



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## La Aminopeptidasa N de mamíferos: características bioquímicas, funciones fisiológicas y su implicación en procesos fisiopatológicos en humanos

*Aminopeptidase N from mammals: biochemical characteristics, physiological functions and implication in physiopathological processes in humans*

Isel Pascual<sup>a\*</sup>, Gabriela García<sup>a</sup>, Laura Sánchez<sup>b</sup>, Lisset Díaz<sup>a</sup>, Lillian Arzola<sup>a</sup>, Nelson Labrada<sup>a</sup>, Yarini Arrebola<sup>c</sup>, William Ernesto Miranda<sup>a</sup>, María de los Angeles Chávez<sup>a</sup>, Pedro Valiente<sup>a</sup> y Jean-Louis Charli<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>b</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>c</sup>Instituto Nacional de Gastroenterología, La Habana, Cuba.

<sup>d</sup>Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

\* Autor para correspondencia:  
[isel@fbio.uh.cu](mailto:isel@fbio.uh.cu)

### RESUMEN

Las metalo aminopeptidasas son enzimas que específicamente hidrolizan el residuo del extremo amino de péptidos y proteínas, lo que lleva a su activación o inactivación. Ellas pertenecen a las familias M1 y M17 principalmente. En particular, la enzima alanil aminopeptidasa de membrana, también conocida como aminopeptidasa neutra (APN, EC 3.4.11.2) desempeña funciones muy importantes en diferentes procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo de los péptidos relacionados con la analgesia, la etapas finales de la digestión, el control de la presión arterial, la motilidad y la adhesión celular así como actúan de receptores para la entrada de varios coronavirus. Adicionalmente, una elevada actividad de esta enzima se encuentra implicada en la patogénesis de varios desórdenes humanos como el cáncer, la inflamación, la disregulación de la presión arterial, entre otros. Por estas razones, esta enzima es blanco hoy en día para el desarrollo de inhibidores con potenciales aplicaciones biomédicas. El presente trabajo revisa las características estructurales y funcionales más importantes de las APN humanas y porcinas como modelos de mamíferos, teniendo en cuenta la información más recientemente publicada al respecto. Adicionalmente integra las principales funciones fisiológicas y fisiopatológicas de esta enzima, en particular aquellas de relevancia biomédica.

**Palabras clave:** alanil aminopeptidasa asociada a membrana, aminopeptidasa neutral APN, estructura de APN, mecanismo catalítico, inhibidores de APN, funciones de APN

Recibido: 2015-02-19

Aceptado: 2015-03-30

### ABSTRACT

*Metallo aminopeptidases are enzymes that selectively hydrolyze an aminoacid residue from the amino terminus of proteins and peptides, leading to their activation or inactivation. They belong to the M1 and M17 families of peptidases. In particular membrane alanyl aminopeptidase, also known as neutral aminopeptidase (APN EC 3.4.11.2) plays functional roles in many physiological processes, including peptide metabolism related with analgesia, last steps of protein degradation, cell motility and adhesion, and coronavirus entry. Furthermore, the expression of APN being up regulated has been implicated in the pathogenesis of various human disorders like cancers, inflammation, and pressure control, among others. For these reason, this enzyme is a target for the development of new inhibitors with potential biomedical applications. This article reviews the most important structural and functional characteristics of mammalian APNs, focused in the most recent published data for human and porcine enzymes as its models. Additionally, it integrates the important roles of APN in physio and pathophysiological processes of biomedical relevance.*

**Keywords:** *membrane alanyl aminopeptidase, APN structure, catalytic mechanism, APN natural inhibitors, APN functions*

### INTRODUCCIÓN

Las peptidasas de tipo metalo constituyen el tipo catalítico más diverso dentro de las proteasas ya que comprenden tanto endopeptidasas como exopeptidasas, enzimas citosólicas y otras que son secretadas al exterior celular, así como enzimas asociadas a la membrana plasmática y a organelos celulares. Se encuentran ampliamente distribuidas en todas las formas de vida, lo que indica funciones relevantes en los procesos biológicos (Barret *et al.* 2003). Estas enzimas, son hidrolasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico a escindir es mediado por una molécula de agua. Esta es una característica que comparan con las peptidasas de tipo aspártico, pero en las metalopeptidasas uno o más cationes metálicos divalentes activan la molécula de agua (Powers y Harper 1986, Barret *et al.* 2003, Rawlings *et al.* 2014). Este catión divalente puede ser zinc ( $Zn^{2+}$ ), cobalto ( $Co^{2+}$ ) o manganeso ( $Mn^{2+}$ ). El ion metálico se mantiene en la estructura de la proteína mediante aminoácidos que actúan como ligandos (Rawlings *et al.* 2014). Las metalopeptidasas pueden dividirse en dos grandes grupos según el número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En muchas metalopeptidasas sólo se requiere un ion metálico, el cual es generalmente  $Zn^{2+}$ ; sin embargo, hay otro grupo de familias en las que se requieren más de un ion, los cuales actúan cocatalíticamente. Todas las metalopeptidasas con iones cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metalopeptidasas con un sólo ion metálico pueden ser tanto exo como endopeptidasas (Rawlings *et al.* 2014).

Se han identificado alrededor de unas 30 familias de peptidasas de tipo metalo, de las cuales aproximadamente la mitad están formadas por enzimas que contienen el motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), donde Xaa puede ser cualquier aminoácido. Se ha comprobado por cristalografía de rayos X que este motivo forma parte del sitio de unión al átomo de metal y que dentro de la secuencia HEXXH, los dos residuos de histidina actúan como ligandos, mientras que el residuo de glutámico tiene función catalítica (Rawlings y Barret 1995, Thunnissen *et al.* 2001, Kyrieleis *et al.* 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012).

En particular, las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan enlaces peptídicos desde el extremo amino de las cadenas polipeptídicas. La mayoría de las aminopeptidasas son de tipo metalo, aunque también se incluyen en este grupo cisteíno y serino proteasas. Estas enzimas están involucradas en múltiples funciones fisiológicas, así como también están involucradas en procesos fisiopatológicos y en enfermedades parasitarias (Mucha *et al.* 2010). Siguiendo el sistema de clasificación de las peptidasas propuesto en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings *et al.* 2014) hasta el presente se han identificado quince clanes de metalopeptidasas. En seis de estos clanes se encuentran distribuidas las metaloaminopeptidasas, los que se denominan MA, MF, MG, MH, MN y MQ (Mucha *et al.* 2010) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clanes de metalopeptidasas en los que se encuentran distribuidas las metalo aminopeptidasas.

Table 1. Clans of metallopeptidases that comprises metallo aminopeptidasas.

Clan	No. Fam.	Peptidasa tipo
MA	42	Termolisina ( <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> )
MF	1	Leucil aminopeptidasa 3 ( <i>Bos taurus</i> )
MG	1	Metionil aminopeptidasa 1 ( <i>Escherichia coli</i> )
MH	4	Aminopeptidasa I ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
MN	1	D-aminopeptidasa DppA ( <i>Bacillus subtilis</i> )
MQ	1	Aminopeptidasa T ( <i>Thermus aquaticus</i> )

**Tabla 2.** Algunos miembros de la familia M1 del clan MA de las metalopeptidasas.

Table 2. Some members of the M1 family from Clan MA of metallopeptidasas.

Enzima	Clasificación
Dipeptidasa Cys-Gly, alanil aminopeptidasa de membrana o aminopeptidasa N (APN)	EC 3.4.11.2
Glutamil aminopeptidasa o aminopeptidasa A (APA)	EC 3.4.11.7
Piroglutamil aminopeptidasa II (PPII)	EC 3.4.19.6
Aminopeptidasa de membrana regulada por insulina, cistinil aminopeptidasa, oxitocinasa, leucina aminopeptidasa de placenta, etc. (IRAP)	EC 3.4.11.3
Leucin aminopeptidasa derivada de adipositos (A-LAP)	EC 3.4.11.-
Aminopeptidasa sensible a purimicina (PSA)	EC 3.4.11.14
Aminopeptidasa de levaduras Apa, AapY'	-
Lisil aminopeptidasa de bacteria	-
Aminopeptidasa O (AP-O)	EC 3.4.11.-
Aminopeptidasa B (APB)	EC 3.4.11.6
Leukotrieno A4 hidrolasa (LTA4H)	EC 3.3.2.6
Aminopeptidasa Ey	EC 3.4.11.20
Aminopeptidasa específica para leucina insensible a puromicina (PILS-AP)	-
Aminopeptidasa II (APII)	-

### Clan MA: Subclan MA (E): Familia M1

Las enzimas agrupadas en el clan MA contienen  $Zn^{2+}$  en su estructura. En este clan están incluidas tanto endo como exopeptidasas entre las que se encuentran aminopeptidasas (familias M1, M2, M4, M5, M9, M13, M30, M36, M48 y M61), carboxipeptidasas (M2, M32), peptidil-dipeptidasas (M2), oligopeptidasas (M3, M13) y endopeptidasas (familias M4, M10, M12). Una característica común de todas es que la unión al  $Zn^{2+}$  está mediada por dos residuos de histidina presentes en la secuencia consenso HEXXH, un tercer residuo y una molécula de agua. En el subclan MA (E) un residuo de glutámico, localizado al menos 14 residuos después del extremo carboxilo de la secuencia HEXXH constituye el tercer ligando, mientras que en el subclan MA (M), el tercer ligando puede ser un residuo de histidina o de aspártico dentro de la secuencia HEXHXXGXXH/D (Barret *et al.* 2003, Rawlings *et al.* 2014). La molécula de agua que funciona como ligando del metal también participa en la catálisis ya que su átomo de oxígeno es el agente nucleofílico que ataca al carbono carbonílico del enlace peptídico a hidrolizar. La termolisina (EC 3.4.24.27) es la enzima modelo del clan MA y su estructura, ampliamente caracterizada, es punto de referencia para el estudio de las enzimas de este clan debido a la alta semejanza estructural entre ellas en cuanto a la organización del centro activo (Barret *et al.* 2003, Rawlings *et al.* 2014).

La familia M1 ha sido de las más estudiadas dentro del subclan MA (E), y se encuentra ampliamente distribuida en el mundo vivo (Tabla 2). Enzimas que pertenecen a esta familia se encuentran en bacterias Gram (-) y (+), cianobacterias, archae, protozoarios, hongos y animales. No se conocen, en plantas, secuencias aminoacídicas completas de las proteínas de esta familia, pero se ha encontrado expresión de fragmentos de secuencias de ARNm en *Arabidopsis thaliana* (Barret *et al.* 2003). A esta familia pertenecen enzimas de membrana como la aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2), la aminopeptidasa A (APA, EC 3.4.11.7), la leucina aminopeptidasa derivada de adipocitos (EC 3.4.11.-), la piroglutamil peptidasa II (PPII, EC 3.4.19.6) (Albiston *et al.* 2004), y enzimas citosólicas como la leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa (EC 3.4.2.6) (Haeggstrom *et al.* 2002) y la aminopeptidasa B (APB, EC 3.4.11.6) (Fukasawa *et al.* 1999). En las enzimas ancladas a la membrana, el extremo amino se proyecta hacia el lado citoplasmático seguido de un segmento de transmembrana con el resto de la molécula expuesta hacia

la región extracelular donde generalmente está altamente glicosilada y con puentes disulfuro, por lo que han sido denominadas como ectopeptidasas (Barret *et al.* 2003, Albiston *et al.* 2004). No es sorprendente por tanto encontrar enzimas de esta familia con función de reconocimiento como antígenos de superficie.

Un patrón bien conservado en la familia M1, es la secuencia GAMEN, conocida también como motivo de exopeptidasa, donde en muy pocos casos se encuentran variaciones en los primeros dos residuos. Se postula que el residuo de glutámico está involucrado en la interacción con el extremo amino del péptido sustrato y por lo tanto en el acomodamiento del mismo durante la catálisis. Esta secuencia además, por su alto grado de conservación es muy útil para la identificación de los miembros de la familia (Fig. 1) (Barret *et al.* 2003, Albiston *et al.* 2004, Wong *et al.* 2012). En la figura 1 se muestra un fragmento de un alineamiento múltiple de secuencias realizado con 13 proteínas de la familia M1. Se seleccionaron para el análisis enzimas de mamíferos con amplia variabilidad en sus porcentajes de identidad de secuencia (%Id) con respecto

a APNh. Se evidencia el alto grado de conservación en la familia M1 de las secuencias anteriormente mencionadas aun cuando existen bajos % Id entre los miembros.

De esta familia se han establecido por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de la leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa humana y de levaduras en complejo con su inhibidor bestatina (Thunnissen *et al.* 2001), así como la del factor F3 de *Thermoplasma acidophilum* (Kyrieleis *et al.* 2005), la APN de *Escherichia coli* (Pep N) en complejo con su inhibidor bestatina (Ito *et al.* 2006), la APN de *Plasmodium falciparum* (PfAM1) sola y en complejo con bestatina y análogos de baja masa molecular (McGowan *et al.* 2009, Harbut *et al.* 2011) y la APN de mamíferos en complejo con la angiotensina IV (AngIV), y con los inhibidores amastatina y bestatina (Chen *et al.* 2012, Wong *et al.* 2012) (Tabla 3).

**Aminopeptidasa N**

La APN, enzima de la familia M1, subclan MA (E), está muy conservada en una gran variedad de especies que abarcan todos los reinos. Esta enzima desempeña



**Figura 1.** Alineamiento Uniprot de la secuencia aminoacídica del centro activo de varias aminopeptidasas de la familia M1. AMPE: Aminopeptidasa E, AMPN: Aminopeptidasa N, ERAP1: Aminopeptidasa de retículo endoplasmático 1, LCAP: Leucil-cistinil aminopeptidasa, LKHA4: Leukotrieno A4 hidrolasa, PSA: aminopeptidasa sensible a la puromicina, AMPB: Aminopeptidasa B, AMPO: Aminopeptidasa O, TRHDE: Ectoenzima degradadora de la hormona liberadora de tirotropina o Piroglutamil-aminopeptidasa II, AMPQ: Aminopeptidasa Q. A la derecha de cada secuencia se incluyen los números de acceso e identificadores de la base de datos Uniprot. Las abreviaturas correspondientes a cada enzima se refieren a la utilizada en esta base de datos. El rectángulo A encierra la secuencia conservada GAMEN relacionada con la actividad aminopeptidásica de los miembros de la familia M1 y el rectángulo B encierra la secuencia consenso HEXXH del centro activo. Los asteriscos señalan otros aminoácidos altamente conservados dentro de la familia.

**Figure 1.** Uniprot alignment of the aminoacidic sequence of the active site of various M1 family aminopeptidasas: AMPE: Aminopeptidase E, AMPN: Aminopeptidase N, ERAP1: Endoplasmatic reticulum aminopeptidase 1, LCAP: Leucil-cystinil aminopeptidase, LKHA4: Leukotriene A4 hydrolase, PSA: puromycin sensitive aminopeptidase, AMPB: Aminopeptidase B, AMPO: Aminopeptidase O, TRHDE: Thyrotrophin releasing hormone degrading enzyme or pyroglutamyl aminopeptidase II, AMPQ: Aminopeptidase Q. On the right of each sequence, the access number and identifiers from Uniprot are included. The short name for each enzyme corresponds with Uniprot name. The rectangle A comprises the conserved sequence GAMEN related with the aminopeptidase activities of these enzymes from M1 family and the rectangle B comprises the consensus sequences HEXXH from the active site. The asterisk points other highly conserved aminoacids residues inside the M1 family.

diversas funciones biológicas en cada uno de los diferentes organismos (Chavagnat *et al.* 1999, Bauvois y Dauzonne 2005, Addlagatta *et al.* 2006, Luan y Xu 2007, Wickstrom *et al.* 2011). En particular en microorganismos, la enzima APN forma parte de los sistemas proteolíticos de muchas bacterias y levaduras (ejemplo: *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*) utilizadas en procesos biotecnológicos para la obtención de sabores y texturas en los productos lácteos (Chavagnat *et al.* 1999), lo que la convierte en una molécula de interés para la industria alimentaria. Adicionalmente, se ha identificado como una enzima importante para la sobrevivencia de muchas bacterias y parásitos que atacan al hombre por lo que hoy en día constituye un blanco fundamental para el diseño de nuevos fármacos antiparasitarios y nuevos antibióticos (Florent *et al.* 1998, Golich *et al.* 2006, Flipo *et al.* 2007, McGowan *et al.* 2009, Deprez-Poulain *et al.* 2012).

### Características bioquímicas de la Aminopeptidasa N de mamíferos

#### Características generales

La aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2) en una primera etapa se conoció como aminopeptidasa M (por microsomal o de membrana) debido a su alta asociación con la fracción microsomal de membranas de riñón porcino de donde fue purificada por primera vez. También ha recibido otras denominaciones tales como alanina aminopeptidasa, alanina aminopeptidasa asociada a membrana (eucariotas), amino-oligopeptidasa, anep, AOP, antígeno de superficie de linfocitos T CD13, Cys-Gly dipeptidasa asociada a membrana, aminopeptidasa I asociada a membrana, aminopeptidasa microsomal, peptidasa E, entre otros (Albiston *et al.* 2004, Mucha *et al.* 2010, Wickstrom *et al.* 2011, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012, Rawlings *et al.* 2014). En ocasiones se le confunde con la enzima leucil aminopeptidasa (LAP), que es citosólica, debido a

**Tabla 3.** Estructuras cristalográficas informadas para enzimas miembros de la familia M1 de las metalopeptidasas (Información compilada a partir del sitio <http://pfam.xfam.org>).

Table 3. Crystallographic structures for M1 family metallopeptidases informed (information compiled from <http://pfam.xfam.org>).

Enzima	Código Pfam	Fuente	Códigos* (pdb)
Aminopeptidasa N	AMP1_PLAFQ	<i>Plasmodium falciparum</i> cepa FcB1 Columbia	3EBG, 3EBH, 3EBI, 3Q43, 3Q44, 3T8V
Aminopeptidasa N	AMPN_ECOLI	<i>Escherichia coli</i>	2DQ6, 2DQM, 2HPO, 2HPT, 2ZXG, 3B2P, 3B2X, 3B34, 3B37, 3B3B, 3KED, 3PUU, 3QJX
Aminopeptidasa N	ERAP1_HUMAN	<i>Homo sapiens</i>	2YD0, 3MDJ, 3QNF
Aminopeptidasa N	ERAP2_HUMAN	<i>Homo sapiens</i>	3SE6
Leucotrieno A4 hidrolasa	LKHA4_HUMAN	<i>Homo sapiens</i>	1H19, 1HS6, 1SQM, 2R59, 2VJ8, 3B7R, 3B7S, 3B7T, 3B7U, 3CHO, 3CHP, 3CHQ, 3CHR, 3CHS, 3FH5, 3FH7, 3FH8, 3FHE, 3FTS, 3FTU, 3FTV, 3FTW, 3FTX, 3FTY, 3FTZ, 3FU0, 3FU3, 3FU5, 3FU6, 3FUD, 3FUE, 3FUF, 3FUH, 3FUI, 3FUJ, 3FUK, 3FUL, 3FUM, 3FUN
Leucotrieno A4 hidrolasa	LKHA4_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 204508 / S288c)	2XPY, 2XPZ, 2XQ0
	Q7WVY1_COLP3	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (34H / ATCC BAA-681)	3CIA
	Q9JYV4_NEIMB	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (MC58)	2GTQ
Factor F3	TRF3_THEAC	<i>Thermoplasma acidophilum</i> (ATCC 25905 / DSM 1728 / JCM 9062 / NBRC 15155 / AMRC-C165)	1Z5H, 3Q7J

que ambas tienen una distribución tisular semejante y a que las especificidades de sustrato se solapan en cuanto a que ambas muestran elevada actividad frente a péptidos y sustratos sintéticos derivados de leucina (Mucha *et al.* 2010).

Esta enzima hidroliza el enlace peptídico en el extremo amino de pequeños péptidos que actúan como hormonas, péptidos señales y neurotransmisores (Mucha *et al.* 2010) (Tabla 4), así como de diferentes sustratos sintéticos derivados de aminoácidos acoplados a grupos cromógenos como la para-nitroanilida y grupos fluorogénicos como los derivados de beta-naftilamida o de amino-metil-cumarina diseñados para la evaluación de su actividad enzimática. El empleo de estos sustratos sintéticos ha permitido establecer que esta enzima tiene una amplia especificidad de sustrato con el orden de preferencia: Ala, Phe, Tyr, Leu, Arg, Thr, Trp, Lys, Ser, Asp, His, Val, Pro y Glu (Barret *et al.* 1998, Rawlings *et al.* 2014). El pH óptimo de la enzima es cercano a la neutralidad con pequeñas variaciones entre especies, no obstante si se aumenta la concentración de sustrato puede ser elevado hasta

pH 9.0. La enzima tiene un punto isoeléctrico igual a 5 (Luan y Xu 2007).

Esta enzima es susceptible a la presencia de agentes quelantes como el EDTA, EGTA y la 1,10-fenantrolina en el orden milimolar. También es susceptible de ser inhibida fisiológicamente por péptidos endógenos que disminuyen su actividad en el orden micromolar tales como la bradiquinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) y la sustancia P (Arg-Pro-Lys-Pro-Glu-Glu-Phe-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH<sub>2</sub>) (Luan y Xu, 2007). Adicionalmente, concentraciones elevadas de los aminoácidos L-leucina, L-prolina, L-alanina, L-arginina, L-glutámico y L-metionina, así como los iones divalentes (Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) inhiben la actividad de la APN (Bauvois y Dauzonne 2005, Arzola 2013). La mayoría de los inhibidores naturales de APN, mas extensamente utilizados son producidos por microorganismos y se han purificado a partir de filtrados de cultivos de los mismos (Bauvois y Dauzonne 2005). Gran parte de ellos son generados por bacterias pertenecientes al Orden *Actinomycetales* específicamente del género *Streptomyces* (Fig. 2, Tabla 5). El más empleado de todos es la bestatina (Fig. 2A), el cual es capaz de inhibir a prácticamente todos los miembros de la familia

**Tabla 4.** Sustratos naturales informados para APN. (Adaptado de [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

Table 4. Natural substrates reported for APN. (Adapted from [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

Sustrato	Sitio de hidrólisis	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
(Asn1)angiotensina-2	Asn+Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu	-	-	-	Asn	Arg	Val	Tyr	Ile
Angiotensina-3	Arg+Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	-	-	-	Arg	Val	Tyr	Ile	His
Angiotensina-3	Arg35+Val-péptido	-	-	-	Arg	Val	Tyr	Ile	His
Des(Asp1)angiotensina-1	Arg+Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu	-	-	-	Arg	Val	Tyr	Ile	His
Análogo de neurokinina	Arg+Phe-Phe-Ser-Leu-Met-O <sub>2</sub>	-	-	-	Arg	Phe	Phe	Ser	Leu
Somatostatina	Ala+Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Phe-Thr-Phe-Ser-Cys	-	-	-	Ala	Gly	Cys	Lys	Asn
[Leu5]-encefalina	Tyr+Gly-Gly-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	-	-	-	Tyr	Gly	Gly	Phe	Leu
[Met5]-encefalina	Tyr+Gly-Gly-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	-	-	-	Tyr	Gly	Gly	Phe	Met

M1 incluida la leucotrieno A4 hidrolasa. Sin embargo, independientemente de su baja selectividad hacia la APN, con respecto a la familia M1, la bestatina ha sido uno de los inhibidores de esta enzima más útil como modelo para el estudio de las funciones fisiológicas de APN, así como de su participación en diferentes patologías en humanos (Bauvois y Dauzonne 2005). Se ha descrito como un inhibidor competitivo de unión lenta (Mucha *et al.* 2010, Arzola 2013). Fue inicialmente aislado de *Streptomyces olivoreticuli* (MD976-67) y denominado como Ubinimex. Varios análogos tales como el para-hidroxibestatina, 2-tiolbestatina, tioamidabestatina y bestatina reducida han sido también desarrollados. Otros inhibidores naturales de APN descritos han sido obtenidos a partir de plantas y de invertebrados marinos (Tabla 5), así como existen un gran número de inhibidores de APN humana y porcina, de baja masa molecular informados obtenidos principalmente por medio del empleo de la síntesis química, que son capaces de inhibir a esta enzima en el orden micromolar y submicromolar y han mostrado potenciales aplicaciones biomédicas (Mucha *et al.* 2010), pero que no serán objeto de interés del presente trabajo.

#### Características estructurales

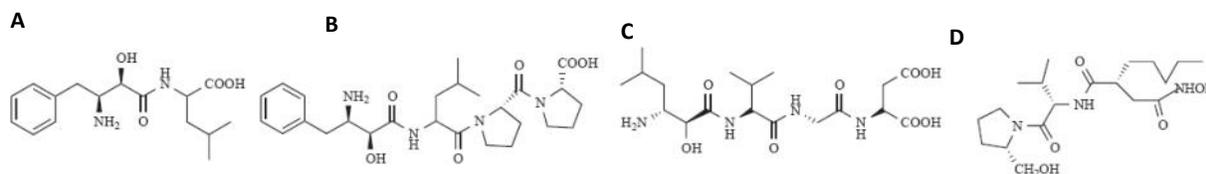
La APN de mamíferos es una glicoproteína de membrana tipo II. En la mayoría de las especies la enzima nativa se encuentra como un homodímero (Albiston *et al.* 2004, Luan y Xu 2007, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012, Fig. 3) con una masa molecular del monómero aproximada de 140 a 150 kDa (Luang y Xu 2007), aunque se ha informado que en el caso del conejo se presenta como monómero (Feracci y Maroux 1980). Esta enzima está altamente glicosilada y los carbohidratos llegan a constituir hasta el 20 % de la masa total de la proteína. En la enzima humana (APNh), cada monómero tiene 967 aminoácidos (Sjöström *et al.* 2000, Luan y Xu 2007, Mucha *et al.* 2010, Wong *et al.* 2012)

y en la porcina (APNp) tiene 963 aminoácidos (Chen *et al.* 2012). A partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas se ha determinado que entre ambas existe un 80% de identidad de secuencia; tienen propiedades bioquímicas y cinéticas indistinguibles, por lo que muy frecuentemente APNp se emplea como modelo en el estudio de APNh (Tieku y Hooper 1992, Flipo *et al.* 2003, Shim *et al.* 2003, Xu y Li 2005, Pascual *et al.*, 2009, Mucha *et al.* 2010, Pascual *et al.* 2011, Arzola 2013), lo cual es válido para otras aminopeptidasas de origen porcino que también han sido establecidas como modelos de sus homólogas humanas, como es el caso de la enzima dipeptidil peptidasa IV (Pascual *et al.* 2011).

En ambas enzimas los aminoácidos están agrupados en siete regiones: una cola intracelular corta, un pequeño segmento o región de membrana, un pequeño tallo extracelular y una región extracelular grande (Sjöström *et al.* 2000, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012, Fig. 3). Esta última región está organizada en cuatro secciones, también reconocidas como dominios acorde al plegamiento característico de las metalopeptidasas M1 (Thunnissen *et al.* 2001, Kyrieleis *et al.* 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012, Fig. 3).

En la APNh, la interfaz del dímero está mediada por interacciones hidrofóbicas y por una red de puentes salinos y de hidrógeno. La superficie de contacto en cada monómero del dímero es de 840 Å<sup>2</sup>; esta interfaz está formada exclusivamente por residuos de la región carboxilo terminal de la enzima, denominada región VII (Wong *et al.* 2012). En cada monómero, el sitio catalítico está conformado principalmente por residuos de las regiones V y VII y además, se encuentra expuesto a una gran cavidad interna (2800 Å<sup>3</sup>), que es inaccesible al solvente (Wong *et al.* 2012). El dímero posee dimensiones en proyección de 131 Å X 62 Å.

Las características estructurales generales de las siete regiones establecidas para la APN de mamíferos se



**Figura 2.** Estructura de algunos inhibidores de APN: (A) bestatina, (B) probestatina, (C) amastatina y (D) actinonina (Adaptado de Luan y Xu, 2007).

Figure 2. Structure of some APN inhibitors. (A) bestatin, (B) probestatin, (C) amastatin y (D) actinonin (Adapted from Luan y Xu, 2007).

**Tabla 5.** Inhibidores naturales de APN de amplio uso biotecnológico y biomédico (Compilado de Bauvois y Dauzonne, 2005; Luan y Xu, 2007).

Table 5. Natural APN inhibitors with wide biotechnological and biomedical applications (Compiled from Bauvois and Dauzonne, 2005; Luan and Xu, 2007).

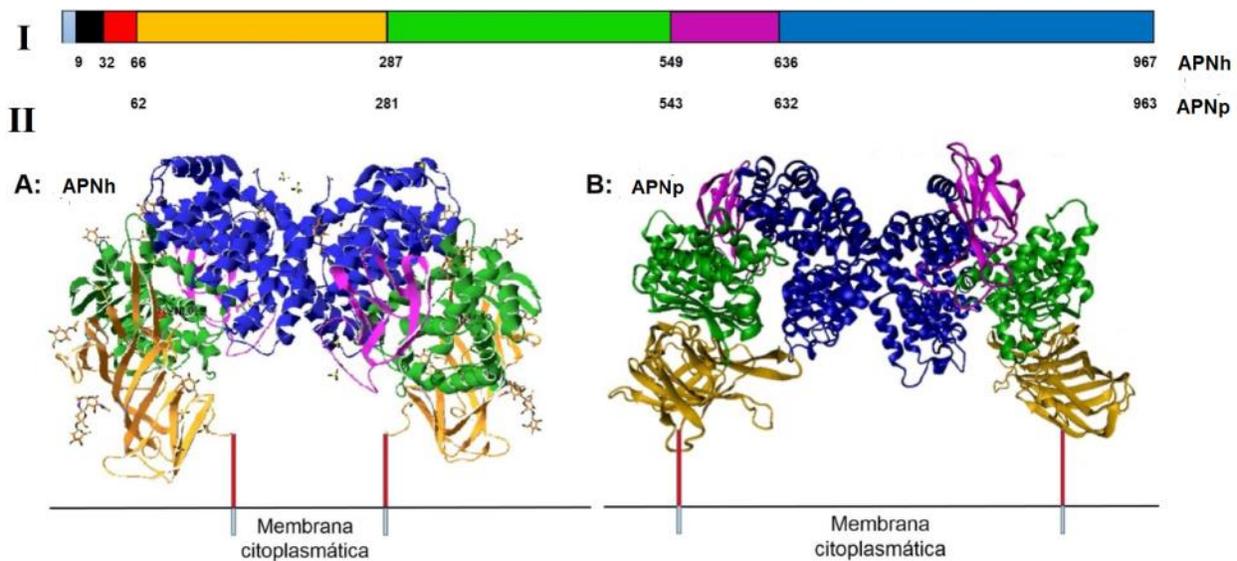
Nombre	Fuente	IC <sub>50</sub>	Tipo de inhibición
<b>Microorganismos</b>			
<b>Bestatina:</b> (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-leucina (Ubenimex)	<i>Streptomyces olivoreticuli</i> (MD 976-67)	3.03 μM APNh	Clásica competitiva de unión lenta
<b>2-tiolbestatina:</b> (derivado de bestatina)	-	4.4 μM APNh	-
<b>Tioamida-bestatina:</b> (derivado de bestatina)	-	40.3 μM APNh	-
<b>Actinonina:</b> (2R)-N4-hidroxi-N1-[(1S)-1-[[2S)-2-(hidroximetil)-1-pirrolidinil]carbonil]-2-metilpropil]-2-pentilbutanediamida	<i>Actinomycetes</i> M6848-hF6	1.99 μM APNh	Clásica competitiva
<b>AHPA-Val:</b> (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valina	<i>Streptomyces neyagawaensis</i> SL387	1.2 μg/mL	-
<b>MR387A:</b> (derivado de AHPA-Val)	-	198nM APNp 218nM APNh	-
<b>MR387B:</b> (derivado de AHPA-Val)	-	164 nM APNp 201 nM APNh	-
<b>Amastatina:</b> (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valina-L-valina-L-aspártico	<i>Streptomyces sp</i> ME 98-M3	0.5 μM APNp	Clásica competitiva de unión lenta
<b>Probestina:</b> (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-prolil-L-prolina	<i>Streptomyces azureus</i> (MH663-2F6)	19 nM APNp	Competitiva de unión fuerte
<b>Phebestina:</b> (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-fenilalanina	<i>Streptomyces sp</i> M1716-m3	0.18 μg/mL	-
<b>Leuhistina:</b> (2R,3S)-3-amino-2-hidroxi-2-1H-(imidazol-4-ilmetil)-5-metilhexanoico	<i>Bacillus laterosporus</i> BM156-14F1	0.23 μM APNp	Clásica competitiva
<b>Plantas</b>			
<b>Chelerythrina:</b> Benzo[c]fenantridinas	<i>Macleaya cordata</i>	30 μM APNp	-
<b>Curcumina:</b> (E,E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona	<i>Curcuma longa</i>	11.2 μM APNp	Irreversible
<b>Ácido Betulinico:</b> (ácido 3b-hidroxiup-20(29)-en-28-oico)	<i>Betula ssp</i>	7.3 μM APNp, APNh	-
<b>Animales</b>			
<b>Psammaplina A:</b> ((E,E)-N,N0-Bis[(3-(3-O-Bromo-40-hidroxifenil)-2-oximidopropionil]cistamina)	<i>Psammaplysilla sp.</i> , <i>Psammaplysilla purpurea</i> ,	18 μM APNp	Clásica no competitiva

enuncian a continuación y son el resultado de la integración de los informes previos relacionados con la secuencia de esta enzima y su topología en la membrana, con los datos estructurales más recientes obtenidos de la determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X para las enzimas humana y porcina (Sojöstrom *et al.* 2000, Xu y Li 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012):

- **Región I:** Región o extremo citoplasmático (amino-terminal) compuesto por 9 aminoácidos.
- **Región II:** Constituida por una α-hélice de 24 aminoácidos hidrofóbicos que forman el segmento de trans-

membrana que le permite a la enzima mantenerse anclada a la misma.

- **Región III:** Se encuentra hacia el exterior de la célula, está compuesta por 33 residuos aminoácidos, muchos de ellos residuos de serina y treonina y soporta el núcleo catalítico de la enzima.
- **Región IV:** Posee un plegamiento en forma de barril β. No es significativo para la actividad enzimática (aminoácidos del 67 al 287).
- **Regiones V y VI:** Forma el sitio catalítico con los ligandos del ion Zn<sup>2+</sup> (aminoácidos 288 al 636). La re-



**Figura 3.** Representación esquemática de APN dimérica de mamíferos. A: dímero en membrana de APNh. I: organización en regiones de la cadena polipeptídica de APNh. La región citoplasmática se muestra en azul claro, el segmento transmembrana en negro, el tallo rico en Ser/Thr es rojo, y las restantes regiones (que forman el ectodominio) IV, V, VI y VII se muestran en naranja claro, verde, magenta y azul, respectivamente. II diagrama de cintas del dímero APNh representado en su probable orientación con respecto a la membrana plasmática. Los colores de las regiones corresponden a la representación en I. Las esferas rojas indican la localización de los iones  $Zn^{2+}$  de los centros activos. Los oligosacáridos N-enlazados son mostrados. B: Diagrama de cintas del dímero APNp representado en su probable orientación con respecto a la membrana plasmática. En el ectodominio se representan las regiones IV, V, VI y VII (esta última representación fue adaptada de Chen *et al.* 2012). Se observa la elevada similitud estructural y conformacional entre ambas enzimas.

*Figure 3. Scheme representation of dimeric mammals APN. A: membrane dimeric hAPN. I: organization in regions of the polypeptide chain of hAPN. The cytoplasmic region is shown in light blue, transmembrane segment in black, Ser/Thr rich tail in red, and the ectodomain regions IV, V, VI and VII are in light orange, green, magenta and blue, respectively. II Diagram of dimeric hAPN represented in its probable orientation regarding the plasma membrane. The regions colors are in agree with representation I. The red spheres indicate the localization of the  $Zn^{2+}$  ions in the active sites. The N-linked oligosaccharides are also showed. B: Diagram of dimeric pAPN represented in its probable orientation regarding the plasma membrane. In the ectodomain are represented the regions IV, V, VI and VII (Adapted from Chen *et al.* 2012). We can observe the high structural and conformational similitude between both human and porcine enzymes.*

gión o dominio V tiene un plegamiento tipo termolisina, enzima modelo de la familia y en ella se encuentran los motivos típicos  $_{352}GXMEN_{356}$  y  $_{388}HEXXHX_{18}E_{411}$  (la numeración de los residuos se sigue acorde con la APNh; Thunnissen *et al.* 2001, Kyrieleis *et al.* 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012). Esta región está formado por dos subdominios, uno hacia el extremo amino que se pliega en forma de hoja  $\beta$ , con una  $\alpha$ -hélice que lo conecta con el subdominio localizado hacia el extremo carboxilo, con plegamiento en superhélice  $\alpha$ . La región o dominio VI adopta un plegamiento en forma de sándwich  $\beta$ .

- **Región VII:** Región carboxilo terminal (aminoácidos del 637 al 967). Tiene un plegamiento en forma de

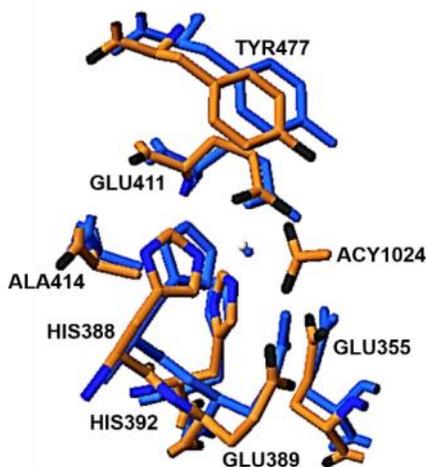
superhélice  $\alpha$ , por lo que presenta un alto contenido de  $\alpha$ -hélices y de residuos polares relacionados con la dimerización de la enzima. Está implicado en la formación del dímero mediante fuerzas no covalentes. En el caso de la APNh, presenta un lazo flexible de 8 residuos aminoácidos ( $^{891}YGGGSFSF^{898}$ ) que solo se forma cuando la enzima está unida a un inhibidor o a un péptido sustrato.

La estructura de los centros activos de las enzimas humana y porcina, evidencia la elevada similitud en su arquitectura y el posicionamiento de los residuos para la catálisis (Fig. 4). Se observa la coordinación del  $Zn^{2+}$  por los dos residuos de histidina y el residuo de glutámico del motivo consenso  $HEXXHX_{18}E$ , y por la molé-

cula de agua posicionada para el ataque nucleofílico, por el enlace por puente de hidrógeno con el primer residuo de glutámico del motivo consenso anterior. Esta elevada similitud estructural es la base de propiedades bioquímicas y cinéticas indistinguibles entre ambas entidades moleculares. Estas similitudes estructurales y funcionales entre las enzimas humana y porcina, han permitido el uso extenso de esta última como modelo de la enzima humana, en la búsqueda de moléculas con actividad inhibitoria, con potenciales aplicaciones en patologías humanas que tienen como base molecular la actividad de esta enzima (Mucha *et al.* 2010, Chen *et al.* 2012, Wong *et al.* 2012).

#### Mecanismo catalítico de la APN de mamíferos

A continuación se describe el mecanismo catalítico consenso para APN de mamíferos, propuesto de acuerdo con los análisis estructurales comparativos entre APNh, APNp y la termolisina como metaloenzi-



**Figura 4.** Superposición de los centros activos de APNh (aparecen los residuos en color carmelita) y APNp (aparecen los residuos en color azul). Los residuos se enumeran de acuerdo a la secuencia de APNh, y se representa como esfera el átomo de zinc. ACY1024 corresponde a la molécula de acetato que sustituyó a la molécula de agua del centro activo en el proceso de cristalización de acuerdo a Wong *et al.* (2012).

*Figure 4.* Superposition of the hAPN (brown) and pAPN (blue) active sites. The residues are numbered according to the hAPN sequence and the sphere represents the zinc atom. ACY1024 corresponds to the acetate molecule that substituted the water molecule at the active site, during the crystallization process according to Wong *et al.* (2012).

ma modelo dependiente de  $Zn^{2+}$ . La numeración de los residuos se sigue acorde a APNh. En la enzima nativa el ion  $Zn^{2+}$  está coordinado de forma tetraédrica por los residuos His<sup>388</sup>, His<sup>392</sup> y Glu<sup>411</sup> (del motivo conservado <sup>388</sup>HEXXHX<sub>18</sub>E<sup>411</sup>) y una molécula de agua, que a su vez se encuentra posicionada mediante un enlace por puente de hidrógeno con el residuo Glu<sup>389</sup> catalítico, que funciona como una base general (Fig. 5). En el complejo de APNh con el péptido sustrato Angiotensina IV, el residuo amino terminal de valina del sustrato se encuentra profundamente enterrado en la estructura del centro activo, lo cual es una observación consistente con que esta enzima sea una exopeptidasa; además, el grupo  $\alpha$ -amino de la valina terminal establece puentes de hidrógeno con el Glu<sup>355</sup> (del motivo conservado <sup>352</sup>GAMEN<sup>356</sup>), el Glu<sup>411</sup> y la Gln<sup>213</sup>, residuos estos, por tanto, implicados en la unión del sustrato o la estabilización del estado de transición (Wong *et al.* 2012). En el caso de APNp, también el grupo  $\alpha$ -amino del residuo terminal del péptido sustrato establece 3 puentes de hidrógeno con dos residuos de glutámico y una glutamina, uno de ellos del motivo **GAMEN**. Estas interacciones con el extremo amino del sustrato lo anclan firmemente al centro activo de la enzima para la catálisis, lo cual también concuerda con que esta enzima es una exopeptidasa específica por los extremos aminos de sus sustratos (Xu y Li, 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012). La unión del péptido sustrato debe conllevar directamente al estado de transición sin que esto requiera un cambio significativo en las posiciones atómicas, de acuerdo con el análisis comparativo de la conformación nativa de APN y sus complejos con péptidos sustrato (Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012; Fig. 5). Con la entrada del péptido sustrato, la molécula de agua coordinada al  $Zn^{2+}$  es desplazada por el oxígeno carbonílico del sustrato, en un proceso concertado, y se reposiciona en línea para el ataque nucleofílico y la hidrólisis, lo que le aumenta su carácter nucleofílico. Un residuo de tirosina (Tyr<sup>477</sup>) establece enlace por puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del enlace peptídico a escindir y cuando posteriormente se produce el ataque, este residuo estabiliza el oxianión generado en el estado de transición. Al producirse el ataque nucleofílico, el Glu<sup>389</sup> que polarizaba la molécula de agua, inmediatamente transfiere el protón remanente hacia el nitrógeno del enlace peptídico escindido (Xu y Li, 2005, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012).

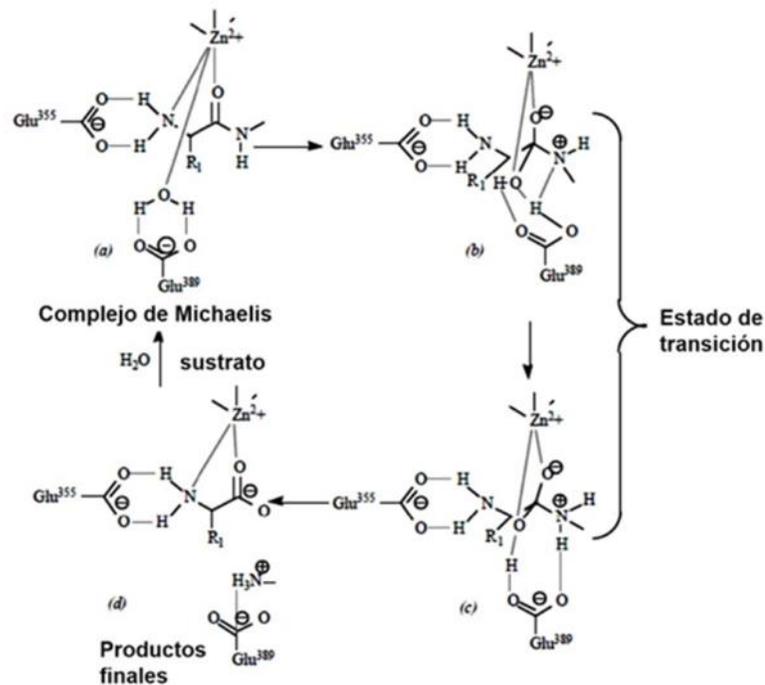
El análisis comparativo de la APNh nativa y su complejo con el sustrato peptídico muestra que la unión del péptido conlleva al ordenamiento de un lazo flexible de ocho residuos (<sup>891</sup>YGGGSFSF<sup>898</sup>), que no se observa en el mapa de densidad electrónica de la enzima nativa y que interviene en las interacciones con las cadenas laterales de los residuos del sustrato. Este lazo se observó en el trabajo de Wong *et al.* (2012), en dos conformaciones, una correspondiente a la unión del sustrato y del inhibidor amastatina, y otra conformación estructural diferente en el complejo con la bestatina, lo cual refleja que el ordenamiento de este lazo dependiente de la unión del ligando, pudiera constituir un requisito para la amplia especificidad de la enzima por el sitio P1 del sustrato.

La posibilidad de APNh de transformar una gama de sustratos peptídicos relativamente amplia se refleja en el hecho de que las interacciones con las cadenas laterales en las posiciones P1' y P2' del sustrato, no son muy específicas, de manera que la enzima puede acomodar un cierto número de aminoácidos en esas posiciones; y de que después del tercer aminoácido existe

muy poca complementariedad, tanto estérica como química, entre la enzima y el sustrato (Wong *et al.* 2012).

Se ha informado que las aminopeptidasas de la familia M1 adoptan dos conformaciones distintas: una cerrada y catalíticamente activa, y otra abierta y catalíticamente inactiva (Thunnissen *et al.* 2001; Wong *et al.* 2012; Chen *et al.* 2012). Las enzimas alternan entre ellas mediante cambios conformacionales entre el dominio carboxilo terminal VII y el resto del ectodominio. Es probable que la flexibilidad estructural entre el ectodominio de la proteína y su región adyacente a la membrana por la cara extracelular, facilite los cambios conformacionales que sufre APN.

El mapa de distribución de cargas de APNp muestra un canal o apertura cargado negativamente que conduce al centro activo. El canal está formado fundamentalmente por residuos de los dominios V y VII, aunque también involucra residuos del dominio VI. Dicho canal establece interacciones con los péptidos sustratos y tiene una extensión de aproximadamente 13 resi-



**Figura 5.** Representación esquemática del mecanismo catalítico propuesto para APN de mamíferos (Adaptado de Xu y Li, 2005).

Figure 5. Scheme representation of the catalytic mechanism proposed for mammals APNs (Adapted from Xu and Li, 2005).

duos en conformación extendida (Chen *et al.* 2012). En cambio el sitio catalítico de APN está expuesto a una gran cavidad interna que no se conecta con el solvente por ninguna abertura o canal apreciable. Se propone como modelo para explicar el acceso al sitio catalítico la alternancia entre las dos conformaciones: la abierta, donde el sitio activo se encuentra expuesto al solvente, sin actividad catalítica; y una conformación cerrada en la que el sitio activo no se encuentra expuesto al solvente, y se recupera la actividad catalítica. La conversión hacia la forma abierta aleja los residuos catalíticos en el dominio V de los residuos del lazo del dominio VII, apartando de esta forma los residuos que le sirven de sándwich al péptido en el sitio de unión (Wong *et al.* 2012).

#### **Localización anatómica de APN en mamíferos: Funciones fisiológicas y en diferentes patologías**

La APN está presente en una gran variedad de tejidos y tipos celulares en los mamíferos, y parece modular una amplia gama de procesos biológicos. Se encuentra una concentración alta de esta enzima en las membranas del borde en cepillo intestinal y en el riñón donde desempeña funciones importantes en los procesos relacionados con la digestión y absorción de péptidos. Una forma soluble se encuentra en el suero/plasma y su origen probablemente sea a partir de cortes proteolíticos de la enzima presente en la membrana (Mucha *et al.* 2010).

En el sistema inmunológico, la APN se encuentra como marcador de superficie (CD13) en monocitos/macrófagos, células presentadoras de antígenos (APC), linfocitos T y B, y granulocitos. También esta enzima, participa en la degradación de citoquinas y antígenos presentados en la superficie celular por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, regulando indirectamente funciones del sistema inmune. La APN también participa en la transducción de señales en monocitos y en los linfocitos T (Scornik y Botbol, 2001, Luan y Xu, 2007, Mina-Osorio *et al.* 2008, Wickstrom *et al.* 2011).

La APN presente en el suero y en el sistema nervioso central (SNC), participa en la cascada enzimática del sistema renina-angiotensina al degradar la angiotensina III en angiotensina IV; al igual que la APA al degradar la angiotensina II en angiotensina III (Wright *et al.* 2003, Wong *et al.* 2012). Este es un sistema compuesto por diversas hormonas peptídicas y receptores de

señales que intervienen en la regulación de la presión sanguínea y el balance electrolítico tanto sistémico como en el SNC (Reaux *et al.* 1999, Wright *et al.* 2003, Rozenfeld *et al.* 2003, Wong *et al.* 2012). Se ha establecido que la APN, junto a otras aminopeptidasas de la familia M1 que forman parte del sistema renina-angiotensina, se encuentra involucrada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes indican cambios de estas enzimas en el avance de la enfermedad, principalmente una disminución de su actividad, la cual está directamente relacionada con la pérdida de la memoria asociada a esta patología (Puertas *et al.* 2013).

La APN localizada en el SNC y en los nervios periféricos (Roques *et al.* 2000, Le Guen *et al.* 2003, Luan y Xu, 2007, Noble *et al.* 2008, Schreiter *et al.* 2012) también se encuentra involucrada en la inactivación de péptidos opioides con potentes acciones analgésicas, conocidos como encefalinas. Las respuestas analgésicas desencadenadas por estos péptidos son de corta duración, debido a su degradación por APN y por otra metalopeptidasa, la neprilisina (NEP) (Roques 2000, Le Guen *et al.* 2003, Noble *et al.* 2008, Schreiter *et al.* 2012). La APN también podría estar involucrada en la degradación de otros neurotransmisores (Noble y Roques 2007).

Adicionalmente a sus funciones fisiológicas, varias evidencias pre-clínicas y clínicas apoyan la idea que la APN tiene relevancia para el diagnóstico o tratamiento de varias enfermedades. Por ejemplo, se han empleado una serie de inhibidores de APN y NEP en el manejo del dolor del tejido periférico inflamado y a nivel del SNC, mediante el bloqueo de estas enzimas degradadoras de péptidos opioides y de encefalinas (Le Guen *et al.* 2003; Schreiter *et al.* 2012).

También se conoce que la enzima presente en el intestino, actúa como receptor de varios coronavirus que afectan a humanos y mamíferos en general, por lo que diferentes estrategias han sido desarrolladas para bloquear la unión específica de los antígenos de superficie virales a la enzima, como parte del acercamiento terapéutico en la infección viral (Meng *et al.* 2014).

Se han observado células epiteliales que expresan de manera anormal la APN y la dipeptilpeptidasa IV (DPP-IV) en enfermedades como el acné, la psoriasis y el surgimiento de queloides y el empleo de inhibidores

de estas enzimas en modelos de estas patologías, indican que constituyen un blanco importante para el tratamiento de las mismas (Thielitz *et al.* 2008).

La APN es otra de las aminopeptidasas que recientemente se ha encontrado asociada a procesos de invasión tumoral, en los que se ha podido correlacionar la capacidad de invasión con los niveles de expresión de esta enzima (Wickstrom *et al.* 2011). Se ha identificado, mediante varias técnicas inmunológicas, la presencia de APN en diversas líneas celulares tumorales y se ha evaluado su actividad enzimática frente a diversos sustratos cromogénicos específicos para la enzima. Ha sido establecida como mielocito marcador de leucemia y como mediador de la inflamación y de la invasión celular (Mucha *et al.* 2010; Wickstrom *et al.* 2011). Por ejemplo: se ha identificado por distintas técnicas inmunológicas, y evaluado su actividad enzimática con el empleo del sustrato cromogénico específico Leu-*p*-nitroanilida, en cultivos celulares de HL-60, una línea celular de leucemia promielocitoide humana. También se evaluó el efecto de varios inhibidores de APN en cultivos celulares de esta línea, entre ellos la bestatina; estos inhibidores provocan la disminución de la proliferación celular de estos cultivos *in vitro* (Look *et al.* 1989). Adicionalmente, se ha detectado la actividad de APN en células intactas de las líneas celulares humanas NaUCC-4 y BeWo, de carcinoma de útero; NOS3, NOS4 y SKOV, de carcinoma de ovario; SiHa, de cáncer cervical; SW1083, de cáncer colonrectal; A-431, de carcinoma de vulva (Ino *et al.* 1994); HT-1080, de fibrosarcoma (Pathuri *et al.* 2012); en preparaciones de membrana de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) (Pérez *et al.* 2009); entre otros.

El carcinoma papilar tiroideo (PTC), el adenoma folicular tiroideo (FTA) así como la hiperplasia nodular tiroidea (TNH) constituyen las patologías más frecuentes de la glándula tiroidea. Fundamentalmente se ha establecido la importancia de la DPP-IV en estas patologías, sin embargo, recientemente se identificó una elevada actividad de APN en los neoplasmas tiroideos en comparación con células normales, principalmente en los casos de PTC en comparación con FTA y TNH (Larrinaga *et al.* 2013). Estudios adicionales serán importantes para validar a esta enzima como marcador de estas patologías así como blanco para el diseño de nuevas terapias.

Estudios funcionales relacionados con la participación de APN en la invasión tumoral indican que esta enzi-

ma degrada algunas de las proteínas de matriz como el colágeno tipo IV y algunos componentes de Matrigel (Pasqualini *et al.* 2000; Wickstrom *et al.* 2011). También se ha podido correlacionar la sobreexpresión de APN con la progresión del carcinoma de ovario (Surowiak *et al.* 2006), del carcinoma de mamas (Martínez *et al.* 1999), del cáncer de pulmón de células no pequeñas y con el estado del tumor en cáncer de colon. En este último, la sobrevivencia y la desaparición de la enfermedad resultó menor en pacientes con tumores APN positivos (Wickstrom *et al.* 2011). En un estudio de biomarcadores de cáncer de tiroides y de mamas, APN mostró buena sensibilidad, especificidad y suficiente valor predictivo de ambos resultados: positivo y negativo, y además, buena precisión en general. Se sugirió que una prueba de actividad tipo APN del suero puede emplearse en el diagnóstico de estos tipos de cáncer (Wickstrom *et al.* 2011).

Un estudio acerca de péptidos tumorales específicos reveló que APN es el principal receptor del motivo peptídico NGR (asparagina-glicina-arginina), y que este receptor se expresa exclusivamente en las células endoteliales de la vasculatura angiogénica y no en la vasculatura normal (Pasqualini *et al.* 2000). Estudios posteriores establecieron a APN como un regulador importante de la morfogénesis endotelial durante la angiogénesis (Bhagwat *et al.* 2001). A partir de estudios de RT-PCR, se determinó que la expresión de APN en las células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC), aumenta ante la exposición al factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF). La curcumina y otros inhibidores conocidos de APN, como la bestatina, inhibieron fuertemente la invasión de las células tumorales APN-positivas: C8161, una línea de melanoma humano, y HT1080, una línea de fibrosarcoma humano; al igual que la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos. Sin embargo, la curcumina no inhibió la invasión de las células tumorales APN-negativas: MDAMB-231, una línea de carcinoma de mamas (Shim *et al.* 2003); por lo cual estos inhibidores pudieran constituir moléculas que pueden desarrollarse como nuevos agentes antiangiogénicos.

## CONCLUSIONES

La aminopeptidasa N es una enzima ampliamente distribuida en los seres vivos, con funciones muy importantes en la fisiología y los mecanismos de control en los mamíferos. Los recientes aportes al entendimiento

de la relación estructura-función para las aminopeptidasas N humana y porcina, constituyen elementos claves para un mayor conocimiento de esta enzima y el desarrollo de nuevos inhibidores que controlen de manera específica su actividad. La implicación de la aminopeptidasa N en procesos fisiológicos como el control de la presión arterial y las respuestas analgésicas, así como en procesos patológicos, en los cuales se encuentra sobre-expresada su actividad, la han convertido en un blanco importante para el diseño de potenciales nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la presión arterial en el SNC, el manejo del dolor, el desarrollo de antivirales y diferentes etapas de los procesos cancerígenos y de inflamación.

## LITERATURA CITADA

- Addlagatta A., L. Gay y B.W. Matthews. 2006. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 36: 13339–13344.
- Albiston A.L., S. Ye y S.Y. Chai. 2004. Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidasas. *Prot Peptid Letters.* 5:491-500.
- Arzola L. 2013. Localización anatómica, purificación y caracterización parciales de una aminopeptidasa neutra del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1766 (Polychaeta: Amphinomidae). Tesis de Diploma. Universidad de la Habana. Cuba
- Barret A.J., N.M. Rawlings y J.F. Woessner. 1998. Introduction: metalopeptidasas and their clanes. In: *Handbook of proteolytic enzymes.* Barret, Rawlings y Woessner (Eds.). Academic Press, London. 334-542.
- Barret A. J., N. M Rawlings y J. F Woessner. 2003. Introduction: metalopeptidasas and their clans. In: *Handbook of proteolytic enzymes.* Barret, Rawlings y Woessner (Eds.). Academic Press, London. 334-542. (segunda edición).
- Bauvois B. y D. Dauzonne. 2005. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, Biological Evaluations, and Therapeutic Prospects. *Med Res Reviews.* 2006.26(1):88-130.
- Bhagwat S.V., J. Lahdenranta, R. Giordano, W. Arap *et al.* 2001. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood.* 97: 652–659.
- Chavagnat F., M. G. Casey y J. Meyer. 1999. Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophiles* A. *App Environm Microb.* 65: 3001-3007.
- Chen L., Y-L. Ling, G. Peng y F. Li. 2012. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 44: 17966–17971.
- Deprez-Poulain R., Flipo M., Piveteau C., Leroux F., Dassonneville S., Florent I., Maes L., Cos P., Deprez B.. 2012. Structure-activity relationships and blood distribution of antiplasmodial aminopeptidase-1 inhibitors. *J Med Chem.* 2012 Dec 27;55(24):10909-17. doi: 10.1021/jm301506h
- Feracci H. y S. Maroux. 1980. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta.* 599: 448-463.
- Flipo M., I. Florent, P. Grellier, C. Sergheraert *et al.* 2003. Design, Synthesis and Antimalarial Activity of Novel, Quinoline-Based, Zinc Metallo-Aminopeptidase Inhibitors. *Bioorg Med Chem Letter.* 13: 2659–2662.
- Flipo M., T. Beghyn, V. Leroux, I. Florent *et al.* 2007. Novel selective inhibitors of the zinc plasmodial aminopeptidase PfA-M1 as potential antimalarial agents. *J Med Chem.* 50: 1322-1334.
- Florent I., Z. Derhy, M. Allary, M. Monsigny *et al.* 1998. A *Plasmodium falciparum* aminopeptidase gene belonging to the M1 family of zinc-metallopeptidasas is expressed in erythrocytic stages. *Mol Biochem Parasitol.* 97: 149–160.
- Fukasawa K.M., K. Fukasawa, M. Harada, J. Hirose *et al.* 1999. Aminopeptidase B is structurally related to leukotriene-A4 hydrolase but is not a bifunctional enzyme with epoxide hydrolase activity. *Biochem J.* 339: 497-502.
- Golich F.C., M. Han y M.W. Crowder. 2006. Over-expression, purification, and characterization of aminopeptidase N from *Escherichia coli*. *Prot Exp Pur.* 47: 634–639.
- Haeggstrom J.Z., Nordlund P. y Thunnissen M.M.G.M. 2002. Functional Properties and Molecular Architecture of Leukotriene A4 Hydrolase, a Pivotal Catalyst of Chemotactic Leukotriene Formation. *The Science World Journal.* 2: 1734–1749.
- Harbut M.B., G. Velmourougane, S. Dalal, G. Reiss *et al.* 2011. Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidasas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 34: 526–534.
- Ino K., S. Goto, T. Okamoto, S. Nomura *et al.* 1994. Expression of aminopeptidase N on human choriocarcinoma cells and cell growth suppression by the inhibition of aminopeptidase N activity. *Japon J Cancer Res.* 85: 927–933.
- Ito K., Y. Nakajima, Y. Onohara, M. Takeo *et al.* 2006. Crystal Structure of Aminopeptidase N (Proteobacteria Alanyl Aminopeptidase) from *Escherichia coli* and Conformational Change of Methionine 260 Involved in Substrate Recognition. *J Biol Chem.* 44: 33664–33676.
- Kyrieleis O.J.P., P. Goettiga, R. Kiefersauer, R. Hubera *et al.* 2005. Crystal Structures of the Tricorn Interacting Factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a Zinc Aminopeptidase in Three Different Conformations. *J Mol Biol.* 4: 787–800.
- Larrinaga G., L. Blanco, P. Errarte, M. Beitia *et al.* 2013. Altered peptidase activities in thyroid neoplasia and hyperplasia. *Dis Markers.* 35(6):825-832.
- Luan Y. y W. Xu. 2007. The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N. *Curr Med Chem.* 14: 639-647.
- Look A.T., R.A. Ashmun, L.H. Shapiro y Peiper S.C. 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Investigations.* 83: 1299-1307.
- Le Guen S., M. Mas Nieto, C. Canestrelli, H. Chen *et al.* 2003. Pain management by a new series of dual inhibitors of enkephalin degrading enzymes: long lasting antinociceptive properties and potentiation by CCK2 antagonist or methadone. *Pain.* 104: 139-148.

- Mucha A., M. Drag, J.P. Dalton y P. Kafarski. 2010. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Bioch.* 92: 1509-1529.
- McGowan S., C.J. Porter, J. Lowther, C.M. Stack *et al.* 2009. Structural basis for the inhibition of the essential *Plasmodium falciparum* M1 neutral aminopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 10.1073.
- Meng F., S. Suo, D.S. Zarlenga, Y. Cong *et al.* 2014. A phage-displayed peptide recognizing porcine aminopeptidase N is a potent small molecule inhibitor of PEDV entry. *Virology.* 456-457:20-27.
- Mina-Orsorio P. 2008. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.* 14: 361-71.
- Martínez J.M., I. Prieto, M.J. Ramírez, C. Cueva *et al.* 1999. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem.* 45: 1797-802.
- Noble F., N. Benturquia, A. Bilkei-Gorzo, A. Zimmer *et al.* 2008. Use of preproenkephalin knockout mice and selective inhibitors of enkephalinases to investigate the role of enkephalins in various behaviours. *Psychopharm.* 196:327-335.
- Noble F. y B.P. Roques. 2007. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 11(2): 145-159.
- Powers J.C. y J.W. Harper. 1986. Inhibitors of metallo-proteases. En: *Proteinaseinhibitors.* Barrett, A.J. y Salvensen, G. (Eds.). Elsevier. Amsterdam. 219-298.
- Pascual I., G. Valdés, D. Díaz, N. Castillo *et al.* 2009. Purification and functional characterization of porcine kidney cortex neutral aminopeptidase for its use in screening of inhibitory activity in marine invertebrates. IV Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. La Habana. Cuba.
- Pascual I., H. Gómez, T. Pons, M. Chappé *et al.* 2011. Effect of divalent cations on the porcine kidney cortex membrane-bound form of dipeptidyl peptidase IV. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 43: 363-371.
- Pathuri G., A.F. Hedrick, B. Disch, J. Doan *et al.* 2012. Synthesis and Evaluation of Novel Tc-99m Labeled Probestin Conjugates for Imaging APN/CD13 Expression In Vivo. *Bioconjug Chem.* 23 (1): 115-124.
- Pérez I., A. Varona, L. Blanco, J. Gil *et al.* 2009. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. Wiley InterScience. DOI 10.1002/hed.
- Pasqualini R., E. Koivunen y R. Kain. 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60: 722-7.
- Puertas M. del C., J.M. Martínez-Martos, M. Cobo, P. Lorite *et al.* 2013. Plasma renin-angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in early stage Alzheimer's disease and show gender differences but are not related to apolipoprotein E genotype. *Exp Gerontol.* 48(6):557-564.
- Rawlings N.D. y A.J. Barret. 1995. Evolutionary families of metallo-peptidases. *Methods in Enzymology* 248: 183-228.
- Rawlings N.D., Barret A.J. y Bateman A. 2014. MEROPS: the peptidase database. *Nuc Acids Res.* 38: D227-D233.
- Reaux A., M.C. Fournie-Zaluski, C. David, S. Zini *et al.* 1999. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 13415-13420.
- Rozenfeld R., A. Reaux, X. Iturrioz, C. Fassot *et al.* 2003. Aminopeptidase A, generating one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, plays a key role in central control of blood pressure. *Proc. West. Pharmacol.* 46: 39-44.
- Roques B. P. 2000. Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol.* 21: 475-483.
- Sjöström H., O. Norén y J. Olsen. 2000. Structure and function of aminopeptidase N. *Advanced Experiments of Medicine and Biology.* 25: 477.
- Shim J.S., J.H. Kim, H.Y. Cho, Y.N. Yum *et al.* 2003. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem. Biol.* 695-704.
- Scornik O.A y V. Botbol. 2001. Bestatin as an Experimental Tool in Mammals. *Curr Drug Metab.* 2: 67-85.
- Schreiter A., C. Gore, D. Labuz, M.C. Fournie-Zaluski *et al.* 2012. Pain inhibition by blocking leukocytic and neuronal opioid peptidases in peripheral inflamed tissue. *FASEB J.* 26: 5161-5171.
- Surowiak P., M. Drag y V. Materna. 2006. Expression of aminopeptidase N/CD13 in human ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer.* 16: 1783-8.
- Thielitz A., S. Ansorge, U. Bank, M. Tager *et al.* 2008. The ectopeptidases dipeptidyl peptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) and their related enzymes as possible targets in treatment of skin diseases. *Front Biosci.* 13: 2364-75.
- Thunnissen M., P. Nordlund y J.Z. Haeggstrom. 2001. Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struc. Biol.* 8:131.
- Tieku T y M. Hooper. 1992. Inhibition of aminopeptidases N, A and W: a re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochemical pharmacol.* 44: 1725-1730.
- Wickstrom M., R. Larsson, P. Nygren y J. Gullbo. 2011. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 3: 501-508.
- Wong A., D. Zhou, y J.M. Rini. 2012. The X-ray crystal structure of human Aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* 44: 36804-36813.
- Wright J.W., E. Tamura-Myers, W.L. Wilson, B.P. Roques *et al.* 2003. Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: 725-33.



**Editor para correspondencia:** Dra. Maday Alonso