REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
http://www.rccb.uh.cu

ARTÍCULO DE REVISIÓN

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

Aminopeptidase A from mammals: biochemical characteristics, physiological roles and implication in physiopathological processes in humans

Isel Pascual Alonso*, Alejandro Pedroso, Yarini Manuel Arrebola, Mario E. Valdés-Tresanco, Laura Rivera Méndez y Sandra Fortun

Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia: *isel@fbio.uh.cu*

RESUMEN

Las metaloaminopeptidasas son enzimas que específicamente hidrolizan el residuo del extremo amino de péptidos y proteínas, lo que lleva en algunos casos a su activación y en otros a su inactivación. Ellas pertenecen a las familias M1, M17 y M18, principalmente. En particular, la enzima glutamil aminopeptidasa de membrana, también conocida como aminopeptidasa ácida (APA, EC 3.4.11.7), desempeña funciones muy importantes en diferentes procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo de los péptidos relacionados con las etapas finales de la digestión, el control de la presión arterial, entre otros. Adicionalmente, una elevada actividad de esta enzima se encuentra implicada en la patogénesis de varios desórdenes humanos como la hipertensión arterial, glomérulo esclerosis y en la progresión del cáncer. 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 la APA 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, así como el desarrollo de inhibidores específicos y selectivos por la APA.

Recibido: 2018-03-08

Aceptado: 2018-08-05

Palabras clave: estructura de la APA, funciones de la APA, glutamil aminopeptidasa asociada a membrana, inhibidores de la APA, mecanismo catalítico de la APA

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, M17 and M18 families of peptidases. In particular, membrane glutamyl aminopeptidase (APA EC 3.4.11.7) plays functional roles in many physiological processes, including peptide metabolism related with blood pressure control, last steps of protein degradation, among others. Furthermore, the expression of APA being up regulated has been implicated in the pathogenesis of various human disorders like cancers, hypertension and glomeruloesclerosis. 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 APA, focused on the most recent published data for human and porcine enzymes as its models. Additionally, it integrates the important roles of APA in physio and pathophysiological processes of biomedical relevance and the development of specific APA inhibitors.

Keywords: *APA structure, APA inhibitors, APA functions, catalytic mechanism, membrane glutamyl aminopeptidase*

INTRODUCCIÓN

Las peptidasas o proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Pueden emplear diferentes mecanismos que involucran diferentes residuos catalíticos, lo que las distingue por tipo o clase mecanística. Las clases reconocidas actualmente son: Aspártico, Glutámico, Cisteíno, Metalo, Serino, Liasas de péptidos de asparagina, Mixtas (cisteína, serina, treonina) y un tipo general que incluye a las enzimas que aún no se han clasificado (Rawlings *et al.* 2018).

Las peptidasas están vinculadas a procesos que ocurren a nivel celular, ya sea de forma directa o indirecta, así como a eventos claves tales como: el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis, la nutrición, el recambio proteico, la migración e invasión, y también la fertilización e implantación del cigoto. Además, están involucradas en diferentes eventos fisiopatológicos como el cáncer, desórdenes neurodegenerativos, respiratorios y cardiovasculares, así como se ha corroborado su acción en infecciones parasitarias, virales y fúngicas (Abbenante y Fairlie 2005, Turk 2006, Drag y Salvesen 2010, Deu *et al.* 2012, Bogyo 2017, Rawlings *et al.* 2018).

Las ectopeptidasas son proteasas integrales de membrana las cuales, al estar orientadas de forma asimétrica, exponen el sitio catalítico hacia el exterior celular (Rawlings *et al.* 2018, Carl-McGrath *et al.* 2006). Su ubicación y tipo de actividad enzimática, determinantes en el flujo de información a través de la membrana, proveen un amplio intervalo de funciones tanto fisiológicas como patológicas. Se ha observado que varias de ellas pueden mostrar superposición parcial de intervalo de especificidad y patrones de expresión no necesariamente semejantes entre los diferentes tipos celulares, de ahí que un mismo sustrato pueda ser hidrolizado por diferentes ectopeptidasas en diferentes localizaciones anatómicas (Carl-McGrath *et al.* 2006). Debido a que la mínima disrupción del equilibrio proteolítico extracelular podría acarrear cambios drásticos en la fisiología celular, la actividad de las ectopeptidasas resulta clave en la regulación fina de procesos como el crecimiento celular, la degradación de la matriz extracelular, la migración y adhesión celular, la respuesta o tolerancia a determinadas señales exógenas, y la regulación autocrina, yuxtacrina y paracrina (Carl-McGrath *et al.* 2006).

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan enlaces peptídicos desde el extremo amino de las cadenas polipeptídicas. La mayoría 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 se encuentran involucradas en procesos fisiopatológicos y en enfermedades parasitarias (Mucha *et al.* 2010, Deu 2017, Drinkwater *et al.* 2017, Roy 2017). Las características estructurales determinan la subdivisión en familias. La gran familia de aminopeptidasas M1 (clan MA/E) son enzimas dependientes de zinc, que se caracterizan por la presencia de dos secuencias conservadas; un motivo consenso

de unión al zinc (HEXXH-(X18)-E) y el motivo de exopeptidasas 'GXMEN' (Chen *et al.* 2012, Drinkwater *et al.* 2017). A excepción de los virus, las aminopeptidasas M1 se encuentran distribuidas en todos los phyla, y han estado implicadas en muchas funciones, que incluyen el mantenimiento de la célula, crecimiento, desarrollo y defensa (Drinkwater *et al.* 2017).

Una de las ectopeptidasas que reclama gran atención actualmente es la aminopeptidasa ácida (APA, EC 3.4.11.7). Esta enzima está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos. La APA pertenece a la familia M1 del subclán MA (E) de metalopeptidasas y está altamente conservada (Mucha *et al.* 2010, Drinkwater *et al.* 2017). Se ha informado que la APA tiene pesos moleculares que oscilan alrededor de los 100 kDa, con un peso de 109 kDa para la isoforma humana y de 108 kDa informado para la isoforma porcina (Rawlings *et al.* 2018). El bolsillo S1 de la APA está estructurado para acomodar las cadenas laterales de residuos ácidos, por lo que esta enzima hidroliza residuos de aspártico y glutámico a partir del extremo amino.

La APA desempeña funciones fundamentales en una amplia gama de procesos fisiológicos, pues participa en el metabolismo de la angiotensina II del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el sistema nervioso central y otras localizaciones anatómicas, lo que la convierte en un importante regulador de la presión arterial (Cooper *et al.* 1986).

Además, está involucrada en procesos fisiopatológicos como: el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, la hipertensión arterial, glomeruloesclerosis y en la progresión del cáncer. En este último caso se encuentra asociada al desarrollo de neoplasmas renales, de trofoblastos malignos, coriocarcinoma renal y al cáncer colorrectal (Göhring *et al.* 1998, Lijun y Healy 1999, Tonna *et al.* 2008, Puertas *et al.* 2013, Blanco *et al.* 2014).

Las funciones tan importantes en que participan estos sistemas proteolíticos demandan de contrapartes que se encargan de regular su efectividad; tal es el caso de los inhibidores de proteasas. Actualmente, los inhibidores de proteasas han mostrado su potencialidad como herramientas terapéuticas efectivas con el fin de ser utilizadas ante diversas patologías, (Abbenante y Fairlie 2005, Turk 2006, Drag y Salvesen, 2010, Deu *et al.* 2012). Estudios precedentes informan que muchos de los inhibidores que actúan sobre la actividad enzimática de la APA son obtenidos a partir de síntesis química. Estos presentan valores de IC_{50} (Concentración de inhibidor necesaria para disminuir en un 50% la actividad de la enzima control) o de K_i (constante de inhibición generalmente expresada en términos de constante de disociación del complejo proteasa:inhibidor) en el orden micromolar (Mucha *et al.* 2010), aunque también se han informado inhibidores más potentes, con constantes de inhibición en el orden submicromolar (Yuan *et al.* 2014). En general estos se caracterizan por presentar grupos hidrofóbicos en su estructura, en su mayoría voluminosos, lo cual potencia la inhibición de la enzima (Revelant *et al.* 2015). Son escasos los informes de inhibidores de esta enzima obtenidos a partir de fuentes naturales. La bestatina, que fue aislada de la bacteria *Streptomyces olivoreticuli*, es el inhibidor modelo empleado en la caracterización y estudios de proteínas de la familia M1, incluyendo la APA (Mucha *et al.* 2010, Yang *et al.* 2013, Amin *et al.* 2018). Teniendo en cuenta las funciones fisiológicas que desempeña la APA en humanos, así como su participación en diferentes procesos patológicos, el presente trabajo se enfoca en las propiedades bioquímicas de esta enzima, sus funciones, su implicación en patologías humanas, así como el desarrollo de inhibidores efectivos frente a ella como potenciales agentes terapéuticos.

DESARROLLO

Las metaloaminopeptidasas. Características generales y clasificación

Las exopeptidasas son peptidasas que actúan en los extremos de la cadena polipeptídica produciendo aminoácidos libres o pequeños péptidos. Se pueden subdividir en aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Las primeras son enzimas proteolíticas que comienzan a hidrolizar los enlaces peptídicos de la cadena polipeptídica a partir del extremo amino (Barret *et al.* 2003, Rawlings *et al.* 2018). La gran mayoría de estas enzimas son metalopeptidasas, pero también forman parte de estas peptidasas las proteasas de tipo serino y cisteíno. Las metaloaminopeptidasas pueden remover en la proteólisis solamente un residuo aminoacídico (metaloaminopeptidasas estrictas) o pueden remover dipéptidos o tripéptidos (dipeptidil- o tripeptidil-metalo-aminopeptidasas) a partir de sustratos polipeptídicos (Mucha *et al.* 2010). La base de datos MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/) agrupa todos los datos acumulados acerca de los nuevos miembros representativos de las enzimas proteolíticas (Rawlings *et al.* 2018).

MEROPS usa el criterio de clasificación propuesto por Rawlings y Barret en 1993: una clasificación jerárquica que se basa en la estructura de la enzima, la organización de los dominios proteicos y la longitud de sus cadenas polipeptídicas. De manera particular destaca un alto grado de conservación de los aminoácidos, principalmente de las posiciones estructurales de las regiones de sus centros activos.

La base de datos MEROPS, teniendo en cuenta las similitudes en las secuencias aminoacídicas estadísticamente significativas, asigna a cada peptidasa en una familia, que posteriormente pasa a conformar un clan conjuntamente con otras familias en caso de que se demuestre homología entre ellas. Hasta el momento han sido identificados 15 clanes de metalopeptidasas, dentro de los cuales en seis podemos encontrar metaloaminopeptidasas. Estos son los clanes: MA (con 47 familias, por lo que resulta ser el más amplio), MF, MG, MH, MN y MQ (Rawlings *et al.* 2018).

Clan MA: Subclán MA (E): Familia M1

El clan MA es el mayor de las metalopeptidasas, con un total de 47 familias (Rawlings *et al.* 2018), todas constituidas por enzimas que contienen el ion metálico Zn^{2+} en su estructura. Este clan está conformado tanto por endopeptidasas como por exopeptidasas comprendiendo 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).

En las enzimas de este clan, el átomo de Zn^{2+} está ligado a la proteína mediante dos residuos de **His,** que forman parte de la secuencia consenso **HEXXH**. Además de los residuos de **His,** el Zn^{2+} catalítico está coordinado por una molécula de agua y un tercer residuo, cuya naturaleza determina la subdivisión del clan en los subclanes MA (E) y MA (M).

En el subclán MA (M) el tercer ligando puede ser un residuo de **His** o de **Asp** dentro de la secuencia **HEXXHXXGXXH/D**, mientras que en el subclán MA (E) el tercer ligando lo constituye un residuo de **Glu**, localizado al menos 14 residuos después del extremo carboxilo de la secuencia **HEXXH** (Barret *et al.* 2003, Rawlings *et al.* 2018). El átomo de oxígeno de la molécula de agua que actúa como ligando del metal 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.* 2018). Dentro de las familias más estudiadas del subclán MA (E) se encuentra la M1, que manifiesta una amplia distribución en el mundo vivo (Tabla 1); además, está implicada en muchas funciones que comprenden el mantenimiento celular, el crecimiento, el desarrollo y la defensa (Drinkwater *et al.* 2017).

A esta familia pertenecen enzimas de bacterias Gram (+) y Gram (-), cianobacterias, arqueas, protozoarios, hongos, animales y plantas (Rawlings *et al.* 2018, Drinkwater *et al.* 2017) (Tabla 1).

Las aminopeptidasas de la familia M1 existen en forma monomérica o dimérica. Generalmente son enzimas asociadas a la membrana como la aminopeptidasa N (APN) de mamíferos, la APA, la leucina aminopeptidasa derivada de adipocitos y la piroglutamil peptidasa II (Albiston *et al.* 2004). También se pueden encontrar enzimas citosólicas como la leucotrieno A_4 hidrolasa (enzima bifuncional con actividad aminopeptidasa) (Haeggstrom *et al.* 2002), la aminopeptidasa B (APB) (Fukasawa *et al.* 1999) y algunas asociadas a la pared celular (Drinkwater *et al.* 2017) como la aminopeptidasa neutra (APN, EC 3.4.11.2VIN) de la levadura *Candida albicans* (Klinke *et al.* 2008). La estructura de las aminopeptidasas de la familia M1, de manera general, comprende una cola corta unida al dominio transmembrana y un ectodominio grande formado, a su vez, por entre tres y cuatro dominios plegados y conservados. El dominio I, N-terminal, posee un núcleo de lámina β que, si bien queda ampliamente expuesto al solvente, contiene una región hidrofóbica que continúa en una región de anclaje en la membrana. El dominio II, catalítico, al igual que el de la termolisina, contiene el sitio activo flanqueado por una estructura mixta de hoja β y α-hélice que está altamente conservada en toda la familia. El dominio III, que está compuesto por un pliegue de tipo inmunoglobulina, no aparece en algunos miembros de la familia (como la leucotrieno A4 hidrolasa). El dominio IV, C-terminal, es la región más variable dentro de la familia. Es completamente helicoidal, con un arreglo tal que permite cubrir el sitio activo; también está involucrado en la dimerización de las correspondientes isoformas de mamíferos (Drinkwater *et al.* 2017).

Tabla 1. Algunos miembros de la familia M1 del clan MA de las metalopeptidasas.
Table 1. *Some members of the M1 family of the MA clan of the metallopeptidases.*

Enzima	Nomenclatura de la IUBMB*	Fuentes
Dipeptidasa Cys-Gly,alanil aminopeptidasa de membrana o aminopeptidasa N (APN)	EC 3.4.11.2	*Homo sapiens, Sus scrofa*
Glutamil aminopeptidasa o aminopeptidasa A (APA)	EC 3.4.11.7	*Homo sapiens*
Piroglutamil aminopeptidasa II (PPII)	EC 3.4.19.6	*Homo sapiens, Mus musculus, Ratus novergicus*
Aminopeptidasa de membrana regulada por insulina, cistinil aminopeptidasa, oxitocinasa, leucina aminopeptidasa de placenta, etc. (IRAP)	EC 3.4.11.3	*Homo sapiens*
Leucina aminopeptidasa derivada de adipocitos (A-LAP)	EC 3.4.11.-	*Homo sapiens*
Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)	EC 3.4.11.14	*Homo sapiens*
Aminopeptidasa de levaduras Apa, AapY´	-	*Candida albicans*
Lisina aminopeptidasa de bacteria	-	*Escherichia coli*
Aminopeptidasa O (AP-O)	EC 3.4.11.-	*Homo sapiens*
Aminopeptidasa B (APB)	EC 3.4.11.6	*Homo sapiens*
Leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4H)	EC 3.4.2.6	*Homo sapiens*
Aminopeptidasa Ey	EC 3.4.11.20	-
Aminopeptidasa específica para leucina insensible a puromicina (PILS-*AP)*	-	-
Aminopeptidasa II (APII)	-	-
Aminopeptidasa 1 de retículo endoplasmático ERAP-1	-	*Homo sapiens*
Aminopeptidasa 2 de retículo endoplasmático ERAP-2	-	*Homo sapiens*
Factor 2 de interacción con Tricorn de bacteria	-	*Thermoplasma acidophilum*
Factor 3 de interacción con Tricorn de bacteria	-	*Thermoplasma acidophilum*
Aminopeptidasa activada por frío (*Colwellia psychrerythraea*)	-	*Colwellia psychrerythraea*

En el caso de las aminopeptidasas ancladas a membrana, presentan una proyección del extremo amino hacia la cara citosólica. A esta le sigue un dominio transmembrana. De esta manera, el resto de la molécula queda expuesto hacia la región extracelular. En esta región extracelular se aprecian generalmente puentes de disulfuro y abundantes glicosilaciones, por lo que es común encontrar algunas de estas enzimas identificadas como antígenos de superficie (Barret *et al.* 2003, Albiston *et al.* 2004, Rawlings *et al.* 2018).

En la familia M1 un motivo bien conservado es la secuencia Gly-Ala-Met-Glu-Asn **(GAMEN)** (Fig. 1, Pascual *et al.* 2015). Esta secuencia, conocida también como motivo de exopeptidasa, en muy pocos casos manifiesta variaciones en los dos primeros residuos (Dalal *et al.* 2013).

Figura 1. Alineamiento Uniprot de las secuencias aminoacídicas de los centros activos de varias aminopeptidasas de la familia M1. AMPE_Human: Aminopeptidasa E humana, AMPN_Human: Aminopeptidasa N humana, AMPN_Pig: Aminopeptidasa N porcina, ERAP1_Human: Aminopeptidasa 1 de retículo endoplasmático humana, LCAP_Human: Leucil-cistinil aminopeptidasa humana, LKHA4_Human: Leucotrieno A4 hidrolasa humana, PSA_Human: aminopeptidasa sensible a la puromicina humana, AMPB_Human: Aminopeptidasa B humana, AMPO_Human: Aminopeptidasa O humana, TRHDE_Human: Ectoenzima degradadora de la hormona liberadora de tirotropina o Piroglutamil-aminopeptidasa II humana, AMPQ-Human: Aminopeptidasa Q humana, AMPQ-Mouse: Aminopeptidasa Q de ratón. 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 las utilizadas 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. * indican residuos completamente conservados : indican posiciones donde hay un alto grado de conservación de los residuos.

Figure 1. Uniprot alignment of the aminoacidic sequence of the active site of various M1 family aminopeptidases: AMPE_Human: human *aminopeptidase E,* AMPN_Human: human a*minopeptidase N,* AMPN_Pig: porcine Aminopeptidase N, ERAP1_Human*: Endoplasmatic reticulum aminopeptidase 1, LCAP_Human: human leucyl-cystinil aminopeptidase, LKHA4_Human: human leukotriene A4 hydrolase, PSA_Human: human puromycin sensitive aminopeptidase, AMPB_Human: human aminopeptidase B, AMPO_Human: human aminopeptidase O, TRHDE_Human: human thyrotrophin releasing hormone degrading enzyme or pyroglutamyl aminopeptidase II, AMPQ_Human: human aminopeptidase Q, AMPQ_Mouse: mouse 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. * indicates residues completely conserved. : indicates position with haigh degree of conservation of the residues.*

Debido al alto grado de conservación de la secuencia GAMEN, esta resulta muy útil para la identificación de los miembros de la familia (Barret *et al.* 2003, Albiston *et al.* 2004, Wong *et al.* 2012, Drinkwater *et al.* 2017).

Mediante la técnica de cristalografía y difracción de rayos X se ha logrado dilucidar la estructura tridimensional de varios miembros de esta familia tales como: leucotrieno A4 hidrolasa (EC 3.3.2.6) en complejo con su inhibidor bestatina (Thunnissen *et al.* 2001); factor 3 de interaccion con Tricorn de *Thermoplasma acidophilum* (Kyrieleis *et al.* 2005); APN de *Escherichia coli* (Pep N) en complejo con su inhibidor bestatina (Ito *et al.* 2006); APN de *Plasmodium falciparum* (PfAM 1) sola y en complejo con bestatina y análogos de baja masa molecular (McGowan *et al.* 2009, Harbut *et al.* 2011); la APA humana (Yang *et al.* 2013); ERAP-1 (Kochan, 2011); APN porcina y humana en complejo con sustratos y bestatina (Chen *et al.* 2012, Wong *et al.* 2012), entre otras (**Tabla 2).** En todas estas estructuras se aprecia que el dominio catalítico de esta familia enzimática presenta una elevada similitud estructural con la termolisina, a pesar de que en algunos casos solo hay un 7% de identidad de secuencia con las correspondientes cadenas polipeptídicas (Thunnissen *et al.* 2001).

Tabla 2. Estructuras cristalográficas informadas para enzimas miembros de la familia M1 de las metalopeptidasas (Información compilada a partir del sitio http://pfam.xfam.org/family/PF01433#tabview=tab9).

Table 2. *Crystallographic structures reported for members of the M1 family of metallopeptidases (Compiled from http://pfam.xfam.org/family/PF01433#tabview=tab9).*

Enzima	Código Pfam	Fuente	Códigos de las estructuras cristalográficas depositadas en la base de datos de proteínas (pdb)
Aminopeptidasa N	AMP1_PLAFQ	*Plasmodium falciparum* cepa FcB1 Columbia	3EBG, 3EBH, 3EBI, 3Q43, 3Q44, 3T8V
Aminopeptidasa N	AMPN_ECOLI	*Escherichia coli*	2DQ6, 2DQM, 2HPO, 2HPT, 2ZXG, 3B2P, 3B2X, 3B34, 3B37, 3B3B, 3KED, 3PUU, 3QJX
Aminopeptidasa N	AMPN_HUMAN	*Homo sapiens*	4FYQ, 4FYR, 4FYS, 4FYT
Aminopeptidasa N	AMPN_PIG	*Sus scrofa*	4FSC, 4FKE, 4FKH, 4FKK, 4HOM, 4NAQ, 4NZ8, 4OU3
ERAP 1	ERAP1_HUMAN	*Homo sapiens*	2YD0, 3MDJ, 3QNF
ERAP 2	ERAP2_HUMAN	*Homo sapiens*	3SE6, 4E36, 4JBS, 5A80, 5AB2, 5CU5
Aminopeptidasa A	AMPE_Human	*Homo sapiens*	4ZX5, 4ZX6, 4KX7, 4KX8, 4KX9, 4KXA, 4KXB, 4KXD
Leucotrieno A4 hidrolasa	LKHA4_HUMAN	*Homo sapiens*	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	*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 204508 / S288c)	2XPY, 2XPZ, 2XQ0
	Q7WVY1_COLP3	*Colwellia psychrerythraea* (34H / ATCC BAA-681)	3CIA
	Q9JYV4_NEIMB	*Neisseria meningitidi s* serogroup B (MC58)	2GTQ
Factor F3	TRF3_THEAC	*Thermoplasma acidophilum* (ATCC 25905 / DSM 1728 / JCM 9062 / NBRC 15155 / AMRC-C165)	1Z5H, 3Q7J

Características bioquímicas de la Aminopeptidasa Ácida (APA) de mamíferos

Características estructurales

Dentro de la familia M1, una de las aminopeptidasas que reclama mayor atención actualmente debido a su probado potencial como diana terapéutica es la aminopeptidasa ácida (APA, EC 3.4.11.7) (Drinkwater *et al.* 2017). Esta enzima se identificó por primera vez en preparaciones de riñón de rata y conejillo de Indias. Le denominaron α-glutamil peptidasa porque catalizaba la hidrólisis del N-(α-L-glutamil)-β-naftilamida (Glenner *et al.* 1962). Posteriormente, se descubrió que la enzima hidrolizaba residuos de aspartilo del extremo amino y exhibía principalmente actividad de exopeptidasa, por lo cual fue llamada aminopeptidasa A (α-amino peptidasa ácida) (Glenner *et al.* 1962).

La APA de mamíferos es una proteína de membrana tipo II. Se caracteriza por la siguiente estructura: una cola N-terminal intracelular corta, un anclaje

transmembrana de un solo paso, un tallo pequeño y un ectodominio C-terminal grande, tal y como se ha informado para otros miembros de la familia M1 como la APN de mamíferos. Se ha informado que la APA tiene pesos moleculares que oscilan alrededor de los 100 kDa. La isoforma humana se caracteriza por una masa molecular de 109 kDa y de 108 kDa informado para la isoforma porcina. La secuenciación de los aminoácidos del antígeno de diferenciación de linfocitos B en ratones (BP-1\6C3), recientemente reconocido como la APA, reveló la presencia de 22 residuos hidrofóbicos hacia el segmento N- terminal de la enzima. Esto es característico de las proteínas integrales de membrana tipo II. En estas proteínas se encuentran separado un pequeño dominio amino terminal citoplasmático (17 aminoácidos aproximadamente) de un largo ectodominio carboxilo terminal (906 aminoácidos aproximadamente).

Este dominio extracelular contiene el sitio activo, incluida la secuencia consenso HEXXH encontrada en la familia de las metaloproteasas de zinc (Yang *et al,* 2013). El ectodominio de la APA humana tiene las mismas estructuras de dominio y disposición que aparecen en otros miembros de la familia M1. Consiste en cuatro dominios distintos: cabeza, que se corresponde con el dominio IV y es la región carboxilo terminal de la molécula (residuos 633-954); lado, que se corresponde con el dominio III (residuos 543-632); cuerpo, que se corresponde con el dominio II (residuos 294-542); y cola, que se corresponde con el dominio I (residuos 76-293) según la definición de Drinkwater *et al* (2017). El sitio de unión al zinc está ubicado en una cavidad creada por los dominios de la cabeza, lado y cuerpo (Fig. 2) (Yang *et al,* 2013).

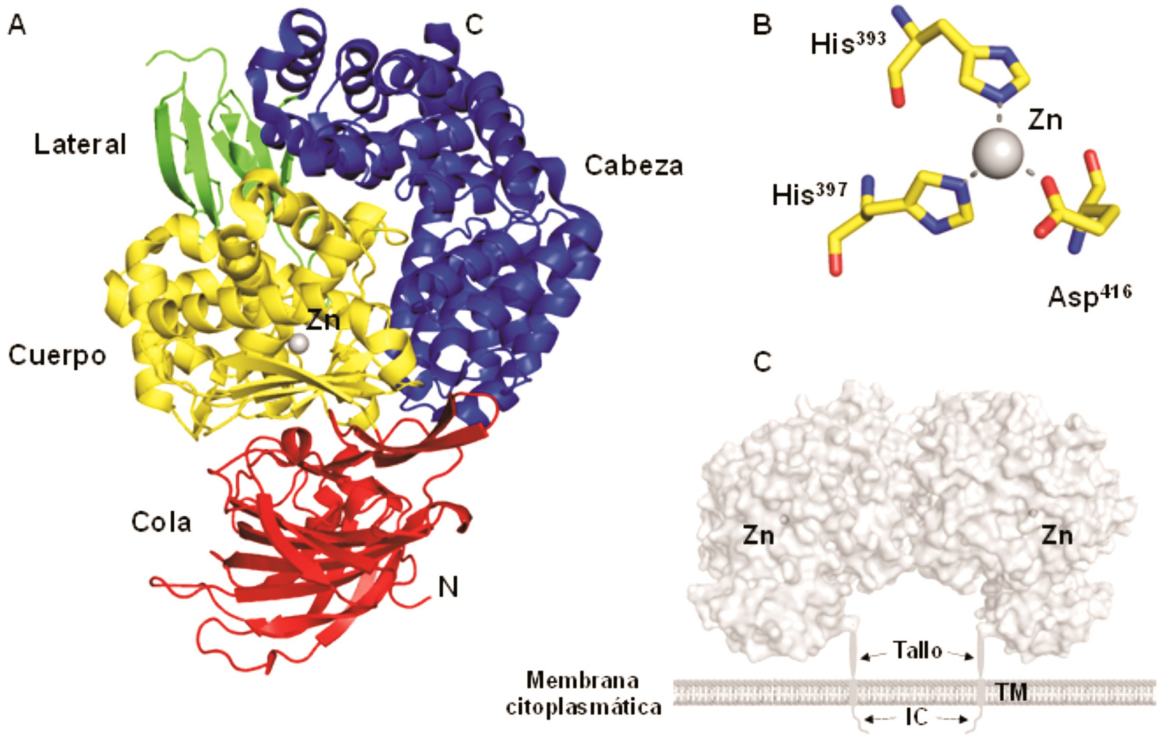

Figura 2. Estructura general del ectodominio de la APA humana. **A** El ectodominio de la APA humana se puede subdividir en 4 partes: cola (rojo), cuerpo (amarillo), lado (verde) y cabeza (azul). **B** Residuos que participan en la coordinación del átomo de zinc en el centro activo. **C** Modelo de la estructura dimérica de la APA humana sobre la superficie celular. TM-segmento transmembrana, IC-segmento intracelular. *(Adaptado de Yang et al, 2013).*

Figure 2. *General structure of the human APA ectodomain***. *A** The human APA ectodomain can be divided in four parts: tail (red), body (yellow), lateral (green) and head (blue). **B** Residues that participle in the zinc atom coordination at the active site. **C** Model of the dimeric human APA structure over the cell surface. TM-transmembrane segment, IC- intracellular segment. (Adapted from Yang et al, 2013)*

La cavidad del sitio activo de las enzimas de la familia M1 puede alternar entre una conformación abierta (para la carga del sustrato o la descarga del producto) y una conformación cerrada para la catálisis. La cavidad del sitio activo de la APA en la conformación cerrada es significativamente más estrecha que la de APN de mamíferos en igual conformación (Fig. 3), lo que sugiere que la APA excluye los sustratos peptídicos grandes del acceso a su sitio activo y, por tanto, tiene un intervalo más restringido de sustratos en comparación con la APN (Yang *et al.* 2013).

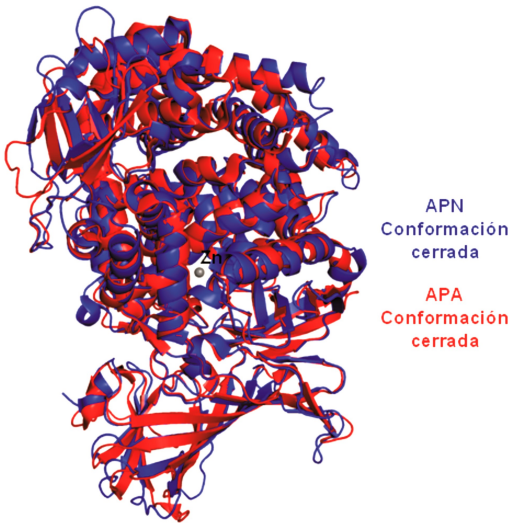

Figura 3. Alineamiento estructural de APA y APN humanas**.** Ambas enzimas se encuentran en su conformación cerrada. La APN humana se muestra en color azul (PDB ID: 4FYQ) mientras que la APA humana se muestra en color rojo (PDB ID: 4KX7).

Figure 3. *Structural aligment of human APA and APN. Both enzymes are represented in their closed conformation. Human APN is showed in blue (PDB ID: 4FYQ) while human APA is showed in red (PDB ID: 4KX7).*

El ectodominio de la APA forma un homodímero novedoso. En el cristal, solo hay una molécula del ectodominio de la APA en cada unidad asimétrica (Unidad asimétrica: es la parte del espacio que no contiene ningún elemento de simetría y que por aplicación de los elementos del grupo espacial permite obtener una celda elemental para el diseño de cristales, por lo que resulta útil para describir la estructura cristalina). Sin embargo, dos moléculas de unidades asimétricas adyacentes forman el homodímero a través de sus dominios de cabeza (Fig. 2), abarcando 1600 $Å^2$ de superficie accesible entre ellas. Aunque tanto la APA como la APN forman un homodímero a través de las interacciones de los dominios principales establecidos y numerados como II, III y IV, las regiones específicas que están implicadas en la formación del dímero sin diferentes, lo que conduce a interfaces de los dímeros completamente diferentes (Fig. 2). La formación de dímeros puede aumentar la estabilidad de la APA y la APN, y hacerlas resistentes a ambientes más drásticos que las enzimas monoméricas intracelulares de la familia M1 y que se encuentran principalmente en microorganismos (Ito *et al.* 2006, McGowan *et al.* 2009, Harbut *et al.* 2011). Además, la disposición de dímeros cabeza-cabeza en ambas enzimas puede facilitar los cambios conformacionales de cerrado a abierto, durante los cuales se mantienen las interfaces diméricas y los anclajes de membrana se mueven a lo largo de la membrana celular (Yang *et al.* 2013).

Mecanismo catalítico de la APA

Como ya se apuntaba, hay antecedentes según los cuales las enzimas de la familia M1 se pueden encontrar en dos conformaciones distintas: una abierta (catalíticamente inactiva) y otra cerrada (catalíticamente activa), que alternan mediante cambios conformacionales a través de un movimiento de bisagra que ocurre entre el dominio carboxilo terminal IV y el resto del ectodominio (Thunnissen *et al.* 2001, Wong *et al.* 2012, Chen *et al.* 2012). Los estudios de mutagénesis dirigida al sitio catalítico de la APA han permitido identificar que la **His-385** y la **His-389** y el **Glu-408** son los tres residuos implicados en la coordinación del zinc. Además, el **Glu-386** se encuentra involucrado en la catálisis, lo que indica que la APA (al igual que la termolisina y la APN), pertenece a la familia de las gluzincinas.

Estos antecedentes han llevado a proponer un mecanismo básico general para la hidrólisis peptídica por parte de la APA, similar al propuesto para la termolisina, deducida de los estudios de difracción de rayos X. En comparación con los modelos del sitio activo de la termolisina, en la catálisis de la APA hay otros residuos implicados como la **Tyr-471**. En el mecanismo descrito para la APA actualmente, el grupo amino libre y el carboxilato de la cadena lateral del residuo de glutámico amino terminal del sustrato están acomplejados con residuos del bolsillo S1, y el átomo de zinc está coordinado con sus tres ligandos (**His-385**, **His-389** y **Glu-408**) y una molécula de agua. La carga negativa del **Glu-386** polariza la molécula de agua coordinadora del zinc y promueve el ataque nucleofílico hacia el carbono carbonílico del enlace peptídico a escindir. El intermediario tetraédrico resultante se estabiliza mediante una interacción electrostática con el ion Zn^{2+} y mediante enlaces de hidrógeno con el **Glu-386** y la **Tyr-471**, actuando esta última como un catalizador electrofílico a través de la interacción del grupo hidroxilo de la tirosina con el oxianión (Fig. 4) (Vazeux *et al.* 1997).

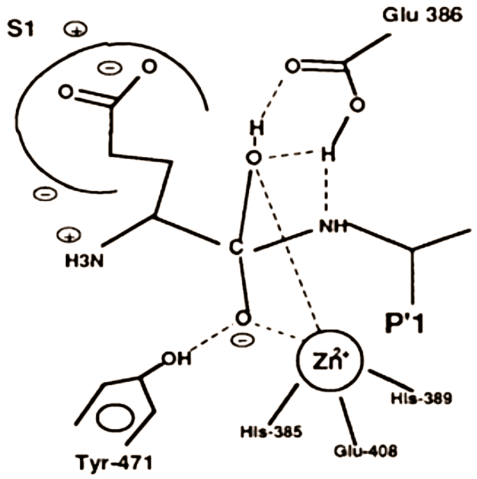

Figura 4. Interacción del péptido sustrato con el ion Zn^{2+} y la Tyr 471 en el sitio activo de APA durante la catálisis. (Adaptado de Vazeux *et al*, 1997). Las líneas discontinuas representan interacciones por puentes de hidrógeno.

Figure 4. *Interaction of substrate peptide with Zn^{2+} ion and Tyr 471 at the active site of APA during catalysis. (Adapted from Vazeux et al, 1997).Dotted lines indicate hydrogen bond interactions.*

Especificidad de sustrato de la APA en ausencia de calcio

APA y APN forman las mismas interacciones con la cadena principal del residuo amino terminal (residuo P1) de sus ligandos, lo que sugiere que las dos enzimas comparten un mecanismo catalítico común a pesar de su modesta similitud de secuencia. Sin embargo, el bolsillo S1, que acomoda la cadena lateral de ligandos en posición P1, difiere marcadamente entre la APA y la APN, de acuerdo con las diferentes especificidades de sustrato de las dos enzimas. En general, el bolsillo S1 de la APN es en gran medida hidrofóbico y prefiere acomodar cadenas laterales de residuos de esta misma naturaleza. Por el contrario, el bolsillo S1 de la APA es polar y prefiere, por consiguiente, acomodar las cadenas laterales de residuos en posición P1 de carácter polar. En particular, el bolsillo S1 de la APA está estructurado para acomodar las cadenas laterales de residuos ácidos (Yang *et al.* 2013). En aminoácidos como el glutámico, la cadena lateral de carboxilato forma un fuerte puente salino con la **Arg-887** y un enlace de hidrógeno con la **Thr-356** en el bolsillo S1 en la enzima humana (Fig. 5B). Estas interacciones energéticamente favorables son consistentes con una alta actividad de la APA sobre sustratos con un glutamato en posición P1. Sin embargo, en ausencia de calcio, la actividad de la APA es relativamente baja sobre los sustratos con un aspartato en posición P1. Esto probablemente esté dado porque la cadena lateral del aspartato, que sería en este caso más corta, formaría un puente salino débil con la **Arg-887.**

El bolsillo S1 también acomoda las cadenas laterales de los residuos básicos (Fig. 5A). Al agregar una arginina, el grupo guanidinio de este aminoácido forma un puente salino con la cadena lateral del **Asp-221**, un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la cadena principal perteneciente al **Glu-223**, y otro enlace de hidrógeno con la cadena lateral de la **Thr-356** (Fig. 5A). En comparación con el glutamato, la cadena lateral de la arginina se encuentra orientada de forma diferente, lo que reduce, pero no elimina, la repulsión de carga con la **Arg-887** en el bolsillo S1. Por esta razón, en ausencia de calcio, la arginina es menos favorecida que el glutamato, pero más favorecida que el aspartato (Fig. 5A) (Yang *et al.* 2013).

El bolsillo S1 de la APA no permite acomodar las cadenas laterales de residuos neutros, evidenciándose baja actividad de la APA frente a sustratos con leucina o fenilalanina en posición P1. Las cadenas laterales de la leucina y la fenilalanina forman interacciones hidrofóbicas con las cadenas laterales de la **Phe-474** en el bolsillo S1, pero también tienen interacciones estéricas desfavorables con residuos polares en el mismo bolsillo. Por tanto, los residuos con cadenas laterales neutras grandes en el sitio P1 del sustrato son desfavorecidos en la unión a la APA (Yang *et al.* 2013, Drinkwater *et al.* 2017).

Especificidad del sustrato en presencia de calcio. Modulación de la actividad de la APA por el calcio

El sitio de unión al calcio se encuentra en el bolsillo S1 de la APA, adyacente a la cadena lateral de los residuos en posición P1 de sus ligandos. En ausencia de calcio, el sitio de unión al mismo está ocupado por una molécula de agua (que se encuentra formando enlaces de hidrógeno con otra molécula de agua), por la cadena lateral del **Asp-221**, y por el glutamato del sustrato unido (que probablemente es protonado debido al fuerte puente salino bifurcado con la **Arg-887**) (Fig. 5B). Al agregar calcio, en el mapa de densidad electrónica se observa una densidad de electrones positiva significativa en este sitio, lo que indica una especie más rica en electrones que el agua en ausencia de calcio.

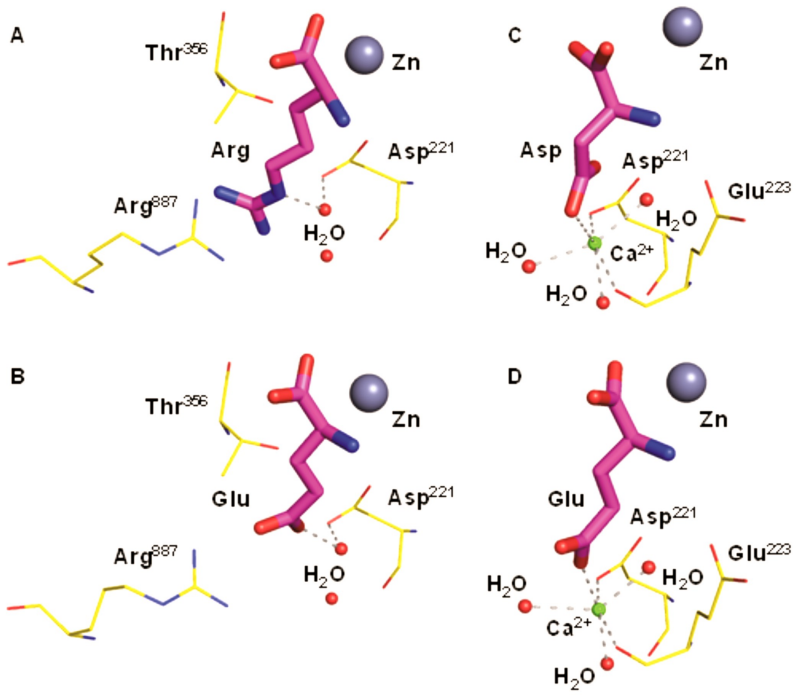

Figura 5. Interacciones de la APA humana con sus sustratos en ausencia y presencia de Ca^{2+}. **A y B** Interacciones entre el sitio S1 de la APA humana y los aminoácidos arginina y glutamato en ausencia de Ca^{2+}. **C y D** Interacciones entre el sitio S1 de la APA humana y los aminoácidos aspartato y glutamato en presencia de Ca^{2+}. En todos los casos el átomo de zinc está representado como una esfera de color gris y los sustratos se han representado como varillas (carbono-violeta, nitrógeno-azul y oxígeno-rojo). Los aminoácidos del sitio S1 aparecen como líneas (carbono-amarillo, nitrógeno-azul y oxígeno-rojo). El átomo de calcio aparece como una esfera de color verde. Los enlaces de hidrógeno se han representado como líneas discontinuas de color gris. Las moléculas de agua aparecen como esferas de color rojo.

Figure 5. *Interactions of the human APA with their substrates in absence and presence of* Ca^{2+}. ***A and B*** *Interactions between S1 site from human APA and the aminoacids arginine and glutamate in absence of* Ca^{2+}. ***C and D*** *Interactions between S1 site from human APA and the aminoacids aspartate and glutamate in presence of* Ca^{2+}. *In all cases the zinc atom are represented by a grey sphere and the substrate are represented in lines (carbon-violet, nitrogen-blue and oxygen-red). The atom of calcium appears as a green sphere. The hydrogen bonds are represented in grey dotted lines. Water molecules are represented as red spheres.*

Además, en presencia de calcio, se observan dos moléculas de agua adicionales, lo que aumenta el número de coordinación a seis, en consonancia con el calcio que reemplaza al agua (Yang *et al.* 2013).

El sitio de unión a calcio proporciona una base estructural para la actividad de la APA modulada por este catión. La presencia de calcio en el sistema potencia la actividad de la APA en los sustratos con un aspartato en posición P1 (Fig. 5C). El calcio potencia las afinidades de unión del glutamato y el aspartato a la APA al ligar sus cadenas laterales de carboxilato (Fig. 5 C y D). Por el contrario, la cadena lateral de la arginina, con carga positiva, no puede unirse eficazmente debido a la repulsión de la carga con este catión, aunque podría observarse en cristales de la APA en ausencia de calcio (Fig. 5A). Por lo tanto, el ion calcio que se une al bolsillo S1 de la APA potencia la unión de residuos ácidos en el sitio P1 del sustrato mediante la coordinación de sus cadenas laterales, pero reduce la unión de residuos básicos en el sitio P1 del sustrato debido a la repulsión de carga de las cadenas laterales con su carga positiva como catión.

La modulación de la actividad de la APA por calcio es única dentro de la familia M1 y constituye un aspecto crucial para la especificidad de sustrato de esta enzima y su función biológica (y regulación de la misma) en las diferentes regiones anatómicas donde se localiza. En particular, es de gran relevancia fisiológica en el cerebro, pues las concentraciones de calcio que modulan la actividad de la APA se encuentran en el mismo intervalo que las concentraciones de este catión en el fluido cerebral (1–2 mM) (Jones y Keep, 1988).

Localización anatómica de la APA en mamíferos: Funciones fisiológicas y diferentes patologías asociadas

Localizaciones anatómicas y funciones fisiológicas

La APA también ha sido denominada angiotensinasa (Nagatsu 1965, Sakura *et al.* 1983), dado que uno de sus principales sustratos fisiológicos es la angiotensina II (Ang II), un importante regulador de la presión arterial dentro del sistema renina-angiotensina (RAS). Al igual que en el RAS sistémico, la Ang II cerebral es generada por la ruptura secuencial del precursor angiotensinógeno por la proteasa aspártico renina (EC 3.4.23.15), la cual produce el decapéptido inactivo angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), la que es entonces convertida en la Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) por la Zinc-metalo aminopeptidasa Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE; EC 3.4.15.1). Subsecuentemente, la Ang II es metabolizada en la Ang III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) y esta, a su vez, en la Ang IV (Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) por la acción combinada de las aminopeptidasas cerebrales APA y APN, respectivamente (Zini *et al.* 1996).

Los péptidos derivados de la angiotensina desempeñan diferentes funciones en el sistema RAS cerebral y sistémico: en el RAS sistémico la Ang II es el principal efector que incrementa la presión sanguínea, mientras que en el sistema RAS cerebral, la Ang III desempeña esta función (Zini *et al.* 1996, 1998, Réaux *et al.* 1999).

Estudios con inhibidores selectivos de la APA como EC33 [(*S*)-3-amino-4-mercapto-butil sulfónico] han demostrado que en el cerebro la APA genera la Ang III, la cual ejerce una acción estimuladora tónica sobre el control de la presión sanguínea en animales hipertensos e incrementa la liberación de arginina vasopresina. Por lo tanto, la inhibición de la APA con inhibidores selectivos normaliza la presión en la ratas hipertensas, lo que sugiere que la APA cerebral constituye una diana promisoria para el desarrollo de inhibidores potentes y selectivos, que crucen la barrera hematoencefálica, como agentes antihipertensivos (Drink-water *et al.* 2017).

Otro sustrato fisiológicamente activo de la APA es el péptido colecistoquinina (CCK-8). Este péptido se expresa en el sistema nervioso central (en el núcleo paraventricular, en el núcleo supraóptico y en la hipófisis) y su metabolismo *in vivo* está modificado por inhibidores de la APA. Una amplia distribución tisular de la enzima se observó mediante tinción inmunohistoquímica y ensayo histoenzimático, indicando la implicación que tiene en el mantenimiento de las funciones fisiológicas del organismo (Li *et al.*1993). En la gran mayoría de los ensayos inmunohistoquímicos, la actividad de la APA se ha informado en la placenta y el suero de humanos, lo que apoya la posible participación de la APA en el metabolismo de la angiotensina. La actividad de la APA también se ha documentado para el borde en cepillo de los enterocitos en el intestino delgado, donde participa en la degradación final de las proteínas para la nutrición; el túbulo proximal del riñón (donde es particularmente abundante y participa en la reabsorción de aminoácidos y péptidos); y en muchos otros tejidos de diversas especies de mamíferos (Mizutani *et al.* 1981, Lalu *et al.* 1984, Gossrau *et al.* 1987, Yamada *et al.*1988).

Existen además evidencias que sugieren que el gen de la APA es altamente conservado evolutivamente en los humanos, los monos, las ratas, los ratones, los perros, las vacas, los conejos, los pollos y en las levaduras. Desde el descubrimiento de que la APA era idéntica al antígeno BP-1 murino (Cooper *et al.*1986), el anticuerpo monoclonal antiBP-1 se ha utilizado ampliamente para la determinación de la distribución de esta enzima, principalmente en modelos murinos. La actividad de la APA en ensayos *in vivo* en ratones se ha detectado con amplia intensidad en el órgano vascular de la lámina terminal, el órgano subfornical, la eminencia media, el área postrema y el plexo coroideo. Todas estas estructuras son órganos circumventriculares que se encuentran fuera de la barrera hematoencefálica (Healy *et al.* 1993; Zini *et al.* 1998). Contienen una red densa de capilares fenestrados y un gran número de receptores de la angiotensina II de tipo 1 caracterizados por sus sitios de unión específica. Debido a su ubicación, estos receptores pueden estar accesibles a la angiotensina II circulante o a la angiotensina III recién obtenida en los vasos sanguíneos por acción de la APA.

También se ha encontrado actividad sustancial de la APA en estructuras presentes dentro de la barrera hematoencefálica, como el núcleo supraóptico, el núcleo paraventricular, el núcleo reticular lateral y el núcleo del tracto solitario. Las terminaciones nerviosas angiotensinérgicas, la Ang II y III y los receptores de angiotensina, están presentes en estas estructuras. El hallazgo de una actividad sustancial de la APA en estos núcleos, en los cuales los microvasos son menos abundantes que en los órganos circumventriculares, sugiere

que la enzima podría no estar presente exclusivamente en la microvasculatura, sino también en las neuronas y las células gliales (Healy y Wilk 1993).

En un trabajo posterior, Mota *et al* (2008) midieron específicamente la actividad de la APA en más de 40 áreas diferentes del cerebro humano. Las mayores actividades se identificaron en el plexo coroideo y la glándula pineal. Una elevada actividad se detectó también en la médula oblonga dorsomedial, el núcleo accumbens y en el hipotálamo. En este último específicamente en los núcleos paraventricular (similar a Healy y Wilk 1993) y supraóptico. La inmunotinción en paralelo demostró por primera vez, la presencia de la APA, además, en cuerpos neuronales y fibras, en el núcleo hipogloso, el núcleo motor dorsal del vago, los núcleos del tracto solitario, el núcleo Roller, y el núcleo cuneato (todas ellas regiones sensibles a las angiotensinas e involucradas en la regulación de la presión sanguínea en humanos).

Patologías asociadas a la actividad de la APA

Se ha establecido que la APA, junto a otras aminopeptidasas de la familia M1 que forman parte del sistema renina-angiotensina, se encuentra involucrada en el desarrollo de disímiles enfermedades, entre ellas 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).

Lijun y Healy (1999) en modelos animales demostraron que un aumento significativo en la actividad de la APA refuerza las patologías asociadas a la presión arterial, pues produce elevadas cantidades de la Ang III, que es el péptido activo en el cerebro (Lijun y Healy 1999). Estudios de mutagénesis sitio dirigida realizados en el 2009 comprobaron que mutaciones en determinados alelos que codifican para la APA producen una enzima perfectamente funcional pero que es capaz de aumentar la susceptibilidad de las personas a sufrir glomeruloesclerosis (Tonna *et al.* 2009).

Como se ha mencionado con anterioridad, la APA se encuentra involucrada en la degradación de la Ang II, lo que la convierte en un paso limitante en la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona; esto favorece su implicación en desórdenes renales. Estudios realizados por Tonna *et al.* (2009) demostraron que un incremento en la presión sanguínea puede causar daños en la reabsorción glomerular e incluso fibrosis. Según los resultados obtenidos en ratones BALB/c, estas mutaciones de la APA presentes en humanos, también causan albuminuria aguda, lo que constituye un factor indicativo de problemas en la filtración a nivel de glomérulo, y puede ser un factor permisivo a la insuficiencia renal.

La APA también ha sido descrita como el antígeno de diferenciación gp160 en el riñón humano. Inmunoensayos y estudios enzimáticos semicuantitativos en líneas celulares de carcinoma de células renales y cánceres renales primarios, han mostrado actividad y expresión alterada de este antígeno en estos neoplasmas. La actividad del gp160 (APA) se mostró reducida en estos cánceres, lo que respaldó la hipótesis de que la pérdida de varias peptidasas fisiológicamente significativas puede ser un paso crítico en la transformación maligna de los tejidos renales (Göhring *et al.*1998). Solo se manifestó un incremento de la actividad de la misma en carcinomas de células claras del riñón (CCRCC) de alto grado, lo que se correlacionó positivamente con el tamaño del tumor, sugiriendo que esta peptidasa probablemente esté involucrada en el crecimiento y la agresividad del CCRCC. Se ha informado también que esta enzima desempeña un papel funcional como regulador de la Ang II, mediando crecimiento tumoral y la invasividad a través de la conversión de la Ang II producida localmente en varios tumores sólidos (Blanco *et al.* 2014).

Tomando en cuenta el papel de la APA en el metabolismo de la Ang II y la expresión de esta hormona en la unidad úteroplacentaria (Poisner 1998, Nielsen *et al.* 2000), la APA se purificó de la placenta humana y se probó que se expresa en trofoblastos placentarios. Este resultado indicó que esta peptidasa está relacionada con el mantenimiento de la homeostasis durante el embarazo (Mizutani *et al.* 1994, Hariyama *et al.* 2000). En cambio, se comprobó que la actividad placentaria de la APA fue mayor en pacientes embarazadas con preclampsia, que en mujeres embarazadas normales. También se demostró que la APA estaba altamente expresada en trofoblastos malignos y tejidos de coriocarcinoma (Ino *et al.* 2000). No obstante, un estudio realizado por Ino *et al.* (2003), proporcionó la primera demostración de que un AT1R funcional (receptor acoplado a proteína G de alta afinidad al cual se une la Ang II) está presente en células trofoblásticas BeWo humanas. Además, que a través de la activación de AT1R y sus vías de señalización, la PKC (proteína quinasa C) / MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), la

Ang II estimula la proliferación celular trofoblástica y que es capaz de aumentar la expresión de la APA. Esto es indicativo de que el sistema Ang II-AT1R-APA está implicado en la regulación del crecimiento de la placenta humana y en la progresión de los tumores trofoblásticos.

Adicionalmente, estudios clínicos muestran una correlación positiva entre la expresión de APA, la metástasis y el mal pronóstico para los pacientes con cáncer colorrectal (CCR). TWIST es un factor de transcripción básico altamente conservado implicado en el desarrollo biológico y vinculado a los oncogenes. Este se ha descrito como un marcador pronóstico de CCR.

El aumento de la expresión de la APA en la membrana celular puede aumentar la actividad catalítica de la APA y sustratos relacionados con metástasis, como la Ang III; además, se ha visto que un aumento en la actividad de la APA da como resultado la activación del NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y la expresión de TWIST en cáncer colorrectal. Por lo tanto, se plantea que la APA probablemente desempeñe un papel importante en la invasión celular, el inicio del tumor y la resistencia a los fármacos, todos los cuales son dependientes de la actividad enzimática (Chuang *et al* 2017).

Inhibidores de APA

Actualmente, debido a la constante y creciente demanda de respuestas y soluciones a las enfermedades que han surgido y evolucionando, en las cuales las proteasas son parte de las bases moleculares, los inhibidores de peptidasas han surgido como una alternativa muy prometedora. Principalmente, se ha incrementado la búsqueda de agentes quimioterapéuticos que permitan el tratamiento de enfermedades tan diversas como pueden ser el cáncer, enfermedades de origen viral (sida), la hipertensión arterial o también en estudios encaminados a dilucidar el papel fisiológico de determinadas peptidasas en el organismo (Abbenante y Fairlie 2005, Turk 2006, Drag y Salvesen 2010, Deu *et al* 2012).

Teniendo en cuenta la implicación de la APA en numerosos trastornos que son objeto de investigación médica (la hipertensión arterial central, el cáncer colorrectal, el cáncer cérvico uterino, la existencia de trofoblastos malignos, el coriocarcinoma, las neoplasmas renales), esta enzima se ha considerado un blanco potencial para el diseño de inhibidores que pueden ser usados potencialmente en ensayos clínicos, como candidatos para medicamentos (Drinkwater *et al.* 2017).

Actualmente la estrategia general para el diseño de ligandos sintéticos tiene en cuenta la presencia del ion metálico en el centro activo de APA. Estos poseen dos características estructurales fundamentales: una región específica, que se encarga del reconocimiento del centro activo de la enzima y otra región con grupos funcionales específicos que sean capaces de establecer complejos apropiados con el ión metálico.

Si se tiene un esqueleto que contenga cadenas laterales optimizadas capaces de interactuar con el sitio de unión de la enzima, se le puede incorporar un fragmento de unión al metal. Como resultado, los inhibidores no covalentes de estructura aminoacídica/peptídica (los sustratos naturales, análogos del estado de transición o análogos de productos) han sido los más empleados (Mucha *et al.* 2010).

Inhibidores naturales: Bestatina, sus derivados y Amastatina

Uno de los primeros inhibidores más potentes y con amplio espectro de acción frente a las metaloaminopeptidasas es la bestatina (Fig. 6, Tabla 3). Esta puede actuar como inhibidor competitivo y no competitivo α>1, tanto de unión rápida, como lenta, por ejemplo, frente a las enzimas LAP y APN, respectivamente (Mucha *et al.* 2010, Pascual *et al.* 2017).

El grupo hidroxilo α de este compuesto y el grupo carbonilo adyacente coordinan el ion de zinc, lo que determina su direccionalización al centro activo de las metaloaminopeptidasas. La estructura de la bestatina se ha sometido a varias modificaciones con el propósito de mejorar sus propiedades inhibitorias y farmacológicas. Dentro de sus derivados se destacan la tioamidabestatina y el *p*-hidroxibestatin; sin embargo, estos no han sido efectivos frente a la APA (Mucha *et al.* 2010).

El uso exitoso de la bestatina como inhibidor clásico de metaloaminopeptidasas ha constituido un estímulo que ha desencadenado la búsqueda, el aislamiento y la caracterización de varios compuestos con estructura similar: la phebestina ((2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-fenilalanina), la probestina ((2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-prolil-L-prolina) y la amastatina (ácido (2S,3R)- 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valina-L-valina-L-aspártico) (Fig. 6). De estos compuestos, la amastatina (K_i = 74 nM frente a la APA) es un mejor inhibidor de la APA que la bestatina (K_i = 75 μM frente a APA) (Yang *et al.* 2013) (Tabla 3, Fig. 6).

Tabla 3. Inhibidores naturales y sintéticos de APA de amplio uso biotecnológico y biomédico.

Table 3*. Natural and synthetic inhibitors of APA with wide biotechnological and biomedical uses.*

Nombre	Fuente	IC_{50}	Tipo de inhibición	Referencia
Naturales				
Bestatina (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-leucina) (Ubenimex)	*Streptomyces olivoreticuli* (MD 976-67)	75 µM	Clásica Competitiva	Mucha *et al*, (2010)
Amastatina (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valine-L-valine-L-aspártico	*Streptomyces* sp ME 98-M3	8.0 µM	Unión Fuerte Competitiva	Mucha *et al*, (2010)
Probestina (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-prolil-L-prolina	*Streptomyces azureus* (MH663-2F6)	19.9 µM	-	Mucha *et al*, (2010)
Phebestina (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-valil-L-fenilalanina)	*Streptomyces sp* M1716-m3	0.9 µg/mL	-	Mucha *et al*, (2010)
Leuhistina (2R,3S)-3-amino-2-hidroxi-2-1H-(imidazol-4-ilmetil)-5-metilhexanoico	*Bacillus laterosporus BM156-14F1*	10.0 µg/mL	-	Mucha *et al*, (2010)
Inhibidores Sintéticos				
Pseudotripéptido fosfínico del Glu-Leu -Ala	*Síntesis Química*	0.8 nM	Unión Fuerte Competitiva	Mucha *et al,* (2010)
Derivados del aminotiolGlu-tiol	*Síntesis Química*	0.87 nM	Unión Fuerte Competitiva	Mucha *et al,* (2010)
BTB11079 '2-(7H-benzo[c]fluoren-7-ylidenmetil) fluoranteno	*HitFinder Maybridge Database*	3.88 µM	Clásica Competitiva	Pascual *et al,* 2017
JFD00064 2-[(1-cyano-3-fenantril)metil] fenantreno-1-carbonitrilo	*HitFinder Maybridge Database*	1.82 µM	Clásica Competitiva	Pascual *et al,* (2017)
BTB07018 'N1-[[2-(4-clorobenzoil)hidrazino] (tetrahidro-1H-pirrol-1-yl)methilidene] -4-[5-(2-thienil)-3-(trifluoromethil)-1H-pirazol-1-il]benzeno-1-sulfonamida	*HitFinder Maybridge Database*	4.74 µM	Clásica Competitiva	Pascual *et al,* (2017)
EC33 ((3S)-3-amino-4-sulfanil-butano-1-ácido sulfónico)	*Síntesis Química*	0.29 nM	Unión Fuerte Competitiva	(Bodineau *et al,* 2008)

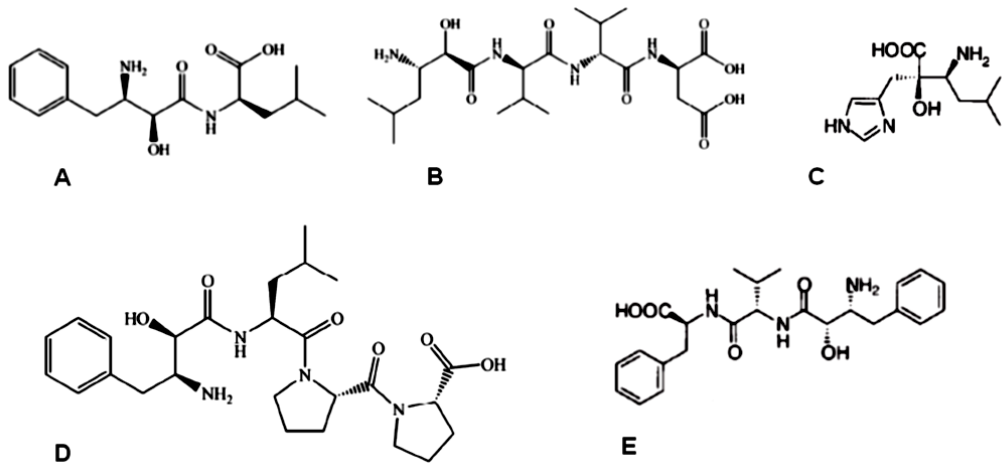

Figura 6. Estructura química de la A) bestatina, B) amastatina, C) leuhistina, D) probestina, E) phebestina
***Figure 6**. Chemical structure of A) bestatin, B) amastatin, C) leuhistin, D) probestin, E) phebestin*

A pesar de que ambos compuestos tienen una interacción estérica desfavorable de la cadena lateral hidrofóbica en posición P1 con el bolsillo polar S1 de la APA, la fenilalanina en P1 de la bestatina se ve más desfavorecida estéricamente. Esto trae como consecuencia que la **Arg-887**, que se encuentra en el bolsillo S1, de la enzima humana adopte una conformación diferente.

Además, la amastatina posee cuatro residuos de aminoácidos y la bestatina solo dos. La cadena lateral del extremo carboxilo de la amastatina en su sitio P3' interactúa favorablemente con el bolsillo S3' de la APA, produciendo un fuerte puente salino bifurcado con la **Arg-386** y un enlace de hidrógeno con el **Asn-371** (Fig. 7), el cual no forma parte de la interacción de la bestatina debido a que es más pequeña (Yang *et al.* 2013).

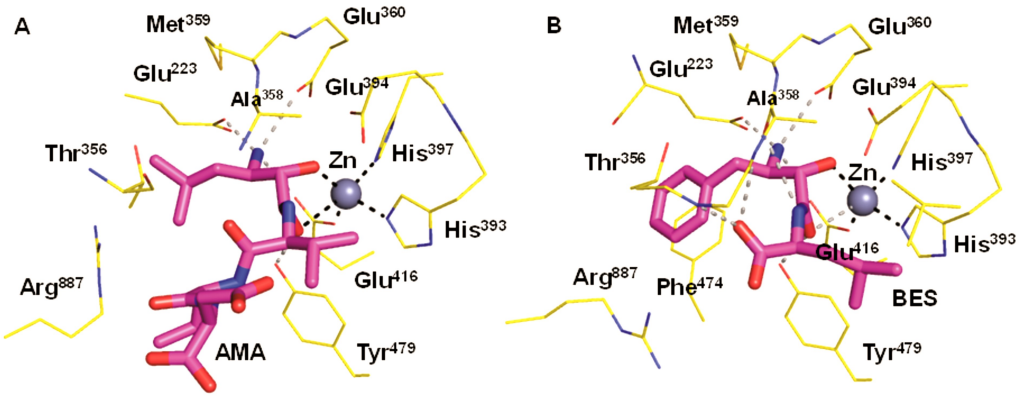

Figura 7. Interacciones de la APA humana con inhibidores. A Interacciones entre la APA humana y el inhibidor amastatina (AMA). **B** Interacciones entre la APA humana y el inhibidor bestatina (BES). En todos los casos el átomo de zinc está representado como una esfera de color gris y los inhibidores se han representado como varillas (carbono-violeta, nitrógeno-azul y oxígeno-rojo). Los aminoácidos del sitio S1 aparecen como líneas (carbono-amarillo, nitrógeno-azul y oxígeno-rojo). Los enlaces de hidrógeno se han representado como líneas discontinuas de color gris, mientras que los enlaces de coordinación aparecen como líneas discontinuas de color negro.

Figure 7. Interactions of human APA with inhibitors. A Interactions between human APA and amastatin (AMA). B Interactions between human APA and bestatin (BES). In all cases the zinc atom is represented as a grey sphere and the inhibitors are presented in lines (carbon-violet, nitrogen-blue and oxygen-red). Aminoacids from the S1 subsite appear as lines (carbon-yellow, nitrogen-blue and oxygen-red). Hydrogen bonds are represented as grey dotted lines while coordination bonds appear as black dotted lines.

Inhibidores sintéticos análogos fosforados de aminoácidos y péptidos

Los compuestos organofosforados (denominados α-aminoalcanofosfonatos) y los pseudopéptidos que contienen fósforo han contribuido de manera más significativa a los estudios de inhibición de la metaloaminopeptidasas (Mucha *et al.*2010). En el caso de los compuestos modificados con fósforo, su forma tetraédrica debe de mimetizar el estado de transición de alta energía de hidrólisis del enlace peptídico a escindir. Adicionalmente, la cadena lateral del sitio P1 de los análogos de ácidos aminofosfóricos brinda mejores posibilidades de optimización estructural de los sustituyentes en interacción con los sitios de unión S1 y S1' de la enzima. Los pseudodipéptidos-fosfínicos pueden ser alargados por medio de síntesis de péptidos en solución o en fase sólida para producir análogos tripéptidos que poseen un sustituyente P2' adicional. Se informó que tales compuestos optimizados eran los inhibidores organofosforados más potentes de la APA (Mucha *et al.* 2010). Un pseudodipéptidofosfínico, análogo de Glu-Leu-Ala, resultó tener una elevada afinidad por la glutamilaminopeptidasa recombinante de ratón, con un valor de K_i= 0.8 nM. Tras el estudio de una serie de compuestos, se encontró que el residuo pseudoglutamil hacia el extremo amino desempeña un importante papel en la potencia y la selectividad de este inhibidor por la APA respecto a la APN (Mucha *et al.* 2010).

Inhibidores sintéticos 2-Aminotioles

Los 2-aminotioles son análogos sintéticos de aminoácidos, en los que la función carboxilato se ha reemplazo por un residuo de tiometilo. Las transformaciones químicas que generalmente se aplican para su síntesis implican una reducción del grupo éster de un aminoéster N-protegido a la función hidroximetilo, seguido de la activación de este último y su posterior sustitución por un nucleófilo que contiene azufre (Mucha *et al.* 2010). La dilucidación de la función intrínseca en el cerebro y, por lo tanto, el potencial médico de las aminopeptidasas involucradas en el sistema renina-angiotensina, incluida la APA, estimuló la continuación de los estudios sobre los 2-aminotioles. Glu-tiol se describió como el primer inhibidor eficiente de la APA; sin embargo, fue equipotente para la APN. Por tanto, estudios de varios derivados de este compuesto se hicieron necesarios para poder encontrar un inhibidor específico de la APA. Como resultado, se identificó un compuesto excepcionalmente potente caracterizado por una sorprendente relación de selectividad de 20 000 veces respecto a la APN. A pesar de mostrar una actividad notable (primer inhibidor ti subnanomolar de la APA), el compuesto se caracteriza por su escasa biodisponibilidad. Una optimización limitada del fragmento P1' resultó en una molécula mucho más simple: ácido (3S,4S)-3-amino-4-mercapto-6-fenilhexano-1-sulfónico (Mucha *et al.* 2010). La sustitución del átomo de C3 con un fragmento de arilalquilo hidrofóbico resultó permitió una potente inhibición de la APA (Ki 30 nM).

Inhibidores Sintéticos de HitFinder Maybridge Thermofisher

Recientemente, Pascual *et al*. (2017) informaron de tres nuevos inhibidores duales de la APN y la APA porcinas, identificados mediante herramientas bioinformáticas que involucraron cribado virtual en la base de datos *HitFinder*, de la firma *Thermofisher*. Estas moléculas se comportan como inhibidores clásicos frente a ambas enzimas, con valores de IC_{50} en el orden micromolar (Tabla 3). Sin embargo, interactúan mediante mecanismos de inhibición diferentes. Frente a la APN se comportan como inhibidores no competitivos α>1, mientras que frente a la APA se comportan como inhibidores competitivos. El estudio de los modos de unión de estos compuestos indicó que pequeñas diferencias en los centros activos de ambas enzimas son los responsables del acomodo diferencial de estas moléculas, que llevan a mecanismos inhibitorios de diferente naturaleza, aun cuando el reconocimiento se encuentra en el mismo orden de afinidad (Pascual *et al.* 2017).

Inhibidores sintéticos RB150 y EC33

RB150 es un profármaco que rinde un potente inhibidor de la APA denominado EC33 ((3S)-3-amino-4-sulfanil-butano-1-sulfónico) (Bodineau *et al.* 2008) (Tabla 3). Este profármaco se encuentra disponible para suministro por vía oral, puede atravesar la barrera hematoencefálica y, una vez dentro del cerebro, es subsecuentemente biotransformado en EC33 por acción de las reductasas cerebrales, rindiendo dos moléculas activas de EC33. Este inhibidor ha mostrado ser un efectivo agente antihipertensivo según los resultados obtenidos en los modelos animales donde se ha aplicado dicha droga. De manera interesante, EC33 y el glutamato comparten ciertas características estructurales. Ambos tienen un grupo amino libre y una cadena lateral aproximadamente de la misma longitud,

cargada negativamente. El grupo amino de EC33, se une a APA en el sitio activo de la misma manera que el péptido sustrato o análogos a él, por lo que actúa como un inhibidor competitivo. EC33, a pesar de tener un grupo de ácido sulfónico en su cadena lateral, se une a la APA de la misma forma que el glutamato, y después forma un puente salino con la **Arg-887** y el calcio en el bolsillo S1 de la enzima. Además, EC33 también contiene un grupo tiol hacia el lado opuesto al grupo amino de la molécula, que se cree interactúa con el ion zinc del sitio activo (Yang *et al.*2013).

CONCLUSIONES

La aminopeptidasa A 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 la enzima humana y su regulación por el ion calcio 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 A en procesos fisiológicos como el control de la presión arterial, 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 Sistema Nervioso Central, y diferentes etapas de los procesos cancerígenos.

LITERATURA CITADA

Abbenante G. y D. Fairlie (2005) Protease Inhibitors in the Clinic Med Chem. 1: 71-104.

Albiston A., S. Ye y S. Chai (2004) Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. Protein Pept Lett. 5: 491-500.

Amin A., N. Adhikari y T. Jha (2018) Design of Aminopeptidase N (APN) inhibitors as Anticancer Agents. J. Med. Chem. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00782.

Barret A. J., N.M. Rawlings y J. F. Woessner (2003) Introduction: metalopeptidases and their clanes. In: Handbook of proteolytic enzymes. Barret, Rawlings y Woessner (Eds.). Academic Press, London. 334-542. (segunda edición).

Blanco L., B. Sanz, I. Perez, C. Sánchez, M. Cándenas, F. Pinto y J. Gil. (2014) Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms. BMC Cancer. 1: 14-386.

Bauvois B. y D. Dauzonne (2005) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, Biological Evaluations, and Therapeutic Prospects. Med Res Rev. 26(1):88-130.

Bogyo M. (2017) Introduction to the Special Issue on Proteases and Proteolysis in Health and Disease. FEBS J. 284(10): 1392-1393.

Carl-McGrath S., U. Lendeckel, M. Ebert y C. Röcken (2006) Ectopeptidases in tumour biology: a review. Histol and Histopathol. 21(12): 1339-1353.

Chen L., Y. L. Ling, G. Peng y F. Li (2012) Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase. N. PNAS. 44: 17966-17971.

Chuang H.Y., J.K. Jiang, M.H. Yang, H.W. Wang, M.C. Li *et al.* (2017) Aminopeptidase A initiates tumorigenesis and enhances tumor cell stemness via TWIST1 upregulation in colorectal cancer. Oncotarget. 8(13):21266-21280.

Cooper M., D. Mulvaney, A. Coutinho y P. Cazenave. (1986) A novel cell surface molecule on early B-lineage cells. Nature. 321: 616-618.

Dalal S., D. Ragheb, F. Schubot y M. Klemba. (2013) A naturally variable residue in the S1 subsite of M1 family aminopeptidases modulates catalytic properties and promotes functional specialization. J. Biol. Chem. 288: 26004-26012.

Deu E., M. Verdoes y M. Bogyo (2012) New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. Nat Struct Mol Biol. 19: 9-16.

Deu E. 2017. Proteases as antimalarial targets: strategies for genetic, chemical, and therapeutic validation. FEBS J. 284(16): 2604-2628.

Drag M. y G. Salvesen (2010) Emerging principles in protease-based drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 9: 690-701.

Drinkwater N., J. Lee, W. Yang, T. R. Malcolm *et al.* (2017) M1 aminopeptidases as drug targets: broad applications or therapeutic niche? FEBS J. 284(10):1473-1488.

Fukasawa K., F. Harada, M. Hirose, J. Izumi *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.

Glenner G., P. J. McMillan y J. E. Folk (1962) A Mammalian Peptidase specific for the Hydrolysis of N-Terminal α-L- Glutamyl and Aspartyl Residues. Nature. 194: 867.

Göhring B., H. Holzhausen, A. Meye, H. Heynemann, U. Rebmann y J. Langner (1998) Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell. Int J Mol Med. 2:409-414.

Gossrau R., R. Graf, M. Ruhnke y C. Hanski (1987) Proteases in the human full-term placenta. Histochem. 86(4):405-413.

Haeggstrom J., P. Nordlund y M. Thunnissen (2002) Functional Properties and Molecular Architecture of Leukotriene A4 Hydrolase, a Pivotal Catalyst of Chemotactic Leukotriene Formation. The Sci World. 2:1734-1749.

Harbut M., G. Velmourougane, S. Dalal, G. Reiss *et al.* (2011) Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases. PNAS. 34:526-534.

Hariyama Y., A. Itakura, M. Okamura, M. Ito *et al.* (2000) Placental aminopeptidase A as a possible barrier of angiotensin II between mother and fetus. Placenta. 21:621-627.

Healy D. P. y S. Wilk (1993) Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. Distribution and correlation with angiotensin II. Brain Res. 606:295-303.

Ino K., T. Nagasaka, T. Okamoto, C. Uehara *et al.* (2000) Expression of aminopeptidase A in human gestational choriocarcinoma cell lines and tissues. Placenta. 21:63-72.

Ino K., C. Uehara, F. Kikkawa y H. Kiyosumi (2003) Enhancement of Aminopeptidase A Expression during Angiotensin II-Induced Choriocarcinoma Cell Proliferation through AT1 Receptor Involving Protein Kinase C- and Mitogen-Activated Protein Kinase -Dependent Signaling Pathway. The J Clin Endocrinol & Met. 88:3973-3982.

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. JBC. 44:281.

Jones H. C. y R. F. Keep (1988) Brain fluid calcium concentration and response to acute hypercalcaemia during development in the rat. J. Physiol. 402:579-593.

Klinke T., R. Pönisch, W. Schellenberger, E. Müller (2008) Identification and characterization of CaApe2 -a neutral arginine/ alanine/leucine-specific metallo-aminopeptidase from *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 8:858-869.

Kochan G. (2011) Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. PNAS.108 (19):7745-7750.

Kyrieleis O., P. Goettiga, R. Kiefersauera, R. Hubera (2005) Crystal Structures of the Tricorn Interacting Factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a Zinc Aminopeptidase in Three Different Conformations. Jour Mol Bio. 4:787-780.

Lalu K., S. Lampelo, M. Nummelin-Kortelainen y T. Vanhn-Perttula. 1984. Purification and partial characterization of aminopeptidase A from the serum on pregnant and nonpregnant women. Biochirn Bioph. 789(3):324-333.

Li L., Q. Wu, J. Wang, R. Bucy y M. Cooper M. 1993. Wide-spread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionary conserved ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody. Tissue Antigens. 42:488-496.

Lijun S. y D. P. Healy. 1999. Kidney Aminopeptidase A and Hypertension, Part II. Effects of Angiotensin II. Hypertension. 33:746-752.

McGowan S., C. Porter, J. Lowther, C. Stack, S. Golding, T. Skinner -Adams *et al*. 2009. Structural basis for the inhibition of the essential Plasmodium falciparum M1 neutral aminopeptidase. PNAS. 106(8):2537-2542.

Mizutani S., K. Goto, A. Itakura, M. Furuhashi, O. Kurauchi, F. Kikkawa y Y. Tomoda. 1994. Physiological role of placental proteases: Interaction between pregnancy-induced bioactive peptides and proteases. Endocr J. 41:93-104.

Mizutani S., K. Okano, E. Hasegawa, H. Sakura *et al.* (1981). Aminopeptidase A in human placenta. Biochim Biophys Acta. 662 (1):168-178.

Mota N., X. Iturrioz, C. Claperon, L. Bodineau *et al.* (2008) Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei. J Neurochem.106 (1):416-428.

Mucha, A., M. Drag, J. Dalton y P. Kafarski (2010) Metalloaminopeptidase inhibitors. Bioch. 92:1509-1529.

Nagatsu, I. G. (1965) Serum aminopeptidases, 'angiotensinase', and hypertension. I. Degradation of antiotensin II by human serum. Biochem. Pharmacol.Biochem. Pharmacol. 14:721-728.

Nielsen A., K. Schauser y K. Poulsen (2000) The uteroplacental renin-angiotensin system. Placenta. 21:468-477.

Pascual I., G. Sánchez, L. Díaz, L. Arzola *et al* (2015). La Aminopeptidasa N de mamíferos: características bioquímicas, funciones fisiológicas y su implicación en procesos fisiopatológicos en humanos. Rev. Cub. Cienc. Biol. 43:363-371.

Pascual I., P. Valiente, G. García, M. Valdés-Tresanco *et al.* (2017). Discovery of novel non-competitive inhibitors of mammalian neutral M1 aminopeptidase (APN). Biochimie.142:216-225.

Poisner A. (1998). The human placental renin-angiotensin system.Front Neuroendocrinol. 19:232-252.

Puertas M., J. Martínez-Martos, M. Cobo y P. Lorite (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 genot type. Exp Gerontol. 6:557-564.

Rawlings, N.D. y A.J. Barrett (1993) Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. 290: 205-218.

Rawlings N.D., A.J. Barrett, P.D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R.D. Finn (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. Nucleic Acids Res. 46: D624–D632.

Réaux A., N. de Mota, S. Zini, S. Cadel (1999) PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. Neuroendocrinol. 69:370-376.

Revelant G., M. Al-Lakkis-Wehbe, M. Schmitt, S. Alavi *et al.* (2015) Exploring S1 plasticity and probing S1' subsite of mammalian aminopeptidase N/CD13 with highly potent and selective aminobenzosuberone inhibitors. Bioorg Med Chem. 23:3192-3207.

Roy K. (2017) Targeting the active sites of malarial proteases for antimalarial drug discovery: approaches, progress and challenges. Int J Antimicrob Agents. 50(3):287-302.

Sakura H., H. Kobayashi, S. Mizutani, N. Sakura *et al.* (1983) Kinetic properties of placental aminopeptidase A: N-terminal degradation of angiotensin II. Biochem. Int. 6:609-615.

Thunnissen M., P. Nordlund y J. Z. Haeggstrom (2001) Crystal structure of human leukotriene A4 hidrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. Nat Struct Biol. 8(2):131-135.

Tonna S., S. Dandapani, A. Uscinski y G. B. Appel (2008) Functional genetic variation in aminopeptidase A (ENPEP): lack of clear association with focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS). Gene. 410(1):44-52.

Turk B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nat Rev Drug Discov. 5:785-799.

Vazeux G., X. Iturrioz, P. Corvol y C. LLorens-Cortea (1997) A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A. Biochem. J. 327:883-889.

Wong A., D. Zhou y J. 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.

Yamada R., S. Mizutani y O. Kurauchi (1988) Purification and characterization or human placental aminopeptide A. Enzynic. 40 (4):223-230.

Yang Y., L. Chang, L. Yi-Lun y L. Fang (2013) Structural Insights into Central Hypertension Regulation by Human Aminopeptidase A. The journal of biological chemistry. 35:25638-25645.

Yuan C., H. Tang, W. Seibel, R. Papoian *et al.* (2014) Identification and Characterization of Novel Inhibitors of Mammalian Aspartyl Aminopeptidase. Mol. Pharmacol. 86: 231-242.

Zini S., M. C. Fournie´-Zaluski, E. Chauvel, B. P. Roques (1996) Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 11:968-973.

Zini S., Y. Demassey, M. C. Fournié-Zaluski, L. Bischoff *et al.* (1998) Inhibition of vasopressinergic neurons by central injection of a specific aminopeptidase A inhibitor. Neuroreport. 9 (5):825-828.

●●●

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso