación de péptidos opiáceos a partir de sus precursores inactivos, la inactivación de hormonas como la oxitocina, vasopresina, hormonas hipofisiotropas etc.

Las aminopeptidasas séricas humanas han sido utilizadas, fundamentalmente en bioquímica clínica, como marcadores para diversas patologías, como ya hemos podido comprobar anteriormente. Debido a su escasa especificidad, sobre todo de la alanina aminopeptidasa, su determinación se ha relegado a un segundo plano. Esta inespecificidad se refiere tanto a que reflejan la existencia de diversas patologías, como a que actúa sobre diversos sustratos. Sin embargo, en suero no sólo está presente la alanina aminopeptidasa, sino que existen otras aminopeptidasas, como el caso de la aminopeptidasa A, oxitocinasa y otras, mucho más específicas y que probablemente actúan sobre un número más limitado de sustratos endógenos. Además, las aminopeptidasas séricas no sólo son un reflejo de la existencia de diversas patologías, sino que también juegan un papel fisiológico en la regulación de hormonas peptídicas circulantes. Por lo tanto, cabe esperar que los cambios fisiológicos hormonales, se reflejen de alguna manera en ésta actividad hidrolítica. Sin embargo, a pesar de su papel regulador, pocos estudios sobre la actividad aminopeptidásica de sueros humanos, se han dirigido a comprobar su participación en procesos fisiológicos y a tratar de relacionarla con el estado hormonal del sujeto.

Tenemos que indicar que, en condiciones fisiológicas, el origen de las aminopeptidasas séricas es hasta ahora desconocido y no hay evidencias de que exista una secreción activa desde uno o diversos tejidos. La aminopeptidasa A o actividad similar, parece ser fundamentalmente unida a membrana, se encuentra muy distribuida en tejidos corporales siendo especialmente abundante a nivel renal (14). Sin embargo, esta actividad

está presente a nivel plasmático, aunque su origen es aún incierto. Se ha sugerido que mediante la autólisis del enzima unido a membrana, éste puede llegar a ser soluble en plasma (23), como también ocurre con el enzima convertidor de angiotensina, que aparece en plasma tras autólisis del enzima unido al endotelio vascular (23). Por otro lado, la mayor parte de la actividad circulante de alanina aminopeptidasa se cree que procede del hígado (1), probablemente también por autólisis del enzima unido a membrana. Al igual que estos ejemplos, podemos incluir el resto de aminopeptidasas plasmáticas cuyo origen es aún desconocido.

En cualquier caso, no parece probable que la regulación fundamental de la actividad de las aminopeptidasas plasmáticas se lleve a cabo a través de una síntesis y una secreción activa, más bien podríamos pensar en una regulación pasiva, dependiendo del entorno bioquímico existente ante determinadas condiciones fisiológicas o patológicas.

Es bien conocida la dependencia de la actividad enzimática, de las condiciones de pH y de la presencia de activadores o inhibidores fisiológicos, como hemos podido comprobar en la breve revisión anterior. En éste sentido, algunos autores no apoyan el concepto de peptidasas específicas para determinados sustratos endógenos, sino que más bien se tiende a pensar en la existencia de un número relativamente pequeño de exopeptidasas y endopeptidasas, con lugares activos preferentemente de oligopéptidos. Estos lugares activos exhiben una amplia especificidad de sustrato, que vendría definida por diversas características químicas básicas, como por ejemplo, un entorno hidrofóbico o cargado, o bien, una determinada conformación peptídica. A nivel cerebral, la localización de neuronas que expresen una determinada peptidasa también sería importante para determinar la especificidad biológica y el papel del enzima en el control de la actividad del neuropéptido. Esta idea no se compromete con la amplia especificidad de sustrato de las

peptidasas. De hecho, esto puede ser importante ya que hay evidencias de la secreción de más de un péptido por una neurona. En tales circunstancias, un péptido podría regular la concentración de otro compitiendo por un determinado enzima. Si varios péptidos están presentes simultáneamente en una sinapsis, donde también se encuentra el enzima, la concentración de éstos podría ser importante para la actividad del enzima. El péptido que alcance la K_m del enzima, sería el susceptible de hidrólisis por parte de éste (24). A nivel sérico, trabajos previos nos han demostrado la existencia de cambios significativos en la actividad aminopeptidásica, a lo largo del ciclo estral de ratas (fig 2). La actividad hidrolítica presentaba un máximo en la fase de proestro, descendía durante el estro, para finalmente mostrar un mínimo

durante el diestro (25-27). Estos cambios acontecen paralelos a los cambios en el contenido de esteroides sexuales y gonadotropinas observados en suero de ratas (28). Por lo tanto, tales resultados sugieren una influencia de los esteroides gonadales, sobre la actividad de aminopeptidasas séricas, lo cual a su vez induce a pensar en la posibilidad de que tales sustancias contribuyan a crear un entorno bioquímico, que regule en parte la actividad de éstos enzimas hidrolíticos. Resultados posteriores han venido a apoyar esta hipótesis, aunque de forma indirecta. En ratas macho, hemos demostrado cambios significativos en la actividad aminopeptidásica, durante el desarrollo y envejecimiento (16). La actividad peptidásica demostró ser mayor en ratas jóvenes y envejecidas, que en los animales adultos.

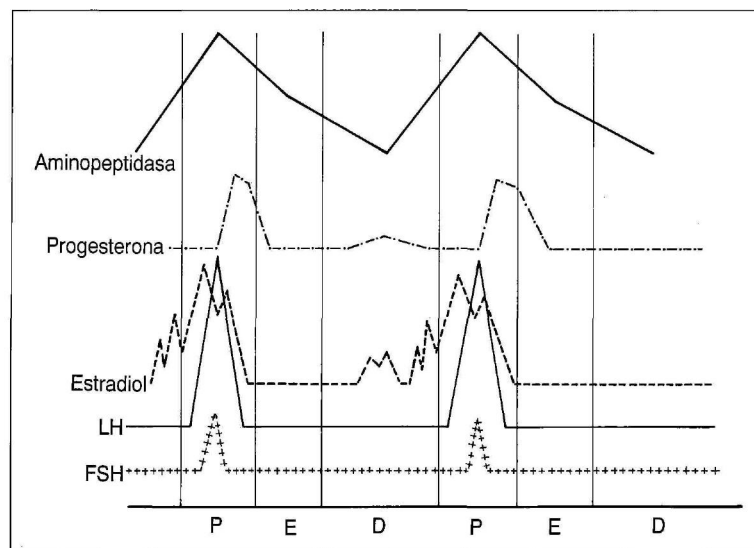


Figura 2.—Representación esquemática que indica la evolución de los niveles séricos de gonadotropinas, esteroides sexuales y actividad aminopeptidásica, durante las distintas fases del ciclo del estro en ratas. P, proestro. E, estro. D, diestro. (Modificado de SMITH y cols, 1975 y de GANDARIAS y cols, 1988, 1989, 1990).

Como se observa en la figura 3, en comparación con ratas de un mes de edad, la actividad desciende a los seis meses, llegando hasta un mínimo a los doce meses de edad, una vez que el animal ha alcanzado completamente la homeostasis adulta. Sin embargo, durante el desarrollo inicial, cuando el animal aún no está sexualmente maduro, así como en edades avanzadas, cuando declina la actividad sexual, se observa un pico en la actividad aminopeptidásica. Este modelo de desarrollo es opuesto al de síntesis y secreción de testosterona (29), con un incremento en edades tempranas y un descenso en edades avanzadas, lo cual nos vuelve a sugerir que los esteroides sexuales puedan ejercer alguna influencia sobre la actividad aminopeptidásica (en este caso en sentido opuesto al de las hembras). Resultados más recientes avalan esta idea, ya que hemos estudiado in vitro la actividad ami-

nopeptidásica en sueros de ratas macho, en ausencia y en presencia de diversos tipos de esteroides (30). Los datos demuestran un efecto inhibitorio directo de los esteroides sobre la actividad peptidásica (fig 4).

Por otro lado, hemos obtenido otros resultados que, aunque en principio parecen no estar directamente relacionados con la hipótesis global que estamos discutiendo en este trabajo, pudieran presentar una conexión, al menos indirecta. Tales resultados se refieren a existencia de una influencia de la luz y la oscuridad ambientales, sobre la actividad aminopeptidásica. Estos enzimas exhiben cambios significativos a lo largo del día (31-36), lo cual sugiere que están sujetos a un ritmo circadiano, que bien pudiera estar condicionado a la influencia de los ritmos circadianos de liberación de otras sustancias endógenas. Además, hemos demostrado la influencia de unas condiciones

22

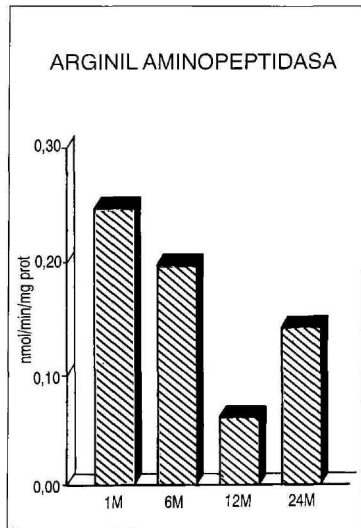


Figura 3.—Niveles de actividad de arginil aminopeptidasa en suero de ratas macho de 1 mes, 6 meses, 12 meses y 24 meses de edad. (Modificado de RAMÍREZ y cols., 1993).

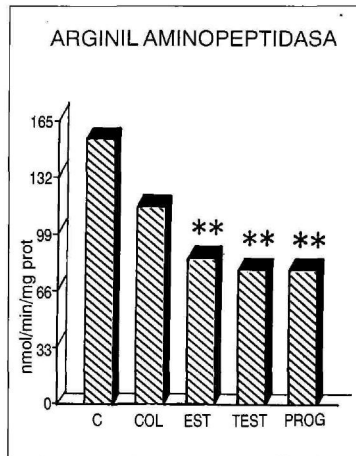


Figura 4.—Niveles de actividad de arginil aminopeptidasa en suero de ratones macho, tras incubar con solución de sustrato (control) (C) y tras incubar con solución de sustrato que contenía colesterol (COL), estradiol (EST), testosterona (TEST) o progesterona (PROG). ** $p < 0.01$. (Modificado de MARTÍNEZ y cols., 1997).

de luz y oscuridad ambientales sobre la actividad aminopeptidásica (37,38). Como se observa en la figura 5, las condiciones de oscuridad inducen a una activación de la actividad aminopeptidásica en suero de ratas macho, además de en otras zonas cerebrales. En este sentido, se ha hipotetizado sobre la existencia de un eje pineal-hipotálamo-hipófisis que regularía la liberación de gonadotropinas. La melatonina actuaría como un factor inhibidor de la secreción de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH). Aunque en seres humanos esto no se ha demostrado concluyentemente, en animales, una fase de oscuridad aumentada daría lugar a una mayor liberación de melatonina, lo que en definitiva inhibiría la función gonadal (39). La glándula pineal recibe información de la luz y oscuridad ambientales, a través de una conexión retino-hipotálamo-pineal (40),

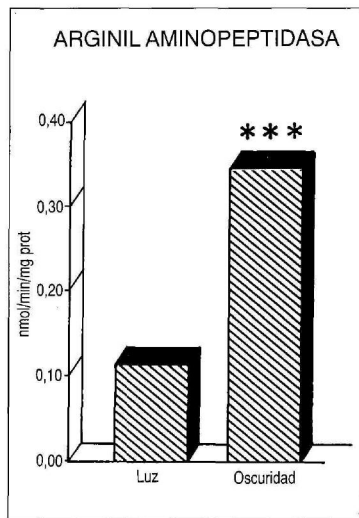


Figura 5.-Niveles de actividad de arginil aminopeptidasa en suero de ratas macho tras someterlas a unas condiciones de luz y oscuridad constante. *** $p < 0.001$. (Modificado de SÁNCHEZ y cols., 1997).

y está bien descrito el ritmo circadiano de liberación de melatonina, con altos niveles durante las horas de oscuridad y bajos durante las horas diurnas. Un aumento de la fase de oscuridad durante el período invernal aumentaría los niveles de melatonina y consecuentemente el animal tendría inhibida su capacidad reproductora durante ese período. Al aumentar el período de luz a la llegada de la primavera, los niveles de melatonina disminuirían, dejaría de

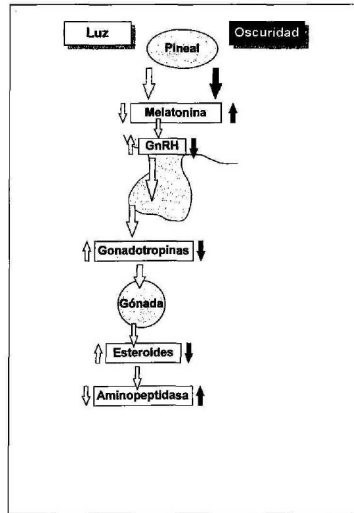


Figura 6.-Modelo en el que se hipotetiza una posible relación entre unas condiciones de luz y oscuridad y la actividad de aminopeptidasas séricas en ratas macho. El modelo implicaría bajos niveles de melatonina en condiciones de períodos de luz ambiental normales o prolongados, por lo tanto, el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, actuaría manteniendo unos niveles normales o elevados de esteroides sexuales. Sin embargo, en períodos de oscuridad normales o prolongados, el aumento de melatonina resultante, inhibiría el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, reduciendo los niveles de esteroides y como consecuencia, aumentando la actividad aminopeptidásica.

estar inhibido el eje hipotálamo-gonadal y el animal podría llevar a cabo el proceso reproductivo. De acuerdo con lo anterior, podríamos especular en torno a una conexión entre la liberación de melatonina y nuestras investigaciones sobre la actividad aminopeptidásica. Limitándonos a nuestros resultados en ratas macho, un modelo hipotético (fig 6) implicaría bajos niveles de melatonina en condiciones de períodos de luz ambiental normales o prolongados, por lo tanto, el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, actuaría manteniendo unos niveles normales o elevados de esteroides sexuales. Sin embargo, en períodos de oscuridad normales o prolongados, el aumento de melatonina resultante, inhibiría el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, reduciendo los niveles de esteroides y como consecuencia, aumentando la actividad aminopeptidásica. De acuerdo con todos estos resultados, podemos sugerir que, independientemente de que existan mecanismos activos de regulación de la actividad de aminopeptidasas sé-

ricas, los esteroides sexuales participan en la conformación de un entorno bioquímico que regula en parte la actividad de éstos enzimas. Esto es importante, ya que cambios, por motivos fisiológicos o patológicos, en los niveles séricos de esteroides pueden modular la actividad hidrolítica de las aminopeptidasas y consecuentemente influir en el estado funcional de las hormonas susceptibles de ser hidrolizadas por ellas, lo cual, una vez demostrado concluyentemente, debería ser tenido en cuenta para una valoración global del estado hormonal del sujeto. ◀

M. Ramírez, I. Prieto, J. M. Martínez,
M.^a J. Ramírez, A. Martínez, F. Hermoso
y E. Alba, *Area de Fisiología, Universidad
de Jaén.*

Bibliografía

1. McDONALD, JK. and BARRETT, AJ.: *Mammalian proteases: A glossary and bibliography*, 1986, vol 2. Academic Press, London.
2. RIVETT, AJ.; MASON, GGF; DJABALLAH, H.; SAVORY, PJ.; PALMER, A., and KNECHT, E.: «Structure, activities and subcellular localization of the rat liver multicatalytic proteinase complex (proteasome)». En: *Proteolysis and protein turnover*: Bond, JS. and Barret, AJ., eds. 1993. Portland Press. London, págs. 51-56.
3. SCHNEBLI, HP; PHILLIPS, MA., and BARKALY, RK.: «Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain». *Biochim Biophys Acta*, 1979. 569:89-98.
4. BERG, MJ., and MARKS, N.: Formation of des-Tyr-dinorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 1989. 11:313-321.
5. GREENFIELD, SA., and SHAW, LJ.: «Release of acetyl-cholinesterase and aminopeptidase in vivo following infusion of amphetamine into the substantia nigra». *Neuroscience*, 1982. 7:2823-2893.
6. SANDERINK, GJ.; ARTUR, Y., and SIEST, G.: «Human aminopeptidases: A review of the literature». *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*, 1988. 26:795-807.
7. HAFKENSCHIED, JCM.: «Aminopeptidases and aminoacid arylamidases». En: *Bergmeyer, HU.*, ed. *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed. 1984. Verlag Chemie Publ. Weinheim.
8. TOKIOKA-TERAO, M.; HIWADA, K., and KOKUBU, T.: «A radioimmunoassay for the measurement of aminopeptidase (microsomal) in human serum». *Enzyme*, 1985. 33:181-187.
9. HERSH, LB.: «Characterization of membrane-bound aminopeptidases from rat brain: Identification of the enkephalin-degrading aminopeptidase». *J. Neurochem.*, 1985. 44:1427-1435.
10. AHMAD, S., and WARD, PE.: «Role of aminopeptidase activity and the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1990. 252:643-650.
11. JOHNSON, CD., and HERSH, LB.: «Studies on the subsite specificity of the rat brain puromycin-sensitive aminopeptidase». *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990. 276:305-309.
12. MCDERMOTT, JR.; MANTLE, D.; LAWFORT, B.; GIBSON, AM., and BIGGINS, A.: «Purification and characterization of two soluble Cl⁻ activated arginyl aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptides». *J. Neurochem.*, 1988. 50:176-182.
13. ITOH, C., and NAGAMATSU, A.: «An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization». *Biochim. Biophys. Acta*, 1995. 1243:203-208.
14. LOJDA, Z., and GOSSRAU, R.: «Study on aminopeptidase A». *Histochemistry*, 1980. 67:267-290.
15. CHEUNG, HS., and CUSHMAN, DW.: «A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney». *Biochem Biophys Acta*. 1971. 242:190-193.
16. RAMÍREZ, M.; ARCHAGA, G.; SÁNCHEZ, A.; OZAITA, A., and LARDELLI, P.: «Developmental and ageing changes in aminopeptidase activities in selected tissues of the rat». *Experientia*, 1993. 49:300-303.
17. BAUER, K.: «Role of proteolytic enzymes in neuropeptide metabolism». *INSERM*, 1982. 110: 475-494.
18. BAUER, K.: «Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): Regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones». *Biochimie*, 1988. 70:69-74.
19. CUMMINS, PM., and O'CONNOR, B.: «Bovine brain pyroglutamyl aminopeptidase (Type-1): Purification and characterisation of a neuropeptide-inactivating peptidase». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1996. 28:883-893.
20. NEURATH, H.: «The diversity of proteolytic enzymes». In: Beynon, RJ.; Bond, JS.: *Proteolytic enzymes, a practical approach*, 1994. Oxford University Press, Oxford, págs 1-13.
21. BEYNON, RJ., and BOND, JS.: *Proteolytic enzymes, a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, 1994.
22. DE GASPARO, M.: «Tratamiento de la hipertensión: nueva perspectiva». *Sem. Méd.*, 1997. 49:41-57.
23. WRIGHT, JW., and HARDING, JW.: «Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₃ and their functions». *Regul pept*, 1995. 59:269-295.
24. WHITE, JD.; STEWART, KD.; KRAUSE, JE., and MCKELVI, JF.: «Biochemistry of peptide-secreting neurones». *Physiol Rev*, 1985. 65:553-606.
25. DE GANDARIAS, JM.; CASIS, L.; IIRAZUSTA, J.; ECHEVARRÍA, E., and RAMÍREZ, M.: «Changes of aminopeptidase activity levels in serum and brain during the estrous cycle of the rat». *Horm. Metab. Res.*, 1988. 20:776.

26. DE GANDARIAS, JM.; CASIS, L.; IRAZUSTA, J.; ECHEVARRÍA, E.; ARECHAGA, G., and RAMÍREZ, M.: «Lys- and Tyr-arylamidase activities in serum and brain during the estrous cycle of the rat». *Acta Endocrinol.*, 1989. 121:671-673.
27. DE GANDARIAS; RAMÍREZ, M.; ECHEVARRÍA, E.; IRAZUSTA, J., and CASIS, L.: «Serum and brain aminopeptidase activities in cyclic rats». *Gen. Physiol. Bioph.*, 1990. 9:385-389.
28. SMITH, MC.; FREEMAN, ME., and NEIL, JD.: «The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy». *Endocrinology*, 1975 96: 219-226.
29. GRIFFIN, JE., and WILSON, JD.: «The testis. en: Bondy PK and Rosenberg LE, dir»: *Metabolic control and disease*, 3.^a e. Philadelphia, Saunders, 1980, 1535-1578.
30. MARTÍNEZ, JM.; PRIETO, I.; RAMÍREZ, MJ.; ALBA, E., and RAMÍREZ, M.: «Cholesterol and steroids action on aminopeptidases». *Bioch. Soc. Trans.*, 1997. 25:113S
31. RAMÍREZ, M.; ARECHAGA, G.; SÁNCHEZ, B.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D., and DE GANDARIAS, JM.: «Diurnal variation of leucyl-aminopeptidase activity in the rat hypothalamus». *Horm. Metab. Res.*, 1991. 23:452-453.
32. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D., and DE GANDARIAS, JM.: «Diurnal variation and left-right distribution of pyroglutamyl peptidase I activity in the rat brain and retina». *Acta Endocrinol.*, 1991. 125:570-573.
33. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D., and DE GANDARIAS, JM.: «Circadian rhythm in Leu- β -naphthylamide hydrolysing activity in selected photoneuroendocrine areas of adult male rats». *Rev. esp. Fisiol.*, 1991. 47:167-172.
34. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D., and DE GANDARIAS, JM.: «Diurnal rhythm in brain lysyl/arginyl aminopeptidase activity, a bilateral study». *Neurosci. Res. Commun.*, 1992. 10:141-147.
35. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; GARCÍA, S.; LARDELLI, P.; VENZON, D. and DE GANDARIAS, JM.: «Bilateral distribution of aminopeptidase activities in selected structures of a photoneuroendocrine circuit and other rat brain areas». *Exp. Clin. Endocrinol.*, 1992. 99:56-63.
36. RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, B.; ARECHAGA, G.; LARDELLI, P.; VENZON, D.; GARCÍA, S.; OZAITA, A., and DE GANDARIAS, JM.: «Daily rhythm in rat retina, pineal gland, occipital cortex and serum aspartate aminopeptidase activity». *Neuroendocrinology*, 1993. 56:926-929.
37. SÁNCHEZ, B.; ALBA, E.; LUNA, JD.; MARTÍNEZ, JM.; PRIETO, I. and RAMÍREZ, M.: «Pyroglutamyl peptidase I levels and their left-right distribution in the rat retina and hypothalamus are influenced by light-dark conditions». *Brain, Res.*, 1996. 731:254-257.
38. SÁNCHEZ, B.; ALBA, E.; LUNA, JD.; MARTÍNEZ, JM.; PRIETO, I.; RAMÍREZ, MJ., and RAMÍREZ, M.: «Influence of constant light and darkness on arginyl aminopeptidase activity». *J. Physiol. Biochem.*, 1997 (en prensa).
39. TAMARKIN, L.; BAIRD, CJ., and ALMEIDA, OFX.: «Melatonin: A coordinating signal for mammalian reproduction»? *Science*, 1985. 227:714-720.
40. MOORE, RY.: «Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus». *Fed. Proc.*, 1983. 42:2783-2789.