Localizador web
Artículo 50.799

Originales

Actividad de las aminopeptidasas séricas en un modelo animal de cáncer de mama inducido por N-metil-nitrosourea

M.P. CARRERA, M.J. RAMÍREZ-EXPÓSITO, M.J. GARCÍA-LÓPEZ, M.D. MAYAS Y J.M. MARTÍNEZ-MARTOS

Departamento de Ciencias de la Salud. Área de Fisiología. Universidad de Jaén. Jaén. España.

Los factores hormonales responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y los cambios cíclicos del ciclo menstrual podrían estar implicados en la promoción, la progresión y la aparición del cáncer de mama en humanos. Se ha sugerido que las enzimas proteolíticas del tipo de las aminopeptidasas, cuyo papel fisiológico consiste en la regulación de diversos péptidos biológicamente activos, podrían participar en el desarrollo del cáncer de mama. La finalidad del presente trabajo es analizar la actividad de un amplio espectro de aminopeptidasas en el suero de ratas con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea (NMU), para evaluar su posible valor como marcadores biológicos de esta enfermedad. La inducción de tumores con NMU mostró una incidencia tumoral del 60%, con un período de latencia medio de 113 días y un número medio de tumores por rata de 1,93. Las actividades específicas de aminopeptidasa N (APN) aminopeptidasa B (APB) aminopeptidasa A (APA) (aspartato aminopeptidasa [AspAP] y glutamato aminopeptidasa [AspAP], oxitocinasa y pirrolidón carboxipeptidasa se analizaron fluorimétricamente utilizando como sustrato las correspondientes aminoacil-β-naftilamidas. Los animales con cáncer de mama inducido por NMU mostraron incrementos significativos en los valores séricos de APB (32%; $p < 0,01$), GluAP (54%; $p < 0,05$) y oxitocinasa (45%; $p < 0,05$), mientras que los valores de pirrolidón carboxipeptidasa estaban disminuidos (28%; $p < 0,05$). Estos cambios pueden reflejar alteraciones en el metabolismo de las angiotensinas, la oxitocina y la hormona liberadora de gonadotropinas, que pueden ser, al menos en parte, responsables del inicio y/o desarrollo de la enfermedad.

Palabras clave: Aminopeptidasa A. Aminopeptidasa B. Aminopeptidasa N. Oxitocinasa. Pirrolidón carboxipeptidasa. N-metil-nitrosourea. Cáncer de mama. Rata. Suero.

ACTIVITY OF SERUM AMINOPEPTIDASES IN AN ANIMAL MODEL OF N-METHYL-NITROSOUREA-INDUCED BREAST CANCER

The hormonal factors responsible for the proliferation of normal breast tissue in puberty and the cyclical changes of the menstrual cycle are also involved in the promotion and progression of breast cancer in humans. It has been suggested that proteolytic enzymes of the aminopeptidase class, whose physiological role consists of the regulation of various biologically active peptides, could contribute to the development of breast cancer. The aim of the present study was to analyze the activity of a broad spectrum of aminopeptidases in the serum of rats with N-methyl-nitrosourea (NMU)-induced breast tumors to evaluate their possible role as biological markers of this disease. Tumor induction with NMU showed an incidence of 60% with a latency period of 113 days and a mean number of tumors per rat of 1.93. The specific activities of aminopeptidase N (APN), aminopeptidase B (APB), aminopeptidase A (AspAP and GluAP), oxytocinase and pyrrolidone carboxypeptidase (Pcp) were analyzed fluorometrically using the corresponding aminoacyl-napthylamides as substrate. Animals with NMU-induced breast tumors showed significant increases in levels of serum APB (32%; $P < 0.01$), GluAP (54%; $P < 0.05$) and oxytocinase (45%; $P < 0.05$), while Pcp levels were reduced (28%; $P < 0.05$). These changes could reflect alterations in the metabolism of angiotensins, oxytocinase, and gonadotrophin-releasing hormone, which could, at least in part, be responsible for the initiation and/or development of the disease.

Key words: Aminopeptidase A. Aminopeptidase B. Aminopeptidase N. Oxytocinase. Pyrrolidone carboxypeptidase. N-methyl nitrosourea. Breast cancer. Rat. Serum.

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía a través del Plan Andaluz de Investigación (Grupo CVI-296).

Correspondencia: Dr. J.M. Martínez-Martos.
Departamento de Ciencias de la Salud. Área de Fisiología.
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud Universidad de Jaén.
Campus Universitario Las Lagunillas. 23071 Jaén. España.
Correo electrónico: jmmartos@ujaen.es

Manuscrito recibido el 14-10-2002; aceptado para su publicación el 13-10-2003.

INTRODUCCIÓN

En los países desarrollados, el cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres y la principal causa de muerte entre éstas[1]. Desde los años ochenta se sabe que los mismos factores que son responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual están implicados en la promoción, la progresión y la aparición del cáncer de mama. De hecho, los estrógenos y la progesterona son mitogénicos en tejido mamario, de modo que mujeres que nunca han tenido un adecuado funcionamiento de los ovarios en términos hormonales muestran una ausencia casi total de cáncer de mama, con una incidencia similar a la observada en varones[2].

Los modelos en roedores han sido particularmente útiles para el estudio del cáncer de mama, ya que en estas especies la glándula mamaria es fuente de neoplasmas hormonodependientes, que son en muchos aspectos similares a los más frecuentes diagnósticos de malignidad detectados en mujeres[3]. Existen numerosos trabajos que documentan que los mismos tipos de lesiones benignas, premalignas y malignas morfológicamente detectables que se desarrollan en la mama humana también aparecen en modelos de roedores durante la carcinogénesis mamaria[4]. Por ello, la inducción de carcinomas mamarios por inyección de N-metil-nitrosourea (NMU) en ratas hembras es uno de los métodos utilizados con más frecuencia para la investigación de la carcinogénesis de mama y de los tratamientos de tumores de mama[5-7]. El estatus endocrino de dichos carcinomas parece ser similar al del cáncer de mama en mujeres[8]. Generalmente la NMU induce carcinomas mamarios que se caracterizan por ser radicales, localmente invasivos y capaces de metastatizarse[9].

En este contexto, las enzimas proteolíticas (peptidasas) son particularmente interesantes en la investigación del cáncer porque pueden participar, al menos en parte, en la metástasis[10]. La mayoría de peptidasas son exopeptidasas, que liberan uno o varios aminoácidos del extremo N o C-terminal, o endopeptidasas, que actúan internamente en el péptido. Las exopeptidasas que actúan en el extremo N-terminal y que liberan un solo residuo aminoacídico se conocen como aminopeptidasas[11] (AP). Éstas generalmente son metalopeptidasas dependientes del cinc, es decir, hidrolasas en las que la rotura del enlace peptídico es mediado por una molécula de agua, que es activada por un catión metálico divalente, normalmente el cinc[12]. Algunas de estas AP son utilizadas en clínica como marcadores de enfermedades y, además, desempeñan un importante papel fisiológico en la regulación de varios péptidos biológicamente activos. Cambios en estos péptidos podrían ser reflejo de las modificaciones de las actividades enzimáticas[13]. La finalidad del presente trabajo es analizar la actividad de un amplio espectro de AP, de sustratos neutros como la alanina APN (APN, CD13; enzyme comission [EC]: 3.4.11.2) y cistina AP (oxitocinasa; EC: 3.4.11.3), básicos como la arginina aminopeptidasa B (APB; EC: 3.4.11.6), ácidos como la aspartato y glutamato aminopeptidasa (aminopeptidasa A [APA]; EC: 3.4.11.7) y de tipo omega como la pirrolidón carboxipeptidasa (piroglutamato aminopeptidasa [Pcp]; EC: 3.4.19.3) en el suero de ratas con tumores de mama inducidos por NMU, para evaluar el posible valor de estas actividades como marcadores biológicos de esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y tratamiento

Cuarenta ratas vírgenes de la variedad Wistar (164,7 ± 4,7 g) se utilizaron para este trabajo. Los animales fueron proporcionados por el estabulario de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Jaén y estuvieron bajo un ambiente controlado, con una temperatura constante de 25 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, respectivamente. Todos los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum.* Los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo con los animales siguieron la normativa de la Comunidad Europea 86/609/EEC.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos. En un grupo de 30 animales se inyectaron intraperitonealmente 3 dosis de 50 mg/kg de peso de NMU disuelto en agua destilada (10 mg/ml) a los 50, 80 y 110 días del nacimiento, como describen Rivera et al[14]. Dieciocho animales desarrollaron tumores, de los cuales se tomaron aleatoriamente 10. En el grupo control (10 animales) sólo se inyectó el disolvente (agua destilada). Las ratas fueron examinadas por palpación 2 días a la semana después de la segunda inyección de NMU y se determinó el diámetro mayor y menor de cada tumor (fig. 1).

El crecimiento del tumor se analizó mediante los parámetros "período de latencia", o el número de días transcurridos entre la primera inyección de NMU y la aparición del primer tumor, "incidencia tumoral", o porcentaje de ratas que desarrollaron al menos un tumor y "número medio de tumores por rata", o número de tumores por rata en animales que desarrollan al menos un tumor (tabla 1).

Obtención y preparación de las muestras

A los 122 días de la primera inyección de NMU, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de equitensin (2 ml/kg de peso). Se obtuvieron muestras de sangre a partir del ventrículo izquierdo y se centrifugaron durante 10 min a 3.000 g para obtener el suero. Estas muestras fueron congeladas y almacenadas a –80 °C para su análisis posterior. A continuación se procedió a perfundir a los animales a través del ventrículo con suero salino para eliminar la sangre. Finalmente, las muestras de tumores de mama así como las de los controles se extrajeron y procesaron para su análisis histológico. Todos los tumores analizados fueron carcinomas ductales infiltrantes.

TABLA 1. Parámetros de crecimiento tumoral

Período de latencia (media ± EE)	113,0 ± 4,2
Incidencia tumoral (porcentaje)	60%
Número medio de tumores por rata (media ± EE)	1,93 ± 0,4

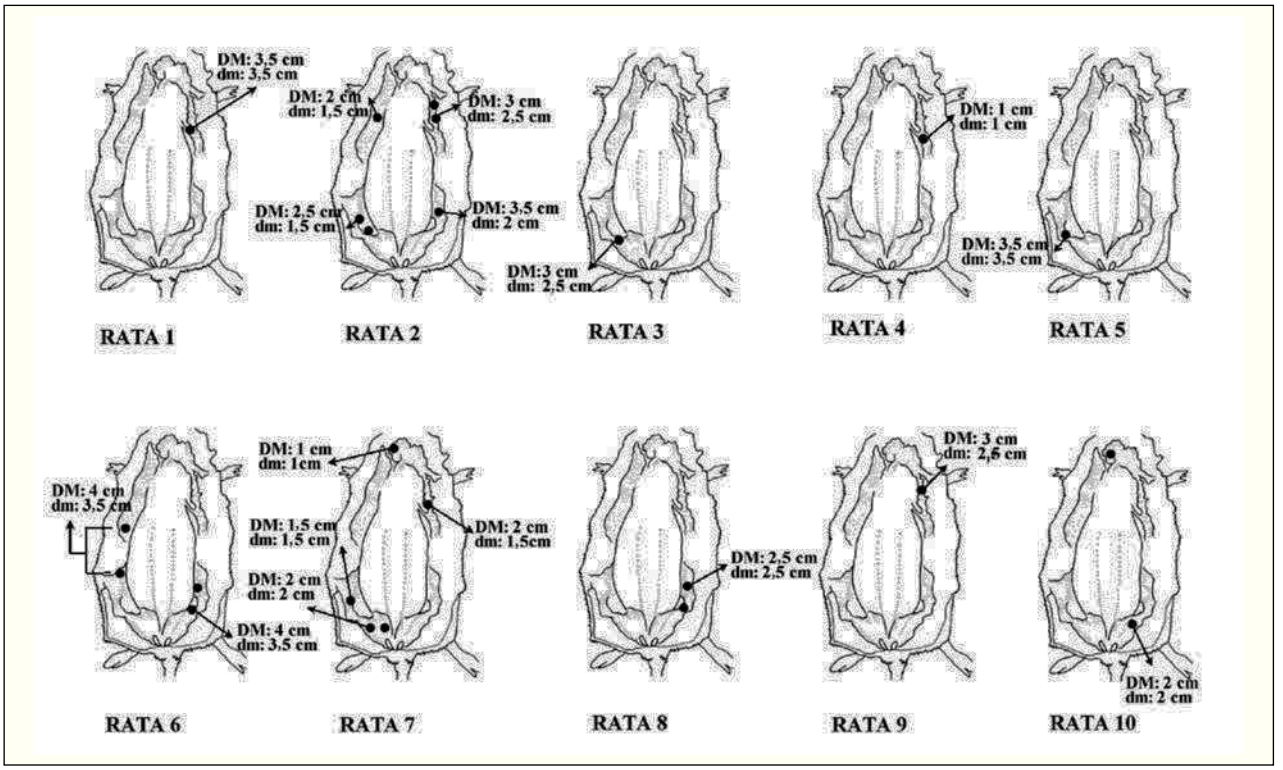

Fig. 1. Localización y características de los tumores de mama por animal. DM: diámetro mayor; dm: diámetro menor.

Análisis de las actividades aminopeptidasas

Las actividades APN y APB se analizaron fluorimétricamente, usando alanil-β-naftilamida (AlaNNap) o arginil-β-naftilamida (ArgNNap) como sustrato, de acuerdo con el método modificado de Greenberg[15]: 10 µl de cada muestra de suero se incubaron a 37 °C durante 30 min con 100 µl de solución de incubación que contenía 100 µM de AlaNNap o 100 µM de ArgNNap y 0,65 mM de ditiotreitol (DTT) en 50 mM de tampón fosfato a pH 7,4.

La actividad CysAP se analizó utilizando cistil-β-naftilamida (CysNNap) como sustrato, de acuerdo con el método de Greenberg[15]: 10 µl de cada muestra de suero se incubaron con 100 µl de la solución de sustrato (100 µM CysNNap, 0,65 µM DTT en tampón fosfato 50 mM a pH 6) durante 30 min a 37 °C.

La actividad AspAP fue determinada fluorimétricamente utilizando aspartil-β-naftilamida (AspNNap) como sustrato, de acuerdo con el método modificado de Cheung y Cushman[16]: 10 µl de cada muestra fueron incubados con 100 µl de la solución de incubación que contiene 100 µM de AspNNap, 1,3 µM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 2 mM de $MnCl_2$ en 50 mM de tampón fosfato a pH 7,4 durante 30 min a 37 °C.

La actividad GluAP se analizó fluorimétricamente utilizando como sustrato glutamil-β-naftilamida (GluNNap) según el método modificado de Tobe et al[17]: 10 µl de muestra se incubaron durante 30 min a 37 °C con 100 µl de la solución de incubación que contenía 100 µM de GluNNap, 0,65 mM de DTT y 50 mM de $CaCl_2$ en tampón fosfato de pH 7,4.

La actividad Pcp sérica se determinó fluorimétricamente utilizando piroglutamil-β-naftilamida (pGluNNap) como sustrato, de acuerdo con el método modificado de Schawe y McDonald[18]: 10 µl de cada muestra se incubaron durante 30 min a 37 °C con 100 µl de la solución de incubación que contenía 100 µM de pGluNNap, 0,65 µM de DTT y 1,3 µM de EDTA en 50 mM de tampón fosfato a pH 7,4.

Todas las actividades se determinaron por duplicado. La cantidad de β-naftilamina obtenida como resultado de la actividad enzimática se midió fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm y de excitación de 345 nm. La actividad enzimática específica se expresó en picomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína, utilizando una curva estándar de β-naftilamina determinada en las mismas condiciones. Las proteínas se cuantificaron también por duplicado por el método de Bradford[19] usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre el grupo control y los animales con tumores de mama por exposición a NMU se utilizó el test de la t de Student. Todas las comparaciones con valores de $p < 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

Las actividades específicas de APN y APB séricas de los animales controles y con tumores de mama inducidos por NMU se muestran en la figura 2. No se

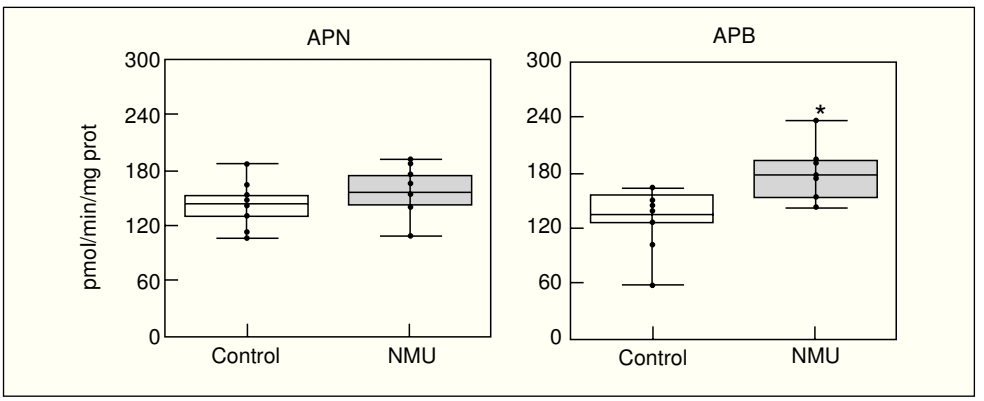

*Fig. 2. Actividad específica de alanina aminopeptidasa N (APN) y arginina aminopeptidasa B (APB) sérica de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan como picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizada por minuto y por mg de proteína (n = 10). *p < 0,01.*

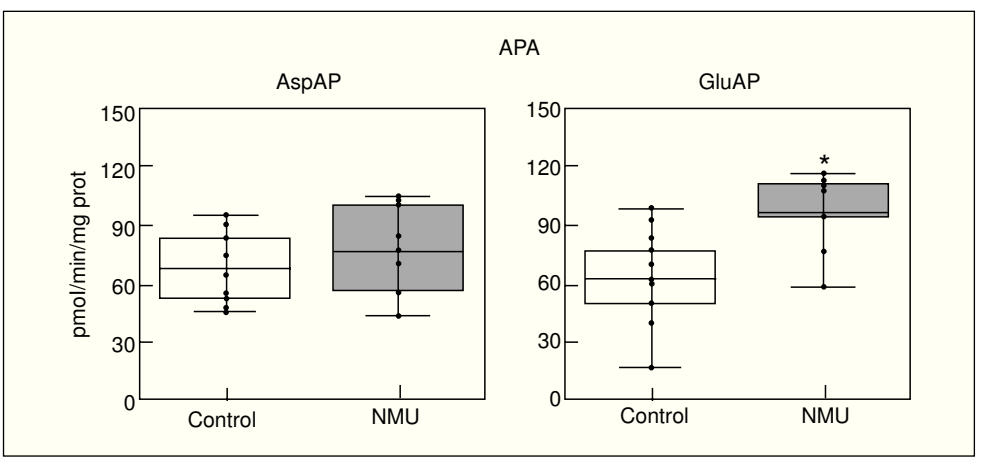

*Fig. 3. Actividad de específica de ospartato aminopeptiadasa (AspAP) (GluAP) y glutamato aminopeptidasa sérica de animales controles y con tumores de mama. Los resultados se expresan como picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizada por minuto y por mg de proteína (n = 10). *p < 0,05. NMU: N-metil-nitrosourea.*

observaron cambios significativos en la actividad APN. Por el contrario, la actividad APB mostró un aumento significativo (p < 0,01) en el grupo de animales con tumor de mama.

Las actividades específicas de aspartado aminopeptiadasa (AspAP) y glutamato aminopeptidasa (GluAP) (APA) séricas de los animales controles y con tumores de mama inducidos por NMU se muestran en la figura 3. No se observaron cambios significativos en la actividad AspAP. Sí se observó un incremento significativo (p < 0,05) en la actividad GluAP en el grupo de animales con tumor de mama.

La actividad específica de oxitocinasa sérica de los animales controles y con tumores de mama inducidos por NMU se muestra en la figura 4. Los animales con tumores de mama mostraron un incremento significativo (p < 0,05) de esta actividad con respecto a los controles.

La actividad específica de Pcp sérica de los animales controles y con tumores de mama inducidos por NMU se expone en la figura 5. Los animales con tumores de mama presentaron un descenso significativo (p < 0,05) de dicha actividad con respecto a los controles.

DISCUSIÓN

Muchos investigadores[20-22] han estudiado los valores de enzimas séricas en enfermedades neoplásicas, y en la actualidad se sabe que se puede obtener una información muy útil sobre la progresión y regresión de enfermedades malignas mediante la determinación de

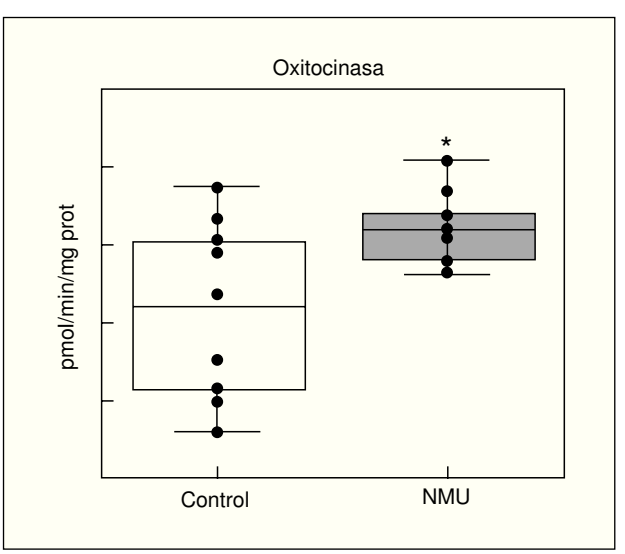

*Fig. 4. Actividad específica oxitocinasa sérica de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan como picomoles de cistil-β-naftilamida hidrolizada por minuto y por mg de proteína (n = 10). *p < 0,05.*

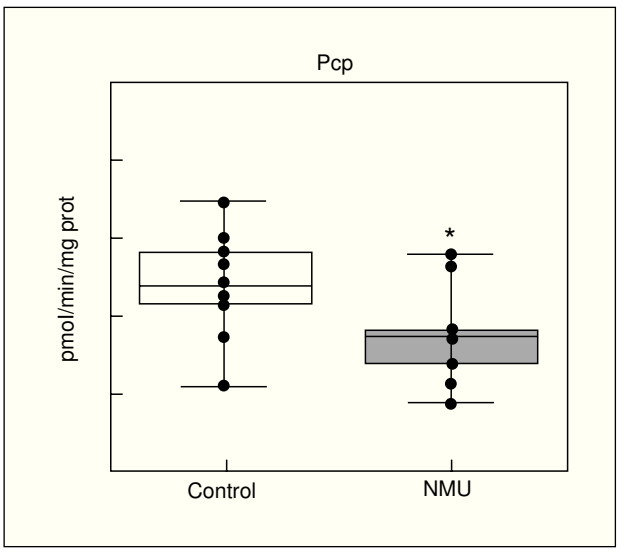

*Fig. 5. Actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa (Pcp) sérica de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan como picomoles de piroglutamil-β-naftilamida hidrolizada por minuto y por mg de proteína (n = 10). *p < 0,05.*

diversas actividades enzimáticas en suero[23]. En el presente trabajo se han analizado las actividades séricas de diferentes AP en ratas con tumor de mama inducido mediante el carcinógeno NMU. La APA engloba las actividades GluAP y AspAP. Ambas son exopeptidasas independientes de cinc, que catalizan la hidrólisis de residuos aspartil y glutamil-N-terminales, aunque cada una es más eficiente hidrolizando su correspondiente derivado aminoacilo. La APA participa en la ruta catabólica del sistema renina-angiotensina[24] y aunque se expresa en múltiples tejidos, su expresión es específica de líneas y estados de diferenciación de células hematopoyéticas[25]. El sustrato fisiológico de la APA es la angiotensina-II, un importante regulador de la presión sanguínea. Por esto, la APA también se conoce como angiotensinasa[26,27]. Concretamente la angiotensina-II se trasforma en angiotensina-III por la acción de la APA, y la angiotensina-III daría lugar a la angiotensina-IV por la actividad tanto de la APN como de la APB. Por otro lado, la angiotensina-III también puede generarse a partir de angiotensina-I, mediante un compuesto intermediario denominado des-Asp[1]-angiotensina-I, por la acción de la enzima de conversión de la angiotensina. La actividad AspAP sería la responsable de la degradación de la angiotensina-I a dicho compuesto[28].

La APN es una proteína dependiente del cinc que libera aminoácidos neutros del extremo N-terminal de diferentes péptidos y proteínas[13]. Esta aminopeptidasa parece ser que participa en la degradación de neuropéptidos[29-33], citocinas y péptidos inmunomoduladores[34,35] y angiotensinas[36-38], por lo que se dice que tiene actividad angiotensinasa, al igual que la APB y APA. Además, la APN puede contribuir a la degradación de la matriz extracelular[39,40] y al procesamiento de antígenos[41]. Los valores de CD13/APN en células primarias y líneas celulares están aumentados en respuesta a la hipoxia, los factores de crecimiento angiogénico y las señales que regulan la formación de capilares durante la angiogenia[42], y se expresan de forma específica en el endotelio vascular angiogénico, pero no en el normal[43]. Algunos autores, como Severini et al[23], han propuesto a la actividad APN sérica como posible marcador del cáncer de mama, ya que en estos pacientes su actividad puede estar aumentada significativamente. Sin embargo, trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio muestran unos resultados contrarios a los propuestos por Severini, debido a que, en este caso, la actividad APN sérica disminuye significativamente en pacientes con cáncer de mama[44]. Estos resultados, junto con los obtenidos en el presente trabajo, en el que la

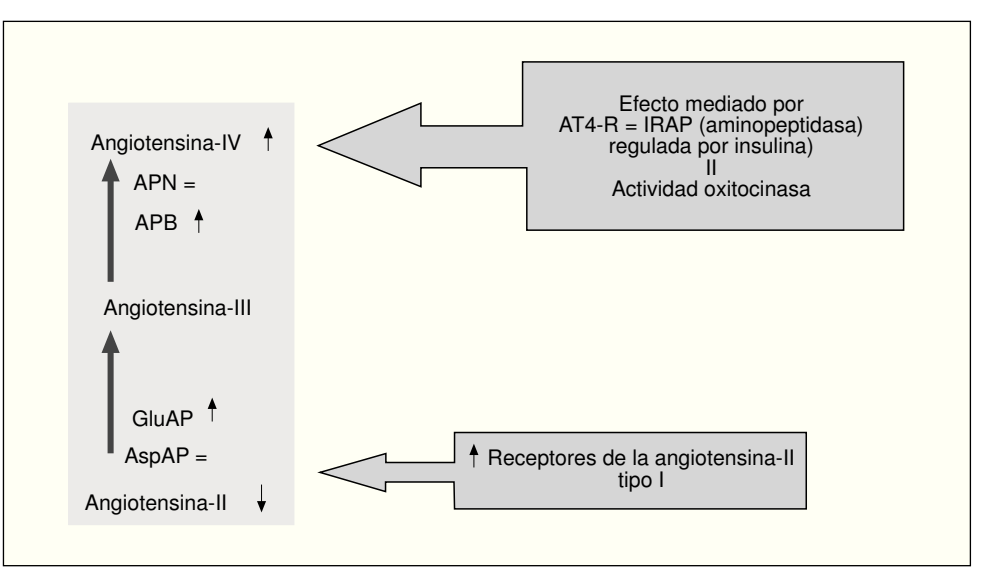

Fig. 6. Posible conexión entre un sistema renina-angiotensina local en la mama y el sistema oxitocina-receptores de oxitocina-oxitocinasa (OT-OTR-oxitocinasa) en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. (Véase discusión.) APN: amonopeptidasa N; APB: amonopeptidasa B; GluAP: glutamato amonopeptidasa; AspAP: aspartato aminotransferasa.

actividad de APN sérica no esta modificada, reflejan el desconocimiento tanto del origen de la forma sérica de dicha enzima, así como de sus sustratos fisiológicos en relación con el cáncer de mama. La APB es una exopeptidasa dependiente del cinc, que considerada en un principio de naturaleza citosoluble, también se ha descrito como una enzima secretada. Libera de forma selectiva residuos básicos arginina/lisina del extremo N-terminal de L-aminoacil-β-naftilamidas[45], como la angiotensina-III, sustrato que comparte con la APN[44].

Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio, en los que las actividades GluAP y APB muestran un incremento significativo, indican que en el cáncer de mama inducido por NMU podría estar favorecido el metabolismo rápido de la angiotensina-II a III por la APA y de la angiotensina-III a IV por la APB. Así, los valores de angiotensina-II podrían estar disminuidos frente a los de angiotensina-IV, que estarían incrementados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en relación con la sobreexpresión de los receptores de angiotensina-II de tipo I en hiperplasias mamarias[46] (áreas donde existe un incremento anormal del número de células pero que conservan su estructura y función normal), en la membrana citoplasmática de las células de lesiones hiperplásicas con y sin atipias, y en carcinomas ductales *in situ* (DCIS) de mama, carcinomas que comienzan en los conductos secretores, pero que no invaden el tejido mamario adyacente.

En cuanto a la angiotensina-IV, hay que indicar que su acción se lleva a cabo a través de su receptor AT4. Recientemente este receptor se ha identificado en membrana adrenal bovina como la aminopeptidasa regulada por insulina (*insulin-regulated aminopeptidase* [IRAP]), que se corresponde con la actividad oxitocinasa. Albiston et al[47] postulan que los ligandos del receptor AT4 median sus efectos fisiológicos mediante la inhibición de la actividad oxitocinasa e inhiben la hidrólisis de sus sustratos de forma dependiente de la dosis. La oxitocinasa pertenece también al grupo de las metaloenzimas dependientes del cinc. Es una proteína de membrana tipo II[48] con capacidad de actuar sobre sustratos sintéticos como S-bencil-L-cistina-para-nitroanilida[49], cys-di-naftilamida[50] así como sobre hormonas peptídicas oxitocina y vasopresina[51]. Se ha descrito que la oxitocina es común en células de mama sana pero raramente o nunca se ha detectado en el cáncer de mama[52]; además, inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama en humanos[53], por lo que podría tener un papel en la predicción de esta enfermedad[54]. En humanos, existe un incremento muy significativo de la actividad oxitocinasa en tejido tumoral, que es particularmente interesante desde el punto de vista de su papel en la hidrólisis de oxitocina[55]. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que se han descrito receptores de la oxitocina en tumores de mama humanos y en células tumorales, y además que éstos son funcionales[56].

A diferencia de lo que ocurre en otros sistemas de receptores hormonales, en los que la respuesta biológica es modulada por los cambios en la concentración de hormona, el sistema oxitocina-receptores de la oxitocina es regulado preferentemente por los cambios en la expresión de estos receptores, si bien los reguladores de los valores de dichos receptores en la glándula mamaria no son conocidos[56]. Bussolati et al[57] encontraron receptores de la oxitocina en mama en lesiones intraductales de lesiones hiperplásicas benignas. También se encontraron en carcinomas de mama primarios y metastáticos, lo que sugiere que la interacción entre la oxitocina y sus receptores podría intervenir en el origen y la evolución de las lesiones no neoplásicas y los carcinomas de mama. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo reflejan un aumento significativo de la actividad oxitocinasa, por lo que los valores de oxitocina estarían disminuidos en el suero de las ratas con tumores de mama. Recientemente se ha descrito un nuevo efecto biológico de la oxitocina: actúa como regulador del crecimiento en enfermedades neoplásicas, y además se ha confirmado el efecto inhibidor de la oxitocina sobre el crecimiento de carcinomas mamarios en rata y ratón *in vivo*. El imprevisto papel de la oxitocina y sus análogos en la regulación de la proliferación celular, así como la difusa expresión de sus receptores en tejido neoplásico de distinto origen, abre nuevas perspectivas sobre el papel biológico del sistema oxitocina-receptores de la oxitocina en el cáncer[58]. En resumen, se podría afirmar que las bajas concentraciones séricas de angiotensina-II, con la consecuente posible sobreexpresión de sus receptores en tejido mamario, así como el aumento de los valores de angiotensina-IV, como consecuencia de los cambios en la actividad de las aminopeptidasas que intervienen en el metabolismo de las angiotensinas y su posible conexión con el sistema oxitocina-receptores de la oxitocina-oxitocinasa, a través de los receptores AT4 (fig. 6), podrían hacer suponer la existencia de un sistema renina-angiotensina local en la glándula mamaria, que estaría modificado por el desarrollo de carcinomas mamarios y favorecería una disminución de los valores de oxitocina, lo que justificaría, al menos en parte, el desarrollo y la progresión de esta enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, la participación hormonal tanto en el desarrollo normal como en el de los carcinomas en la mama es fundamental. La inducción de tumores mediante NMU se caracteriza por inducir tumores dependientes del estrógeno[59]; uno de sus principales atributos es que la proporción de carcinomas mamarios dependientes del ovario es similar a la observada en la enfermedad en humanos[60]. La dependencia estrogénica de dichos tumores inducidos mediante NMU podría relacionarse con la disminución observada en la actividad Pcp. Esta enzima es una omega peptidasa, ampliamente distribuida en tejidos y fluidos animales[61] que hidroliza residuos piroglutamil N-terminales de péptidos biológicamente activos, como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)[62]. Trabajos previos han mostrado cambios en la actividad Pcp en cáncer de mama en mujeres, en el tejido tumoral y ad-

yacente, y se ha sugerido que cambios en esta enzima o en sus posibles sustratos podrían tener un importante papel en la patogenia del cáncer de mama[63].

Ya que uno de los sustratos susceptibles de la Pcp es la GnRH, la disminución observada en su actividad indicaría la existencia de valores circulantes de esta hormona peptídica elevados. En este sentido, se han localizado en tejido mamario receptores de la GnRH (GnRH-R), lo que sugirere un papel local de la GnRH en la glándula mamaria humana[64].

También se han inmunolocalizado GnRH-R en el citoplasma de células tumorales e incluso en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacente al carcinoma. Aunque se han encontrado GnRH-R tanto en el tejido normal como en el tumoral, la presencia de GnRH-R fue superior en el tejido tumoral que en el no tumoral[65]. De cualquier forma, el aumento de los valores de GnRH conduce a un incremento en las concentraciones de hormonas esteroideas gonadales[66], como el estradiol, que estimula tanto la actividad mitótica como el crecimiento del tejido epitelial mamario y conduce a un aumento de la sensibilidad al carcinógeno. Por tanto, la disminución de la actividad Pcp podría hacer suponer un aumento de los valores de GnRH, lo que se traduce en un aumento en la producción de hormonas esteroideas gonadales, responsables, al menos en parte, del inicio y el desarrollo de esta enfermedad.

En resumen, se puede concluir que las alteraciones de las actividades AP, APN, APA, oxitocinasa y Pcp encontradas en el suero de ratas con cáncer de mama inducido por NMU sugieren una disminución de los valores de angiotensina-II y oxitocina, y un aumento de las concentraciones de angiotensina-IV y GnRH con la enfermedad. Además, que el receptor AT4 para la angiotensina-IV muestre actividad oxitocinasa podría sugerir la existencia de una conexión entre un sistema renina-angiotensina local en la mama y el sistema oxitocina-receptores de la oxitocina-oxitocinasa, que estaría implicado en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama, de forma, además, dependiente de estrógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forbes JF. The control of breast cancer: the role of tamoxifen. Semin Oncol 1997;24(Suppl 1):SI5-19.
2. Reid SE, Murthy MS, Kaufman M, Scanlon EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. Br J Surg 1996;83:1037-46.
3. Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. Environ Health Perspect 1996;104:938-67.
4. Thompson HJ, McGinley JN, Wolfe P, Singh M, Steele VE, Kelloff GJ. Temporal sequence of mammary intraductal proliferations, ductal carcinomas in situ and adenocarcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea in rats. Carcinogenesis 1998;19:2181-5.
5. Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Breton Huggings. Cancer Res 1985;45:3415-43.
6. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ. Biology of disease: comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. Lab Invest 1990;62:244-78.
7. Thompson HJ, McGinley JN, Rothhammer K, Singh M. Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually inmature female rats with 1-methyl-1-nittrosourea. Carcinogenesis 1995;16:2407-11.
8. Russo J, Russo IH, Van Zwieten MJ, Rogers AE, Gusterson B. Classification of neoplastic and nonneoplastic lesions of the rat mammary gland. En: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, editors. Integument and mammary glands. Monographs on pathology of laboratory animals. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 275-340.
9. Thompson HJ, Adlaka H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1 nitrosourea. Cancer Res 1991;51:3412-5.
10. Tandon AK, Clark GM, Chammes GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. N Engl J Med 1990;322:297-302.
11. Rawlings ND. Introduction. En: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessue JF, editors. Handbook of proteolytic enzymes. New York: Academic Press, 1998.
12. Rawlings ND. Metallopeptidases. Introduction: metallopeptidases and their class. En: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessue JF, editors. Handbook of proteolytic enzymes. New York: Academic Press, 1998; p. 334.
13. Sanderink GJ, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases: a review of the literature. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:795-807.
14. Rivera ES, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamed N, et al. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. Cancer Lett 1994;86:223-8.
15. Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{-14} mole. Biochem Biophys Res Commun 1962;9:430-5.
16. Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. Biochim Biophys Acta 1971;242:190-3.
17. Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. Biochim Biophys Acta 1980;613:459-68.
18. Schwabe C, McDonald JK. Demonstration of a pyroglutamyl residue at the N-terminus of the B-chain of porcine relaxin. Biochem Biophys Res Commun 1977;74:1501-4.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
20. Schwartz MK. Laboratory aids to diagnosis enzymes. Cancer 1976;37:542-8.
21. Taper HS, Lans M, Economidou-Karaoglou A, DeGerlache J, Roberfroid M. Variations in serum alkaline Dnase activity: a possible clinical test for therapeutic prognosis of human tumors. Anticancer Res 1986;6:949-56.
22. Hamano H, Hayakawada T, Kondo T. Serum immunoreactive elastase in diagnosis of pancreatic diseases: a sensitive marker for pancreatic cancer. Dig Dis Sci 1987;32:50-6.
23. Severini G, Gentilini L, Tirelli C. Diagnostic evaluation of alanine aminopeptidase as serum marker for detecting cancer. Cancer Biochem Biophys 1991;12:199-204.
24. Classification of peptidase families. Disponible en: http://www.expasy.ch, P50123 AMPE RAT.
25. Cooper MD, Mulvaney D, Coutinho A, Cazenave PA. A novel cell surface molecule on early B-lineage cells. Nature 1986;321:616-8.
26. Nagatsu I, Gillespie L, Folk JE, Glenner GG. Serum aminopeptidases, 'angiotensinase', and hypertension. I. Degradation of antiotensin II by human serum. Biochem Pharmacol 1965;14:721-8.
27. Sakura H, Kobayashi H, Mizutani S, Sakura N, Hashimoto T, Kawashima Y. Kinetic properties of placental aminopeptidase A: N-terminal degradation of angiotensin II. Biochem Int 1983;6:609-15.

28. Sim MK, Choo MH, Qiu XS. Degradation of angiotensin I to [des.Asp[1]] angiotensin I by a novel aminopeptidase in the rat hypothalamus. Biochem Pharmacol 1994;48:1043-6.
29. Mizutani S, Goto K, Nomura S, Ino K, Goto S, Kikkawa F, et al. Possible action of human placental aminopeptidase N in feto- placental unit. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993;82:65-80.
30. Ahmad S, Wang L, Ward PE. Dipeptidyl (amino) peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. J Pharmacol Exp Ther 1992;260:1257-61.
31. Shimamura M, Hazato T, Iwaguchi T. A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction; hydrolysis of enkephalin. Brain Res 1988;445:350-3.
32. Shimaura M, Hazato T, Iwaguchi T. Enkephalin-degrading aminopeptidase in the longitudinal musle layer of guinea pig small intestine: its properties and action on neuropeptides. J Biochem 1991;109:492-7.
33. Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilks S. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. Biochem Phamacol 1990;40:1725-32.
34. Hoffman T, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. FEBS Lett 1993;336:61-4.
35. Kanayama N, Kajiwara Y, Goto J, El Maradny E, Maehara K, Andou K, et al. Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). J Leukoc Biol 1995;57:129-34.
36. Chansel D, Czekalski S, Vndermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. Am J Physiol 1998;275:F535-42.
37. Palmieri FE, Petrelli JJ, Ward PE. Vascular, plasma membrane aminopeptidase M. Metabolism of vasoactive peptides. Biochem Pharmacol 1985;34:2309-17.
38. Palmieri FE, Bausback HH, Ward PE. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. Biochem Pharmacol 1989;38:173-80.
39. Saiki I, Fujii H, Yoneda J, et al. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor- cell invasion and extracellular matrix degradation. Int J Cancer 1993;54:137-43.
40. Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T, et al. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. Clin Exp Metastasis 1995;13:337-44.
41. Hansen AS, Noren O, Sjöström H, Werdelin O. A mouse aminopeptidase N is a marker for antigen-presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. Eur J Immunol 1993;23:2358-64.
42. Bhagwat SV, Lahdeuranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/ APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. Blood 2001;97:652-9.
43. Pascualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sahamoto M, Stryhn A, et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. Cancer Res 2000;60:722-7.
44. Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Sánchez B, Alba F, Ramírez M. Cáncer de mama y actividad proteolítica. Act Med 1999;85:87-99.
45. Foulon T, Cadel S, Cohen P. Metallopeptidases. Aminopeptidase B. Name and history. En: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessue JF, editors. Handbook of proteolytic enzymes. New York: Academic Press, 1998; p. 348.
46. De Paepe B, Verstraeten VLRM, De Potter CR, Vakaet LAM-L, Bullock GR. Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. Histochem Cell Biol 2001;116:247-54.
47. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT4) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. J Biol Chem 2001;276:48623-6.
48. Rasmussen TE, Pedraza-Díaz S, Hardré R, Laustsen PG, Carrion AG, Kristensen T. Structure of the human oxytocinase / insulin- regulated aminopeptidase gene and localization to chromosome 5q21. Eur J Biochem 2000;267:2297-306.
49. Hiwada K, Saeki-Yamguchi C, Inaoka Y, Kokubu T. Cystine aminopeptidase from pregnancy serum and placental. Biochem Med 1978;20:296-304.
50. Lampelo S, Vaha-Perttula T. Fractionation and characterization of cystine aminopeptidase (oxytocinase) and arylamidase of the human placenta. J Reprod Fertil 1979;56:285-96.
51. Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura M, Nakazato H, Tomoda Y. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. Arch Biochem Biophys 1992;292:388-92.
52. North WG, Pai S, Friedman A, Yu X, Fay M, Memoli V. Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat 1995;34:229-35.
53. Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G. Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. Virchows Arch 1994;425:467-72.
54. Murrell TG. The potential for oxytocin to prevent breast cancer; a hypothesis. Breast Cancer Res Treat 1995;35:225-9.
55. Itoh C, Nagamatsu A. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin; purification and partial characterization. Biochim Biophys Acta 1995; 1243:203-8.
56. Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Sotoff MS. Demonstration of funcional oxytocin receptors in human breast Hs 578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. Endocrinology 1999;140:2258-67.
57. Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. Inmunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and nonneoplastic tissues of the breast. Am J Pathol 1996;148:1895-903.
58. Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G. Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors. Ann Oncol 2001;12(Suppl):S37-9.
59. Rose DP, Pruitt B, Stanber P, Ertusk E, Bryan GT. Influence of dosage schedule on the biological characterstics of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. Cancer Res 1980;40:235-9.
60. Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenetic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. Carcinogenesis 1998;19:223-7.
61. Beynon R, Bond J. Proteolytic enzymes. 2.ª ed. Oxford, New York: Oxford University Press, 2001.
62. Cummins PM, O'Connor B. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. Bochim Biophys Acta 1998;429:1-17.
63. Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F, Ramírez M. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. Clin Chem 1999;45:1797-802.
64. Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R. The genes for gonadotropin releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. Int J Cancer 1997;71:595-9.
65. Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Shittulli F, Marzullo F, Reshkin SJ. GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not- involved breast tissue. J Endocrinol Invest 2000;23:90-6.
66. Huirne JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. Lancet 2001;358:1793-803.