

ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y REGULACIÓN HORMONAL DE LA PRESIÓN ARTERIAL: UNA REVISIÓN DEL PAPEL DE LOS ENZIMAS PROTEOLÍTICOS

M J RAMÍREZ EXPÓSITO, J M MARTÍNEZ MARTOS, M J GARCÍA LÓPEZ, M D MAYAS TORRES, M P CARRERA GONZÁLEZ, M ARRAZOLA SANIGER¹

RESUMEN

Numerosos estudios realizados en los últimos años, han puesto de manifiesto que los niveles elevados de grasa en la dieta están directamente relacionados con el desarrollo de diversas patologías, entre las que destacan enfermedades cardiovasculares, diabetes o incluso diversos tipos de cánceres. Estudios epidemiológicos también han demostrado que no sólo es importante la cantidad, sino también el tipo de grasa de la dieta.

Son especialmente conocidos los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea, caracterizada entre otros aspectos, por un consumo elevado de ácidos grasos monoinsaturados como el oleico. En cualquier caso, no se conoce con exactitud las relaciones existentes entre el tipo de grasa de la dieta y el desarrollo de las distintas patologías.

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas implicados en una amplia variedad de procesos biológicos, destacando su papel en el control de la presión arterial

¹Grupo de Investigación BIO296, Fisiología y Patología Experimental y Clínica. Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales. ¹Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.

Correspondencia: Dra. M. Arrazola Saniger. Facultad de Ciencias de la Salud. UJA. Campus de las Lagunillas/n, 23071, Jaén, España. Tel: + 34 953 212515 Fax: + 34 953 01 21 41. Email: marrazol@ujaen.es

a través del sistema renina-angiotensina. En esta revisión se estudia la influencia de una dieta enriquecida en aceite de oliva sobre la actividad aminopeptidásica sérica y de tejidos periféricos, analizando su influencia en la regulación del sistema renina-angiotensina para el control de la presión arterial y el balance de líquidos y electrolitos.

Palabras clave: Aceite de oliva, aminopeptidasas, presión sanguínea, sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

The intake of high fat dietary levels is related to the development of several pathologies such as cardiovascular diseases, diabetes and cancer. However, epidemiological studies have demonstrated that not only the amount but also the type of dietary fat participates in the origin of the diseases. In fact, several important benefits have been attributed to the Mediterranean diet, characterized by the high intake of monounsaturated fatty acids such as oleic acid preferently. In any case, the relationship between the type of dietary fat and the development of diseases are unknown. Aminopeptidases are proteolytic enzymes involved in several biological processes, regulating blood pressure through the renin-angiotensin system. In this review, the influence of an olive oil-enriched diet is presented, analyzing their role in the regulation of blood pressure, local blood flow and fluid and electrolytic balance among other functions.

Key Words: Aminopeptidase, blood pressure, olive oil, renin-angiotensin system

1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios realizados en los últimos años, han demostrado que las dietas elevadas en grasa están asociadas con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares de distinto tipo, diabetes mellitus insulina-independiente y algunos tipos de cáncer (1). Es evidente, que los niveles elevados de lípidos en sangre son los responsables del incremento de los depósitos de tejido adiposo por encima de la cantidad normal generando obesidad y, mediante mecanismos muchas veces desconocidos, del desarrollo de distintos tipos de patologías. Sin embargo, no es sólo la cantidad de grasa consumida en la dieta el factor desencadenante de dichas enfermedades, sino también el tipo de grasa consumida, en función de su contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la población de los países mediterráneos, a pesar de ingerir una gran cantidad de grasa (el 40% aproximadamente del valor calórico total), tienen menor porcentaje de enfermedades cardiovasculares que la población del norte de Europa o de Estados Unidos (2, 3, 4). En los países mediterráneos, la dieta habitual contiene una gran proporción de aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados, mientras que en los países más industrializados, el componente graso está constituido principalmente por grasas saturadas. Se supone, que el consumo de grasas saturadas incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular, mientras que el consumo de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados presenta un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (5).

Aunque no se conoce exactamente el tipo de relación que existe entre el desarrollo de los distintos tipos de patologías y el tipo de ácido graso preferentemente consumido, es evidente que los ácidos grasos deben influir sobre el metabolismo celular en alguna o varias de sus múltiples rutas y sobre los mecanismos de regulación y señalización, tanto intracelular como intercelular.

Las aminopeptidasas son enzimas proteolíticas distribuidos ubicuamente por tejidos y fluidos corporales, capaces de separar por hidrólisis aminoácidos cercanos al terminal amino de pequeños péptidos y polipéptidos, así como de hidrolizar sustratos artificiales del tipo de las arilamidas, nitroanilidas u otros. Debido a su acción catalítica, pueden actuar inactivando péptidos o bien cambiando su actividad biológica, dando lugar a un nuevo péptido con propiedades diferentes a su precursor. Existe un elevado número de mensajeros hormonales autocrinos y paracrinos de naturaleza peptídica y proteica implicados en muchos aspectos de la regulación y señalización inter e intracelular, que son controlados por la actividad de estos enzimas proteolíticos.

En la presente revisión nos centraremos brevemente en la descripción de las características bioquímicas y fisiológicas de algunas aminopeptidasas con funciones reguladoras sobre diversos péptidos bioactivos, para continuar con el análisis de la influencia de una dieta enriquecida en aceite de oliva, sobre diversos aspectos de la regulación de estos enzimas a nivel sérico y tisular, basándonos esencialmente en investigaciones con animales llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

2. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS

Los enzimas proteolíticos son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos, el término es básicamente sinónimo a los de proteasas, proteinasas y peptidasas. Aunque éste último se refiere preferentemente a aquellos enzimas que utilizan

péptidos como sustratos; clásicamente estos enzimas se han dividido en exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actúan en el interior de la proteína, sobre enlaces distantes a los extremos de la cadena (6). Debido a la amplia especificidad de sustrato de muchos de estos enzimas y a la aparición de proteinasas que forman parte de complejos multicatalíticos (proteosomas) (7), debemos referirnos más bien a actividades que a la acción de un enzima concreto, ya que un mismo enzima puede actuar sobre diferentes sustratos.

Las exopeptidasas que requieren un grupo α -amino libre se denominan aminopeptidasas (AP) si liberan aminoácidos individualmente, dipeptidil aminopeptidasas si liberan dipéptidos intactos, y tripeptidil aminopeptidasas si liberan tripéptidos enteros. Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxílico terminal no sustituido de los péptidos, se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos libres, y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos intactos.

Las ω -peptidasas son una nueva clase de exopeptidasas capaces de separar residuos terminales que, o bien carecen de un grupo α -amino o α -carboxilo (por ejemplo, la piroglutamil aminopeptidasa), o bien forman un enlace que afecta a un grupo carboxílico o amino no unido a un carbono α (por ejemplo, la γ -glutamil aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las aminopeptidasas se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un particular aminoácido N-terminal. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces alanina N-terminal se denominará alanina aminopeptidasa. Del mismo modo, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos simples sirven para identificar sus requerimientos o preferencias por un residuo C-terminal (6).

A continuación nos vamos a centrar brevemente, en la descripción de algunas aminopeptidasas con funciones reguladoras sobre diversos péptidos circulantes y que además se les ha implicado en diversas patologías.

3. AMINOPEPTIDASAS

Alanina Aminopeptidasa

La alanina aminopeptidasa (AlaAP) (EC 3.4.11.14.) (aminopeptidasa M) cataliza la liberación de aminoácidos N-terminales, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y diferentes aminoacil- β -naftilamidas (arilamidas), con preferencia por derivados de la

alanina, metionina, fenilalanina y en menor medida, otros aminoácidos. Se encuentra en gran cantidad de tejidos y fluidos del cuerpo. Varios isoenzimas órgano-específicos se localizan en el suero (8). La mayoría de la actividad circulante se cree que procede del hígado, mientras que la actividad encontrada en orina, parece que tiene su origen en el riñón. Sus niveles séricos están elevados en ciertas patologías, como en el adenocarcinoma de colon y páncreas, en el síndrome nefrótico y en el embarazo (6). Su actividad aumenta significativamente en enfermedades hepato-biliares (9). En química clínica la determinación de AlaAP en suero, se usa para detectar o confirmar una obstrucción hepato-biliar (10). Además, la AlaAP puede hidrolizar bradicinina (8), encefalinas (11) y también se ha descrito como actividad angiotensinasa (12). Se confunde fácilmente con la leucina aminopeptidasa (LeuAP), sobre todo cuando se utiliza leucina- β -naftilamida como sustrato, aunque es conocido que son dos enzimas diferentes. Puede también confundirse con la AlaAP unida a membrana, con la que posee muchas propiedades en común. La AlaAP está elevada durante la infancia y disminuye después de la pubertad. Sus valores son mayores en hombres que en mujeres y se ha descrito que aumenta con el consumo de alcohol y drogas, y en fumadores (8).

Arginina Aminopeptidasa

La arginina aminopeptidasa (ArgAP) (EC 3.4.11.6.) (aminopeptidasa B) está ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos. Cataliza específicamente la hidrólisis de residuos N-terminales arginina y lisina de péptidos y derivados de la β -naftilamida (2). Debido a su actividad exopeptidasa se ha implicado en el metabolismo de la Metionina-encefalina (13) y angiotensina III (Amg III) (12). Sin embargo, la ArgAP también posee actividad endopeptidásica, habiéndose implicado en el metabolismo de la neurotensina (14).

Cisteina Aminopeptidasa

La cisteina aminopeptidasa (CysAP) (EC 3.4.11.3.) hidroliza los enlaces peptídicos entre una cisteina N-terminal y el residuo adyacente. En el caso de la oxitocina, su presunto sustrato fisiológico, el residuo adyacente es tirosina. Por la acción de este enzima se destruye la actividad biológica de esta hormona neurohipofisaria. Exhibe una amplia especificidad sobre diferentes aminoacil- β -naftilamidas. Se ha localizado exclusivamente en el plasma de mujeres embarazadas y en la placenta humana y de otros primates. Sin embargo, el suero fetal y el fluido amniótico están libres de esta

actividad enzimática. La placenta es una fuente rica de enzimas, pero la CysAP es una de las pocas relativamente específica de este tejido. También ha demostrado poseer actividad angiotensinasa, habiéndose detectado niveles relativamente elevados en casos de preeclampsia y niveles bajos en el último estadio de preeclampsia grave. Asimismo se ha descrito que aumenta en el suero de mujeres con adenocarcinoma ovárico, aunque está por confirmar (8). Igualmente se ha descrito la actuación de la CysAP sobre la vasopresina neurohipofisaria (15), aunque también se podría sugerir su actuación sobre otro péptido cuyo residuo N-terminal es la cisteína, como es el caso de las endotelinas.

Aspartato Aminopeptidasa

La aspartato aminopeptidasa (AspAP) (EC 3.4.11.21) (angiotensinasa), cataliza la hidrólisis del aminoácido N-terminal de péptidos y arilamidas, siempre que éste sea un aminoácido dicarboxílico. Los restos aspartilos son hidrolizados más rápidamente que los restos glutamilos y no afecta a otros aminoácidos. La AspAP parece ser un enzima fundamentalmente unido a membrana y muy abundante a nivel renal (16). Su rápida actuación sobre los residuos de ácido aspártico N-terminales de los péptidos sugiere una posible función fisiológica en la degradación de la angiotensina II (Ang II) y su conversión en Ang III (17). Pero además, la AspAP tiene la capacidad de actuar sobre residuos de aspártico amino-terminales de péptidos diferentes a la Ang II, como podrían ser el octapéptido colecistocina (26-33) o el tetrapéptido colecistocina (26-29). La AspAP muestra un descenso significativo en casos de preeclampsia (8).

Glutamato-Aminopeptidasa

La glutamato aminopeptidasa (GluAP) (EC 3.4.11.7.) (aminopeptidasa A, angiotensinasa A), cataliza específicamente la hidrólisis de residuos no sustituidos de glutamil- γ aspartil- β -naftilamidas y de péptidos. Es típico que los residuos glutamilos sean más fácilmente hidrolizados que los aspartilos. Tanto el grupo α -amino como el γ -carboxilo deben estar libres, lo que se demuestra por la falta de actividad sobre residuos piroglutamilos, γ -glutamilos o de glutamina. Se encuentra en el suero y diferentes órganos de animales y es probablemente, la aminopeptidasa responsable de la rápida destrucción de Ang II. El incremento de la angiotensinasa observado durante el embarazo puede atribuirse probablemente al aumento de la síntesis de este enzima por la placenta (6). La aminopeptidasa A (GluAP y AspAP), parece estar

fundamentalmente unida a membrana, y muy distribuida en tejidos corporales pero es especialmente abundante a nivel renal (18). La única aminopeptidasa descrita como específica para aminoácidos dicarboxílicos es la GluAP, ya que no hidroliza derivados arilamidas que contengan aminoácidos diferentes al glutámico o al aspártico, siendo esta actividad extensible a las angiotensinasas naturales (17).

Piroglutamato Aminopeptidasa

La piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) (EC 3.4.19.3.), es una ω -peptidasa que cataliza la liberación hidrolítica de grupos piroglutamilos (pGlu-) N-terminales de arilamidas y de pequeños péptidos y polipéptidos. Este enzima se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales y actúa sobre diversos péptidos biológicamente activos, como son fundamentalmente la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Potenciales sustratos naturales pueden ser también la neurotensina, bombesina o el péptido anorexogénico. Además, actúa sobre sustratos artificiales del tipo de las aminoacil- β -naftilamidas (19, 20).

4. INFLUENCIA DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA

Aminopeptidasas Séricas

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

Tenemos que indicar que, en condiciones fisiológicas, el origen de las aminopeptidasas séricas es hasta ahora desconocido y no hay evidencias de que exista una secreción activa desde uno o diversos tejidos. La aminopeptidasa A o de actividad similar, parece estar fundamentalmente unida a la membrana, se encuentra muy distribuida en tejidos corporales y es especialmente abundante a nivel renal (18). No obstante, esta actividad está presente a nivel plasmático aunque su origen es aún incierto. Se ha sugerido que mediante la autólisis del enzima unido a la membrana, éste puede llegar a ser soluble en plasma, como también ocurre con el enzima convertidor de angiotensina, que aparece en plasma tras autólisis del enzima unido al endotelio vascular (21). Por otro lado, la mayor parte de la actividad circulante de AlaAP se cree que procede del hígado (6), probablemente también por autólisis del enzima unido a la membrana. Del mismo modo, podemos incluir el resto de aminopeptidasas plasmáticas cuyo origen todavía es desconocido. En cualquier caso, no parece probable que la regulación fundamental de la actividad de las aminopeptidasas plasmáticas se lleve a cabo a través de una síntesis y una secreción activa, más bien podríamos pensar en una regulación pasiva, dependiendo del entorno bioquímico existente ante determinadas condiciones fisiológicas o patológicas.

La administración a ratones macho de una dieta enriquecida en aceite de oliva (20%) no provocó modificaciones en las actividades AlaAP, CysAP, AspAP y pGluAP séricas. Sin embargo, en las actividades ArgAP y especialmente GluAP sí aparecen cambios significativos (Fig. 1).

Estos dos enzimas están implicados en el metabolismo de los péptidos de la cascada renina-angiotensina. Como ya se ha indicado anteriormente, la actividad GluAP participa activamente en el metabolismo de la Ang II, péptido tradicionalmente considerado como efector de este sistema. Sin embargo, la Ang III (obtenido de la degradación de la Ang II) también tiene actividad presora, y es precisamente degradada por la ArgAP (22). La ArgAP en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva se incrementa ligeramente, lo que hace pensar que el metabolismo de la Ang III está aumentado. Sin embargo, los niveles de Ang III deben ser elevados puesto que la actividad GluAP sérica está disminuida. Dicha disminución de los niveles séricos de la actividad GluAP, también podría poner de manifiesto una disminución de la autólisis de la fracción de la membrana de la que derivan, ya que se han descrito cambios en las propiedades de la membrana celular como consecuencia de suplementos de grasa en la dieta (23, 24). Todos estos datos, finalmente indican la existencia de niveles más elevados de Ang II en animales alimentados con aceite de oliva que en los grupos control; estos resultados no explican el efecto antihipertensor

ampliamente descrito en humanos para el aceite de oliva, por lo que debe tenerse en cuenta la existencia de diferencias interespecíficas (25, 26).

Aminopeptidasas Tisulares.

Aminopeptidasas cerebrales.

El enzima AlaAP es muy activo sobre las encefalinas, por lo que podría ser un posible inactivador fisiológico de estos péptidos. Sin embargo, al ser su localización predominantemente citosólica, se considera con pocas posibilidades de acceder a los neuropéptidos sinápticamente liberados, y a no ser que exista un proceso de recaptación peptídica, su importancia fisiológica está aún poco clara. La existencia de una concentración especialmente alta a nivel de las terminales nerviosas, sugiere la participación de estos enzimas en el metabolismo de péptidos o proteínas involucradas en la función sináptica. Además se ha comprobado que péptidos con un aminoácido N-terminal neutro como las encefalinas, resultan rápidamente hidrolizados (27). En diferentes trabajos también se describe la hidrólisis secuencial de Ang I y Ang II. Un elevado número de investigaciones confirmaron posteriormente, la degradación de las encefalinas por efecto de aminopeptidasas solubles (28, 29, 30, 31, 32), así como la capacidad de los extractos de membrana cerebrales de degradar también las encefalinas por su extremo amino-terminal (32, 33, 34, 35, 36). La AlaAP soluble no sólo tiene capacidad para hidrolizar las encefalinas, sino que es también capaz de degradar otros neuropéptidos, tanto opiáceos como no opiáceos. Hersh en 1985 (11) demostró que los homogeneizados de cerebro de rata poseían actividad aminopeptidásica capaz de hidrolizar, además de las encefalinas, las α , β y γ -endorfinas. Asimismo, en 1984 Berg y Marks (37) indicaron la capacidad de este enzima para degradar distintas dinorfinas (familia de neuropéptidos que comienzan por la secuencia del pentapéptido Leu-encefalina) en cerebro de rata. Otros péptidos que pueden ser degradados por AlaAP soluble son las cininas 10 y 11 para rendir cinina 9 (bradicinina) (38). Aunque generalmente se asume que la inactivación de los neuropéptidos está mediada por las peptidasas unidas a la membrana, existen otras alternativas adicionales que estos autores resaltan en su trabajo y que plantean la posibilidad de que las peptidasas citosólicas tengan un papel en la degradación de estos péptidos. En primer lugar, los neuropéptidos pueden ser internalizados como parte del complejo péptido-receptor, como se ha demostrado para algunas hormonas peptídicas (39); por otra parte, existe la posibilidad de que las peptidasas solubles puedan ser liberadas en el espacio extracelular. La primera referencia sobre la existencia de una aminopeptidasa específica

para aminoácidos básicos en el SNC (Arginil Aminopeptidasa soluble; EC 3.4.11.6) la proporcionó Ellys y Perry en 1966 en hipófisis bovinas (40). Se ha estudiado también la actividad de este enzima, en relación a su posible participación en el metabolismo del sistema renina-angiotensina cerebral. La ArgAP soluble posee además actividad endopeptidásica capaz de hidrolizar varios péptidos biológicamente activos, entre los que se encuentran la neurotensina, bradixinina, angiotensina I, sustancia P, LHRH y somatostatina.

La actividad de aminopeptidasas unida a la membrana detectada en el cerebro, ha merecido una especial atención por parte de los investigadores ya que por su localización, pueden participar en el proceso de degradación de los neurotransmisores de naturaleza polipeptídica liberados al espacio extracelular.

La administración de una dieta enriquecida en aceite de oliva incrementa muy significativamente la actividad de las fracciones solubles AlaAP y ArgAP en la corteza frontal de ratones (Fig. 2). Es difícil establecer algún significado funcional para estos cambios. Las encefalinasas, sustrato endógeno de estas enzimas, desempeñan un importante papel neuromodulador en el cerebro; estos resultados podrían poner de manifiesto que los ácidos grasos de la dieta pueden modificar los mecanismos de regulación central (25).

El cerebro es especialmente sensible a la hipertensión que provoca una gran variedad de cambios vasculares y celulares (41). Además del clásico sistema renina-angiotensina, Ganong en 1995 (42) describió otros sistemas renina-angiotensina locales por lo que se ha considerado la posibilidad de una síntesis local de Ang II en el cerebro (43, 44). En nuestro laboratorio, se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para conocer los efectos de los ácidos grasos de la dieta sobre mecanismos enzimáticos encargados de degradar los péptidos del sistema renina-angiotensina cerebral. Se ha analizado la influencia de una dieta enriquecida en un 20 % en aceite de oliva sobre la actividad AspAP y GluAP (ambas con actividad angiotensinasa como se ha comentado anteriormente) en la corteza frontal de ratones. No se observaron variaciones en ninguna de estas actividades (45).

Aunque las neuronas contienen Ang II y probablemente renina en el cerebro de la rata (46), prácticamente la totalidad del angiotensinógeno y el enzima convertidor de angiotensina se producen localmente por los astrocitos (44, 46, 47). Esta síntesis también se produce en cultivos celulares (44, 48). En nuestro laboratorio, y de forma paralela a los estudios *in vivo* comentados anteriormente, se realizaron estudios *in vitro* en los que se analizó la influencia de los ácidos grasos oleico (principal ácido

graso del aceite de oliva) y linoleico a diferentes concentraciones. Nuestros resultados mostraron descensos significativos para la actividad GluAP después de la incubación con oleico y linoleico. La actividad AspAP también descendió después de la incubación con oleico. Esto puede indicar la existencia de elevados niveles de Ang II y por tanto un incremento en la presión arterial. Sin embargo la Ang III, producida por la acción de las angiotensinas sobre la Ang II, presenta un mayor efecto presor que la Ang II en el cerebro debido probablemente a su acción sobre los receptores AT_1 (49). Estos receptores AT_1 también se han descrito en los astrocitos (50). Se sugiere, que la inhibición de las angiotensinas podría producir un descenso en el metabolismo de la Ang II, y que niveles bajos de Ang III podrían detectarse en el sistema renina-angiotensina cerebral (26). Probablemente estos cambios no están únicamente relacionados con la regulación de la presión arterial sino también con el control del flujo sanguíneo local o con el equilibrio hídrico y electrolítico (51). En este último caso hay que considerar que los modelos *in vitro* son mucho más simplificados e intervienen menos factores que en un organismo completo. Esto junto a las diferencias entre especies (los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en ratón y los *in vitro* en rata) podrían explicar los diferentes resultados obtenidos.

Aminopeptidasas en pulmón.

Hopsu-Haun y Eklfors en 1969 (52) purificaron parcialmente la fracción soluble de AlaAP pulmonar, ya que la actividad de AlaAP de la membrana a nivel pulmonar posee propiedades similares a las de otros tejidos (53). En la fracción soluble pulmonar de conejo se han podido separar distintas aminopeptidasas como AlaAP y aminopeptidasa B (54). También se le ha prestado una atención especial a las aminopeptidasas localizadas en el endotelio vascular, debido a que estas enzimas se encuentran en estrecho contacto con los péptidos plasmáticos, lo que podría alterar la composición peptídica sanguínea a su paso por el pulmón. Al menos se han descubierto dos aminopeptidasas a este nivel: una es la aminopeptidasa A pulmonar, capaz de hidrolizar a la Ang I por su extremo amino terminal y que puede ser liberada desde el pulmón a la sangre y otra es la aminopeptidasa M. Esta última es una aminopeptidasa de la membrana localizada en el lecho vascular pulmonar, que también puede ser liberada a la circulación sanguínea (55). Tanto si actúan a nivel del lecho vascular pulmonar como si se vierten a la circulación periférica, estas enzimas tienen una importante función fisiológica dada la amplitud del lecho vascular pulmonar y la gran cantidad de péptidos susceptibles de ser hidrolizados por dichas enzimas (encefalinas, angiotensina, bradicininas, cininas, etc.).

La ingestión de una dieta enriquecida en aceite de oliva provoca muy pocas variaciones en la actividad aminopeptidasa del pulmón (Fig. 3). Se ha encontrado únicamente un descenso significativo de la actividad AspAP tanto en su fracción soluble como en la unida a la membrana, sin embargo la GluAP no sufre ninguna variación. Estos dos enzimas tradicionalmente se han considerado como aminopeptidasa A con acción sobre los péptidos del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, cada vez son más las evidencias que ponen de manifiesto que se trata de dos enzimas diferentes aunque comparten algunos sustratos. Los resultados obtenidos en el pulmón vienen a confirmar esta hipótesis, y además podrían indicar que en este caso y en esta localización, la AspAP podría estar implicada en el metabolismo de otros péptidos diferentes a los del sistema renina-angiotensina.

Aminopeptidasas en testículo.

Los testículos son uno de los principales órganos de regulación hormonal, donde las aminopeptidasas desempeñan un importante papel en todos los mecanismos de procesamiento de péptidos, durante la diferenciación de las células germinales.

Los primeros trabajos en los que se analiza la actividad aminopeptidasa describen la existencia de una actividad LeuAP testicular en diferentes vertebrados (56). Un estudio histológico más detallado en el testículo demostró la existencia de diferencias según el grado de madurez del animal. En animales inmaduros, aparece una actividad LeuAP ligera mientras que en animales adultos la actividad LeuAP fue mucho mayor. Estos resultados indicaron una correlación directa entre la actividad del enzima LeuAP y la maduración sexual (57).

Por técnicas inmunohistológicas se demostró la existencia de actividad AlaAP en los conductos eferentes de los testículos (58). La actividad aminopeptidasa B (ArgAP) también se aisló en el testículo de ratas. Por técnicas inmunohistoquímicas se comprobó que esta actividad es especialmente importante en los tubos seminíferos y en los últimos estadios de la espermatogénesis. Este hecho, junto a su localización subcelular, apoya la hipótesis de que esta aminopeptidasa está implicada en múltiples mecanismos de procesamiento de los propéptidos y proproteínas en el curso de la diferenciación espermática (59).

La presencia de receptores de Ang II en las células de Leydig en los testículos de rata y primates, así como otros datos que afirman la presencia de otros componentes del sistema renina-angiotensina en este órgano, sugieren un importante papel de este sistema en la función testicular (60).

Tras la ingesta de una dieta enriquecida en aceite de oliva (Fig. 4) se observaron niveles superiores de actividad AspAP soluble en este tejido, hecho que sugiere un papel local para este enzima en la regulación de las angiotensinas. La Ang III es producida a partir de Ang II por la acción de la GluAP, pero también puede producirse a partir de Ang I a través de un intermediario des-Asp¹-Ang I (43). La Ang III posteriormente se convierte en Ang IV por la aminopeptidasa B (ArgAP) o la aminopeptidasa M (AlaAP). Nuestros resultados muestran un incremento de la actividad AspAP, un descenso en la actividad GluAP (26) y un incremento en la actividad ArgAP y AlaAP (25). Estos resultados, junto con la vía de degradación anteriormente descrita, sugieren que el metabolismo de la Ang II a Ang III es lento, mientras que el metabolismo de Ang I a des-Asp¹-Ang I y de Ang III a Ang IV es rápido. Por tanto, la acción de des-Asp¹-Ang I, Ang II y Ang IV puede predominar en el testículo de animales alimentados con aceite de oliva.

Aminopeptidasas en las glándulas adrenales

En las glándulas adrenales se sugirió un alto grado de actividad aminopeptidásica, especialmente la de aquellos enzimas implicados en el control de la presión arterial. Aunque en un principio se pensó que dichas actividades se localizaban principalmente en la corteza adrenal, posteriormente se comprobó que se encontraban tanto en la corteza como en la médula adrenal (61, 62, 63).

En el sistema renina-angiotensina adrenal, la Ang II juega un importante papel en la regulación de la producción de aldosterona (64). Goodfriend y col. (65) demostraron que el ácido oleico y el araquidónico son inhibidores específicos de los receptores AT₁ de las células glomerulares de las glándulas adrenales. Estos autores sugirieron que la secreción de aldosterona estimulada por la angiotensina es particularmente sensible a la inhibición por los ácidos grasos. En esta localización aunque la actividad GluAP no varía (Fig. 5), la actividad AspAP soluble fue un 50 % menor en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva que en los grupos control (45). Las actividades ArgAP y AlaAP también se incrementaron significativamente en las glándulas adrenales de los animales alimentados con la dieta rica en aceite de oliva (25), lo que sugirió un descenso en la producción de des-Asp¹-Ang I y un rápido metabolismo de Ang III a Ang IV. Aunque se demostró la existencia de receptores específicos de Ang IV en la corteza adrenal, su función aún es desconocida (66). Estos resultados confirman que el sistema renina-angiotensina adrenal se modifica en ratones alimentados con una elevada concentración de aceite de oliva, y esta modificación podría, en parte, afectar a la regulación del metabolismo del agua y la sal (65).

También se ha encontrado un descenso significativo en la actividad pGluAP (67) y aunque se han propuesto numerosos péptidos como posibles sustratos de este enzima (23), el sustrato endógeno más importante parece ser la TRH. Esta hormona desempeña un importante papel en la regulación cardiovascular a nivel central, por medio de la activación de diferentes sistemas neurotransmisores en diversas localizaciones extrahipotalámicas. Existe un eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, con lo cual los cambios en el comportamiento de las glándulas adrenales afectan a la TRH de forma paralela a la liberación de hormona liberadora de corticotropina (68). Además, también hay que tener en cuenta la acción de la pGluAP sobre los residuos pGlu amino terminales de otros sustratos diferentes de la TRH, por lo que su acción en el metabolismo de otros péptidos también puede ser modificada por la ingesta de grasa de la dieta.

Aminopeptidasas en riñón.

El riñón contiene al menos tres aminopeptidasas: la clásica leucina aminopeptidasa, la aminopeptidasa M y la aminopeptidasa A. Estos enzimas forman en el riñón ectoenzimas unidas a la membrana mediante una cadena peptídica de naturaleza hidrofóbica, mientras que la mayor parte de los enzimas se localizan en la luz tubular renal, donde al parecer ejerce su actividad. Dichos enzimas se encuentran polarizados en las células puesto que la mayoría de ellos se detectan sólo a nivel apical del polo proximal tubular renal (69). La aminopeptidasa M, además de localizarse en el borde apical tubular proximal renal, es también detectable, aunque en menor grado, tanto en las mitocondrias como en el citoplasma de las mismas células. A nivel renal, la investigación sobre las aminopeptidasas también se ha orientado, hacia los lugares donde se produce la reabsorción de nutrientes procedentes del filtrado glomerular. Este proceso ocurre fundamentalmente en el túbulo proximal, que posee un borde en cepillo en el polo apical de sus células superficiales, lo que incrementa enormemente el área de contacto con la luz tubular. En esta región suele encontrarse abundante cantidad de enzimas, entre los que se encuentran la aminopeptidasa A y M entre otras (70). La aminopeptidasa M constituye una gran proporción de las proteínas encontradas en este borde en cepillo, (71). La aminopeptidasa A también se concentra en el borde en cepillo tubular renal (72). Un estudio de las aminopeptidasas en la nefrona del riñón de rata, demostró que la mayor concentración de las mismas están en el túbulo proximal, mientras que prácticamente no se encuentran en los segmentos distales de la nefrona (73). Una de las posibilidades funcionales de estos enzimas pudiera ser la inactivación de péptidos fisiológicamente activos tales como Ang II y bradicinina.

La ingestión de una dieta enriquecida en aceite de oliva no produjo variaciones significativas en ninguna de las aminopeptidasas estudiadas a nivel renal (Fig. 6).

Aminopeptidasas de hígado.

Hopsu y colaboradores demostraron la existencia de aminopeptidasa B en hígado (74, 75, 76). La mayor parte del enzima está asociado a las membranas celulares. Este mismo enzima fue purificado más tarde por Starnes (77) demostrándose definitivamente que el mismo enzima se distribuye en ambas fracciones subcelulares. En cualquier caso el enzima es capaz de catalizar la hidrólisis de metionil- lisil-bradiquinina para sintetizar el nanopéptido bradiquinina, resistente al enzima. Actúa, por tanto, como un enzima convertidor de las cinasas. También se ha purificado en hígado el enzima AlaAP y se ha comunicado que los tejidos hepáticos poseen actividad de aminopeptidasa A (78).

El aceite de oliva únicamente incrementó ligeramente la actividad unida a membrana de la CysAP (Fig. 7).

Aminopeptidasas en músculo cardíaco.

Se conoce poco sobre la actividad aminopeptidásica en músculo cardíaco. Diferentes autores han encontrado aminopeptidasa B y N en la fracción soluble, pero no se ha descrito ninguna función específica para ellas en este tejido (79).

Tras la ingesta de la dieta enriquecida en aceite de oliva, en la aurícula de nuestros animales se observó un incremento significativo de la actividad AspAP unida a membrana. El resto de actividades estudiadas no sufrió variación alguna ni en la aurícula ni en el ventrículo (Figs. 8 y 9).

CONCLUSIONES

En vista de los resultados aquí expuestos, parece ser que la manipulación de la cantidad así como del tipo de grasa de la dieta puede inducir modificaciones funcionales en la actividad de las aminopeptidasas sobre sus sustratos endógenos, por lo que las funciones reguladas por estos sustratos podrían verse modificadas. Las aminopeptidasas que muestran mayor variación son aquellas relacionadas con los mecanismos de control de la presión arterial, y más concretamente con el sistema renina-

angiotensina. En vista de nuestros resultados y considerando siempre la existencia de diferencias en la respuesta de animales en los que se han llevado a cabo nuestro estudio y en humanos, se puede concluir que el aceite de oliva puede modificar la presión arterial por su acción sobre las aminopeptidasas implicadas en la regulación del sistema renina-angiotensina. Sin embargo, no son descartables otras influencias del aceite de oliva sobre diversos mecanismos de regulación neuroendocrina, actuando a través de los mecanismos degradativos de las diversas hormonas peptídicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. British Nutrition Foundation Report (1993) Unsaturated Fatty Acids. Chapman and Hall, London.
2. Keys, A. (1970). Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, **41**, 1-211.
3. Grundy, S.M., Bilheimer, D., Blackburn, H., Brown, W.V., Kwiterovich, P.O., Mattson, F., Schonfeld, G. and Weidman, W.H. (1982). Rationale of the diet heart statement of the American Heart Association; Report of Nutrition Committee. *Circulation*, **65**, 839-854.
4. Stamler, J. (1979) Population studies en *Nutrition, lipids and coronary heart disease*, p. 26-88, R. Levy, B.M. Rifkind, B. Dennis and N. Ernst, (Ed.), Raven Press, New York.
5. Trevisan, M., Krogh, V., Freudenheim, J., Blake, A., Muti, P., Panico, S., Farinero, E., Mancini, M., Menotti, A. and Ricci, G. and the Research Group ATS-RF2 of the italian national research council, (1990). Consumption of olive oil, butter and vegetable oils and coronary heart disease risk factors. *J. A. M. A*, **263**, 688-692.
6. McDonald, J.K. y Barret, A.J. (1986). Mammalian proteases: A glossary and bibliography. Academic Press, London.
7. Rivett, A.J., Mason, G.F., Djaballah, H., Savory, P.J., Palmer, A. y Knecht, E. (1993) Structure, activities and subcellular localization of the rat liver multicatalytic proteinase complex (proteosome) en *Proteolysis and protein turnover*, p. 51-56, J.S. Bond y A.J. Barret, (Ed.), Portland Press, London.
8. Sanderink, G.J., Artur, Y. y Siest, G. (1988). Human aminopeptidases: A review of the literature. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **26**, 795-807.
9. Hafkenschid, J.C.M. (1984). Aminopeptidases and aminoacid arylamidases en: *Methods of enzymatic analysis*, 3^o ed. H.U. Bergmeyer, (Ed.), Verlag Chemie Publ., Weinheim.
10. Tokioka-Terao, M., Hiwada, K. y Kokubu, Y. (1985). A radioimmunoassay for the measurement of aminopeptidase (microsomal) in human serum. *Enzyme*, **33**, 181-187.
11. Hersh, L.B. (1985) Characterization of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: Identification of the enkephalin-degrading aminopeptidase. *J. Neurochem*, **44**, 1427-1435.
12. Ahmad, S. y Ward, P.E. (1990) Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 643-650.
13. Johnson, G.D. y Hersh, L.B. (1990). Studies on the subsite specificity of the rat brain puromycin-sensitive aminopeptidase. *Arch Biochem. Biophys.*, **276**, 305-309.
14. McDermott, J.R., Mantle, D., Lawfort, B., Gibson, A.M. y Biggins, A. (1988). Purification and characterization of two soluble Cl⁻ activated arginyl aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptides. *J. Neurochem.*, **50**, 176-182.
15. Itoh, C. y Nagamatsu, A. (1995). An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1243**, 203-208.

16. Ramírez, M., Arechaga, G., Sanchez A., Ozaita, A. y Lardelli, P. (1993) Developmental and ageing changes in aminopeptidase activities in selected tissues of the rat. *Experientia*, **49**, 300-303.
17. Cheung H.S. y Cushman, D.W. (1971). A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 190-193.
18. Lodja, Z. y Gossrau, R. (1980). Study on aminopeptidase A. *Histochemistry*, **67**, 267-290.
19. Bauer, K. (1982) Role of proteolytic enzymes in neuropeptide metabolism. *Inserm*, **110**, 475-494.
20. Cummins, P.M. y O'Connor, B. (1996). Bovine brain pyroglutamyl aminopeptidase (type-1): Purification and characterization of a neuropeptide-inactivating peptidase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 883-893.
21. Wright, J.W. y Harding, J.W. (1995). Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂ and AT₄ and their functions. *Regul Pept.*, **59**, 269-295.
22. Chansel, D. y Ardaillou, R. (1998) Active metabolites derived from angiotensin II. *Nephologie*, **19**, 427-432.
23. Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutierrez, V. y Vazquez, C. M. (1992) Influence of dietary cholesterol on polyunsaturated fatty acid composition, fluidity and membrane-bound enzymes in liver microsomes of rat fed olive and fish oil. *Biochemie*, **74**, 551-556.
24. Yaqoob, P., Sherrington, E.J., Jeffery, N.M., Sanderson, P., Harvey, D.J., Newsholme, E.A. y Calder, P.C. (1995) Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **27**, 297-310.
25. Ramírez, M.J., Martínez, J.M.; Prieto, I., Alba, F. y Ramírez, M. (1998) Dietary supplementation with olive oil influences aminopeptidase activity in mice. *Nutr. Res.*, **18**, 99-107.
26. Ramírez-Expósito, M.J., Martínez-Martos, J.M., Mayas, M.D., García, M.J., Prieto, I., Aréchaga, G. y Ramírez, M. (2001 a) Oleate, linoleate and cholesterol differently modify aspartyl- and glutamyl-aminopeptidase activities in primary cultures of rat astrocyte. *Comp. Biochem. Physiol.*, **128**, 113-118.
27. Hambrook, J.M., Morgan, B.A., Rance, M.J. y Smith, C.F. (1976) Mode of desactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature*, **262**, 782-783.
28. Dupont, A., Cusan, L., Garon, M., Alvarado-Urbina, G. y Labrie, F. (1977) Extremely rapid degradation of [3H] methionine by various rat tissues in vivo and in vitro. *Life Sci.*, **21**, 907-914.
29. Austen, B.M., Smyth, D.G. y Snell, C.R. (1977) Gamma endorphin, alpha endorphin and Met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment. *Nature*, **269**, 619-621.
30. Vogel, Z. y Altstein, M. (1979) The effects of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. *FEBS Lett.*, **98**, 44-48.
31. Marks, N., Kastin, A.J., Stern, F. y Coy, D.H. (1978) Metabolism of potent enkephalin analogs (FK 33-824, D-Ala², pentafluorophenylalanine-4-enkephalinamide and a dimer of D-Ala²-enkephalin) and D-amino acid substituted derivatives of human beta-endorphin. *Brain Res. Bull.*, **3**, 687-690.
32. Schnebli, H.P., Phillipps, M.A. y Barclays, R. K. (1979) Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 89-98.
33. Miller, R.J., Chang, K.J., Leighton, J. y Cuatrecasas, P. (1978) Interaction of iodinated enkephalin analogues with opiate receptors. *Life Sci.*, **22**, 379-388.
34. Vogel, Z. y Altstein, M. (1980) Inactivation of enkephalin by brain enzymes. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, **16**, 49-59.
35. Barclay, R.K. y Phillipps, M.A. (1980) Inhibition of enkephalin-degrading aminopeptidase activity by certain peptides. *Biochem Biophys Res. Commun.* **96**, 1732-1738.
36. Wagner, G.W., Tavianini, M.A., Herrmann, K.M. y Dixon, J.E. (1981) Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. *Biochemistry*, **20**, 3884-3890.
37. Berg, M.J. y Marks, N. (1984) Formation of desTyr dynorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **11**, 313-321.

38. Camargo, A.C. y Migliorini, R.H. (1971) Gluconeogenesis in liver slices from partially hepatectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 962-966.
39. Chabry, J., Gaudriault, G., Vincent, J.P. y Mazella, J. (1993) Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17138-17144.
40. Ellys, S. y Perry, M. (1966) Pituitary arylamidases and peptidases. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3679-3686.
41. Amenta, F., Strocchi, P. y Sabbatini, M. (1996) Vascular and neuronal hypertension brain damage: a protective effect of treatment with nicardipine. *J. Hypertens. Suppl.*, **14**, S 29-35.
42. Ganong, W.F. (1995) Coda. Tissue renin-angiotensin system, 1994. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **377**, 435-440.
43. Sim, M.K. y Yuan, H.T. (1995) Effects of des-Asp-angiotensin I on the contractile action of angiotensin II and angiotensin III. *Eur. J. Pharmacol.*, **278**, 175-178.
44. Ganong, W.F. (1994) What regulates the production and secretion of angiotensinogen in the brain?. *Front Neuroendocrinol.*, **15**, 78-81.
45. Ramírez-Expósito, M.J., Martínez-Martos, J.M., Prieto, I., Alba, F. y Ramírez, M. (2001 b) Angiotensinase activity in mice fed an olive oil-supplemented diet. *Peptides*, **22**, 945-952.
46. Ganong, W.F. (1993) Blood, pituitary and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary. *Front Neuroendocrinol.*, **14**, 233-249.
47. Intebi, A.D., Flaxman, M.S., Ganong, W.F., Deschepper, C.F. (1990) Angiotensinogen production by rat astroglial cell in vitro and in vivo. *Neuroscience*, **34**, 545-554.
48. Sernia, C. (1995). Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regl. Pep.*, **57**, 1-18.
49. De Gasparo, M., Bontan, S. y Leven, N.R. (1994) Characteristics of Ang II receptors and their role in cell and organ physiology en *Hypertension: Physiology, Diagnosis and Management*, p. 101-119, J.H. Larag y B.B. Brenner (Eds.), Raven Press, New York.
50. Tallant, E.A., Diz, D.I. y Ferrario, C.M. (1996). Identification of AT₁ receptors on cultured astrocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **396**, 121-129.
51. Mungall, B.A., Shinkel, T.A. y Sernia, C. (1995) Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience*, **67**, 505-524.
52. Hopsu-Haun, V.K. y Ekfors, T.O. (1969) Distribution of a dipeptide naphthylamidase in rat tissues and its localisation by using diazo coupling and labeled antibody techniques. *Histochemie*, **17**, 30-38.
53. Ito, T., Hiwada, K. y Kokuba, T. (1980) Immunological characterization of human membrane-bound arylamidases from small intestine, lung, kidney, liver, placenta and renal cell carcinoma. *Cin. Chim. Acta*, **101**, 139-143.
54. Sebti, S.M. y Lazo, J.S. (1987) Separation of the protective enzyme bleomycin hydrolase from rabbit pulmonary aminopeptidases. *Biochemistry*, **26**, 432-437.
55. Ryan, J.W. Peptidase enzymes of the pulmonary vascular surface. (1989) *Am. J. Physiol.*, **257**, L53-60.
56. Dey, S.K. y Deb, C. (1973) Testicular leucine aminopeptidase in different vertebrates. *Acta Histochem.*, **45**, 71-74.
57. Chanda, S., Patra, P.B., Chanda, R y Deb, C. (1980) A histochemical study of leucine aminopeptidase activity in the testes of immature and mature guinea-pigs. *Experientia*, **36**, 1232-1233.
58. Huang, K., Takahara, S., Kinouchi, T., Takeyama, M., Ishida, T., Ueyama, H., Nishi, K y Ohkubo, I. (1997). Alanyl aminopeptidase from human seminal plasma: purification, characterization and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J. Biochem.*, **122**, 779-787.
59. Cadel, S., Foulon, T., Viron, A., Balogh, A., Midol-Monnet, S., Noel, N. y Cohen, P. (1997) Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2963-2968.

60. Millan, M.A. y Aguilera, G. (1988) Angiotensin II receptors in testes. *Endocrinology*, **122**, 1984-1990.
61. Ackerly, J.A., Felger, T.S. y Peach, M.J. (1976) Des-Asp₁-angiotensin I: a metabolite of angiotensin I in the perfused feline adrenal. *Eur. J. Pharmacol.*, **38**: 113-121.
62. Campbell, W.B. y Pettinger, W.A. (1976). Organ specificity of angiotensin II and Des-aspartyl angiotensin II in the conscious rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **198**, 450-456.
63. Del Vecchio, P.J., Ryan, J.W., Chung, A. y Ryan, U.S. (1980) Capillaries of the adrenal cortex possess aminopeptidase A and angiotensin-converting-enzyme activities. *Biochem. J.*, **186**, 605-608
64. Mulrow, P.J. (1998) Renin-angiotensin system in the adrenal. *Horm. Metab. Res.*, **30**, 346-349.
65. Goodfriend, T.L., Lee, W.M., Ball, D.L. y Elliot, M.E. (1995) Specificity and mechanism of fatty acid inhibition of aldosterone secretion. *Post. Leuko. Essent. Fatty Acids.*, **52**, 145-149.
66. Zhang, J.H., Stobb, J.W., Hauesworth, J.M., Sardinia, M.F. y Harding, J.W. (1998) Characterization and purification of the bovine adrenal angiotensin IV receptor (AT₄) using [125I] benzoyl-phenylalanine-angiotensin IV as a specific photolabel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 416-424.
67. Martínez, J.M., Ramírez, M-J., Prieto, I., Alba, F. y Ramírez, M. (1998) Influence of dietary supplementation with olive oil on pyroglutamyl- β -naphthylamide hydrolysing activity in serum and different tissues of mice. *Folia Biologica*, **44**, 213-216.
68. Kakucska, I., Yanping, Q.I. y Lechan, R.M. (1995) Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotrophin releasing hormone. *Endocrinology*, **136**, 2795-2802.
69. Kettmann, U., Humbel, B., Holzhausen, H., Bahn, H. y Aurich, H (1992) Immunoelectron microscopic localization of microsomal alanine aminopeptidase. *Acta Histochem.*, **93**, 333-340.
70. George, S.G. y Kenny, J. (1973). Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney. *Biochem. J.*, **134**, 43-57.
71. Booth, A.G., Hubbard, L.M.L. y Kenny, A.J. (1979) Proteins of the kidney microvillar membrane. Immunoelectrophoretic analysis of the membrane hydrolases. Identification and resolution of detergent and proteinase-solubilized forms. *Biochem. J.*, **179**, 397-405.
72. Danielsen, E.M., Noren, O., Sjostrom, H., Ingram, J. y Kenny, A.J. (1980) Proteins of the kidney microvillar membrane. Aspartate aminopeptidase: purification by immunoadsorbent chromatography and properties of the detergent and proteinase-solubilized forms. *Biochem J.*, **189**, 591-603.
73. Sudo, J. y Tanabe, T. (1984) Distribution of aminopeptidase in various nephron segments isolated from rat kidney. *Chem. Pharm. Bull Tokyo*, **32**, 3235-3243.
74. Hopsu, V.K., Makinen, K.K. y Glenner, G.G. (1966 A) A peptidase (aminopeptidase B) from cat and guinea pig liver selective for N-terminal arginine and lysine residues I. Purification and substrate specificity. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 1225-1230.
75. Hopsu, V.K., Makinen, K.K. y Glenner, G.G. (1966 B) A peptidase (aminopeptidase B) from cat and guinea pig liver selective for N-terminal arginine and lysine residues II. Modifier characteristics and kinetic studies. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 1231-1239.
76. Hopsu, V.K., Makinen, K.K. y Glenner, G.G. (1966 C) Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: Aminopeptidase B. *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 557-566.
77. Starnes, W.L., Szechinski, J. y Behal, F.J. (1982) Human-liver alanine aminopeptidase. A kinin-converting enzyme sensitive to beta-lactam antibiotics. *Eur. J. Biochem.*, **124**, 363-370.
78. Ogura, M., Hazato, K. y Katayama, T. (1984). Aminopeptidase activity in the liver of rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Int.*, **9**, 621-624.
79. Parsons, M.E. y Pennington, R.J. (1976) Separation of rat muscle aminopeptidases. *Biochem. J.*, **155**, 375-38

Suero

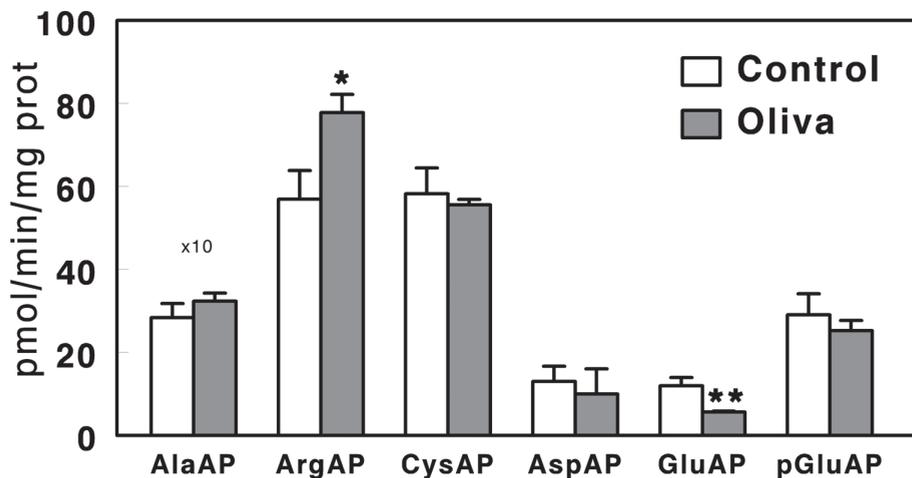


Figura 1

Valores de actividad específica (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP del suero de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Corteza Prefrontal

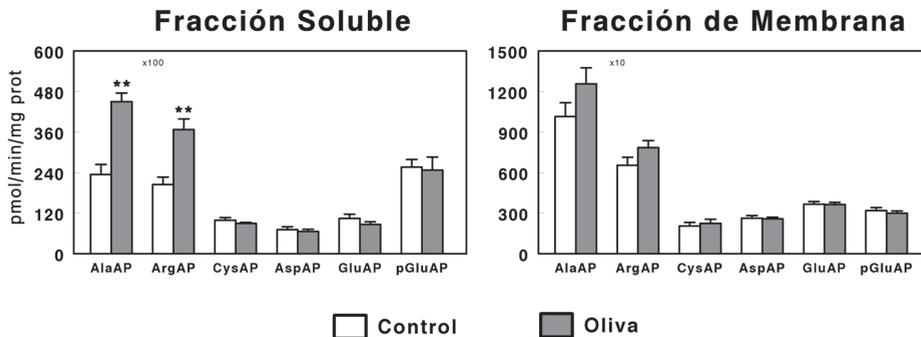


Figura 2

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en corteza prefrontal de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (** $p < 0.01$).

Pulmón

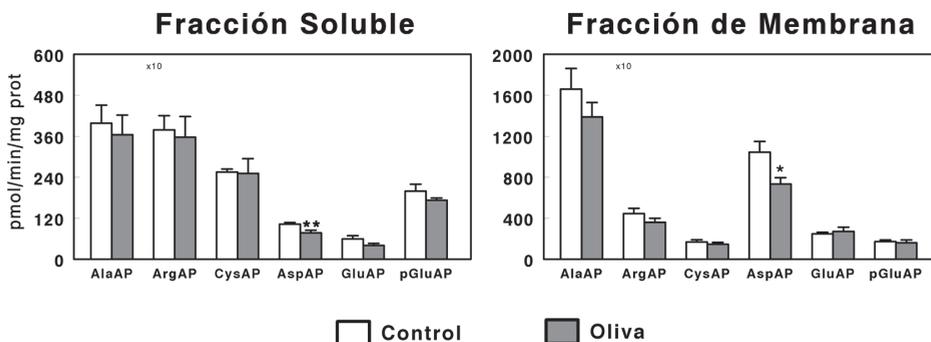


Figura 3

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en pulmón de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Testículo

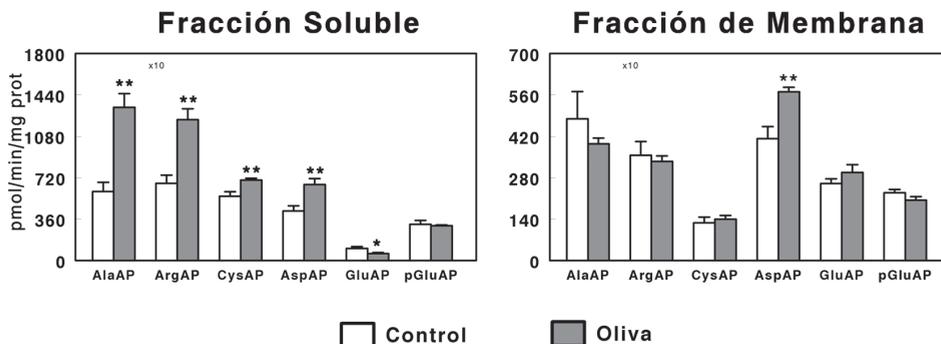


Figura 4

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en testículo de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Glándulas Adrenales

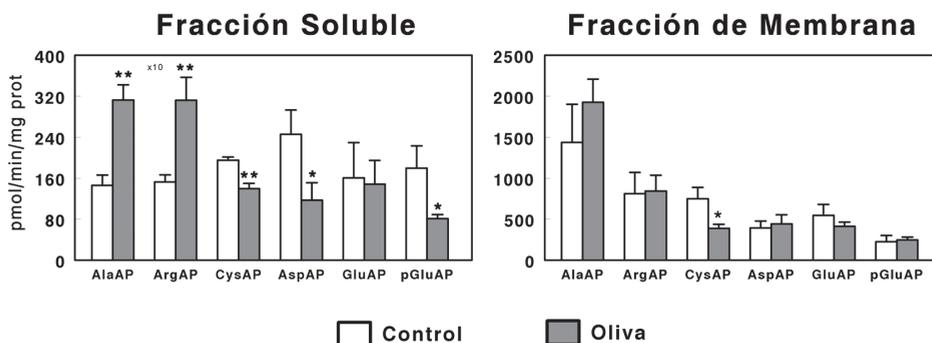


Figura 5

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en glándulas adrenales de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Riñón

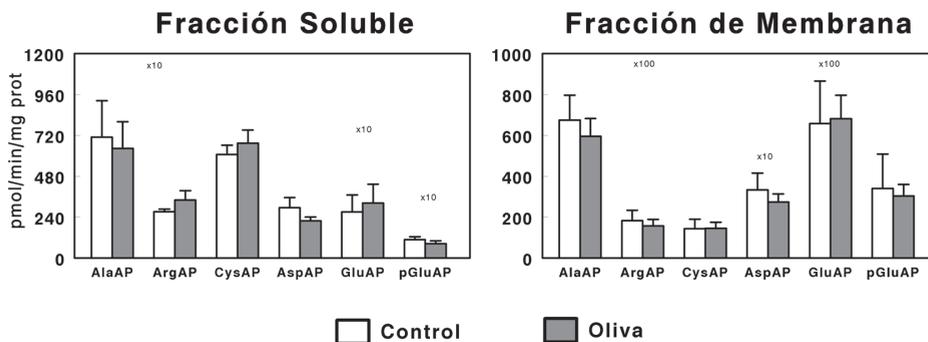


Figura 6

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en riñón de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen.

Hígado

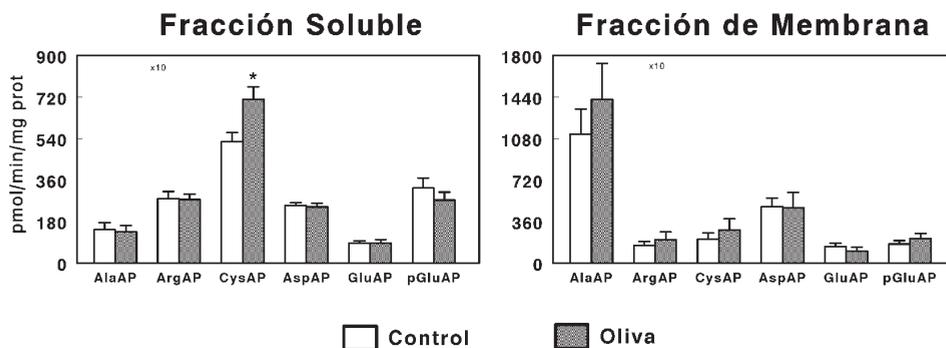


Figura 7

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en hígado de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (* $p < 0.05$)

Aurícula

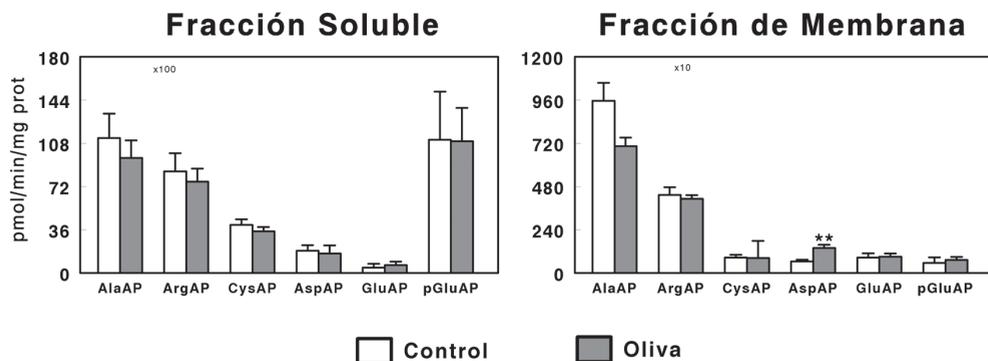


Figura 8

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en aurícula de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen (** $p < 0.01$).

Ventrículo

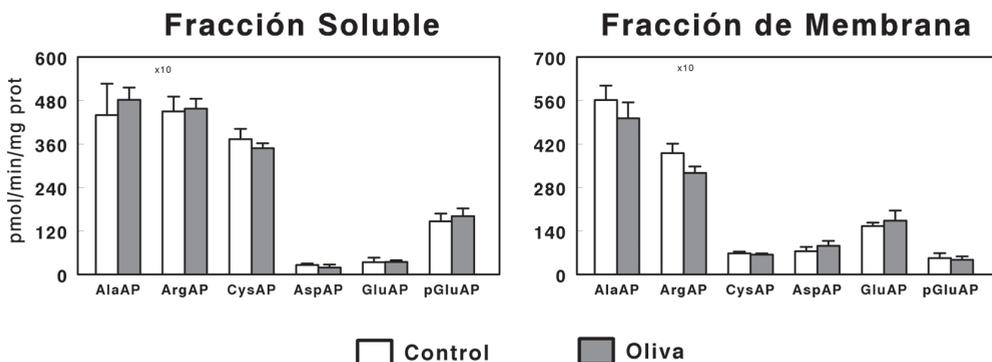


Figura 9

Actividad específica soluble y unida a membrana (Media \pm ESM) de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP y pGluAP en ventrículo de animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen.