

Aminopeptidasas cerebrales. Una perspectiva histórica

F. Alba / C. Aguirre / A. Aguilera / M. Ramírez

Neuropéptidos

La comunicación intercelular es una función esencial de todo organismo viviente y está mediada fundamentalmente por mensajeros químicos. Hasta muy recientemente, se pensaba que la transmisión sináptica se llevaba a cabo exclusivamente por monoaminas (noradrenalina, adrenalina, dopamina y serotonina), determinados aminoácidos excitadores e inhibidores (Asp, Glu, GABA, Gly) y por la acetilcolina. A finales de la década de los 60, sólo

la sustancia P se había descrito simultáneamente en el cerebro y en el tracto gastrointestinal (GI). Sin embargo, antes de que los péptidos fueran extensamente estudiados en el sistema nervioso, ya se pensaba en ellos como una nueva categoría de neurotransmisores. Posteriormente, llegó a

El descubrimiento de los neuropéptidos a comienzos de los años 70, supuso una auténtica revolución en el terreno de la neurobiología. Su existencia a nivel cerebral, no sólo amplió, sino que diversificó las posibilidades de transmisión y modulación de la comunicación sináptica, limitadas hasta entonces a un escaso número de neurotransmisores. Mientras se constataba la existencia de numerosos péptidos con propiedades neurotransmisoras y/o neuromoduladoras, así como de sus receptores a nivel cerebral, los investigadores también dirigieron su atención hacia la regulación de su actividad. Puesto que los neuropéptidos se sintetizan exclusivamente a nivel del soma neuronal y no hay claras evidencias de su recaptación tras su liberación al espacio intersináptico, parece evidente que su principal mecanismo de regulación se lleve a cabo a través de su inactivación mediante la acción hidrolítica de peptidasas cerebrales. Dentro de ellas, las aminopeptidasas representan el grupo más abundante a nivel cerebral. La presente revisión describe con perspectiva histórica, el conocimiento más significativo que hasta ahora tenemos de las aminopeptidasas cerebrales, incidiendo en sus propiedades bioquímicas y en la acción que ejercen sobre sus sustratos peptídicos.

ser evidente que los neuropéptidos estaban implicados en una amplia variedad de funciones. Se demostró también que muchas acciones peptídicas tenían lugar lentamente, que existían incongruencias entre la localización de los péptidos y la de sus receptores en el cerebro y que muchos neuropéptidos coexistían con otros transmisores en una misma neurona.

El concepto de neuromodulación incluye un tiempo lento de transmisión, un lugar de acción más difuso

y la capacidad de alterar las respuestas secundarias en la unión de un transmisor. Por lo tanto, los anteriores descubrimientos, sugerían que los neuropéptidos podrían servir como neuromoduladores y/o neurotransmisores. Sin embargo, el término neuromodulador tiene un uso ambiguo y es ne-

cesario delimitar aún más su concepto. Este término implica el que la sustancia en cuestión no tenga un efecto directo sobre el sustrato o que el efecto sea independiente de la modulación directa. El sustrato cuya respuesta se mide, puede ser una organela subcelular, un nervio, una célula endocrina o muscular, un circuito neuronal, un sistema transmisor, o un órgano. El efector, cuya acción directa sobre el sustrato es modulada, puede ser un neurotransmisor clásico, un péptido o una estimulación eléctrica. De acuerdo con esto, una respuesta puede ser un cambio en el flujo iónico transmembrana, actividades neuronales, liberación de transmisores u hormonas, reflejos o conductas.

En la actualidad se han descrito un amplio número de péptidos en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados y su estudio está aportando nuevos e importantes datos para el conocimiento de la función neural.

Las concentraciones de péptidos cerebrales e hipofisarios son varios órdenes de magnitud inferiores a las de los neurotransmisores clásicos y aminoácidos neurotransmisores. De los péptidos inicialmente descritos en el tracto GI, sólo la colecistoquina (CCK) parece encontrarse en el cerebro en mayor concentración que a nivel GI. Pero estas bajas concentraciones no minimizan su importancia funcional. El contenido glandular de las hormonas peptídicas es alto con el fin de permitir una gran difusión en la circulación. Sin embargo, en el SNC los péptidos actúan en cortas distancias con mucha menor dilución (1, 2).

Bioquímica de las neuronas peptidérgicas

Biosíntesis

Existe una amplia variedad de péptidos activos cuyo tamaño oscila desde el dipéptido carnosina (Ala-His) hasta polipéptidos tales como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que contiene 141 aminoácidos. Se acepta que todos los péptidos cerebrales

conocidos, excepto la carnosina, se originan a través del procesado de grandes moléculas precursoras sintetizadas en el cuerpo neuronal. En tales moléculas, las secuencias activas están habitualmente flanqueadas por pares de aminoácidos básicos, los cuales representan un claro objetivo para los enzimas proteolíticos.

Almacenamiento

Los neuropéptidos, son almacenados en vesículas secretoras y transportados hasta el terminal sináptico. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la coexistencia de aminas y péptidos dentro de la misma neurona y, en algunos casos, en la misma vesícula.

Liberación

Los neuropéptidos se liberan a partir del terminal nervioso mediante estímulos despolarizantes por un proceso Ca^{2+} -dependiente, al igual que la liberación de neurotransmisores clásicos.

Existen evidencias de que las monoaminas pueden regular la liberación sináptica de los neuropéptidos. Por ejemplo, la dopamina estimula y la serotonina inhibe la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). Tales observaciones indican que la disfunción de determinados sistemas aminérgicos podría tener importantes consecuencias en la actividad de un sistema peptidérgico relacionado funcionalmente. El caso contrario también hay que tenerlo en cuenta.

Receptores

La interacción del péptido endógeno con su receptor, al igual que los neurotransmisores clásicos, dará lugar a cambios en la permeabilidad de determinados canales iónicos o actuará a través de la generación de un segundo mensajero intracelular. Los receptores de neuropéptidos cerebrales se caracterizan por tener bajas densidades (en torno a 100 fmol/mg prot) pero muy alta afinidad, aproximadamente dos órdenes de

magnitud superior que la que presentan los neurotransmisores clásicos por sus receptores. Existen múltiples subclases de receptores peptídicos, esta heterogeneidad refleja la diversidad de los procesos implicados. En algunos casos, como el de la sustancia P, la distribución de receptores es paralela a la distribución de los terminales nerviosos que contienen el péptido. Sin embargo, en el caso de la neurotensina y de la TRH, existen importantes discrepancias entre la distribución del péptido y la de su receptor. Por ejemplo, existe una gran densidad de receptores de TRH en la corteza cerebral, sin embargo, hay una baja concentración del péptido. Esto podría sugerir que el metabolismo del péptido en esta región es más alto que el que cabría esperar de la medida de sus niveles en el tejido.

Inactivación

Generalmente, se acepta que la mayoría de los neuropéptidos, si no todos, son inactivados por peptidasas extracelulares unidas a membrana. Sin embargo, no debe rechazarse el posible papel de peptidasas solubles liberadas a partir de neuronas o células gliales. Diversos estudios han demostrado que los sinaptosomas son capaces de degradar una serie de neuropéptidos. La actividad peptidásica a nivel sinaptosomal es fundamentalmente soluble pero existe una proporción significativa de actividad unida a membrana.

Neuropeptidasas

Definición y clasificación

Se podría definir a las neuropeptidasas como peptidasas activas cerebrales o como enzimas que degradan neuropéptidos, hormonas peptídicas o neuromoduladores presentes en el cerebro. El metabolismo de los neuropéptidos es muy rápido y los altos niveles de actividad degradativa cabría esperar, en principio, que se correspondieran con bajos niveles del péptido hidrolizado.

El sistema nervioso, al igual que otros tejidos, contiene un determinado número de endo- y exopeptidasas implicadas en la degradación de largas cadenas de péptidos, dando lugar a otros más pequeños con la posterior separación de dipéptidos o aminoácidos libres. La nomenclatura de estas enzimas es compleja debido entre otras cosas, a no existir un alto grado de especificidad de sustrato. En general, varias enzimas son capaces de hidrolizar un solo sustrato y muy pocos sustratos son metabolizados solamente por un enzima específico. La distinción entre exopeptidasas y endopeptidasas no es absoluta y algunas exopeptidasas exhiben actividad endopeptidásica y viceversa. Por ejemplo, la arginina-aminopeptidasa presenta tanto actividad exo- como endopeptidásica (3).

Las exopeptidasas se dividen, de acuerdo con su especificidad, en aquellas que hidrolizan aminoácidos individualmente a partir del extremo amino de un péptido (aminopeptidasas) (E.C. 3.4.11.-), aquellas que hidrolizan aminoácidos individuales a partir del extremo carboxilo, exhibiendo su máxima actividad a pH ácido (carboxipeptidasas) (E.C. 3.4.16.-) o requiriendo cationes divalentes para su actividad (metalocarboxipeptidasas) (E.C. 3.4.17.-), aquellas que hidrolizan dipéptidos (dipéptido-hidrolasas) (E.C. 3.4.13.-), o aquellas que separan dipéptidos del extremo amino (dipeptidil-péptido hidrolasas) (E.C. 3.4.14.-), o del carboxilo (peptidil-dipéptido-hidrolasas) (E.C. 3.4.15.-) (4). En la presente revisión, nos centraremos exclusivamente en la descripción de las aminopeptidasas cerebrales.

Aminopeptidasas cerebrales

La primera aminopeptidasa en conocerse y caracterizarse en el Sistema Nervioso Central fue la Leucina Aminopeptidasa (EC 3.4.11.1). En 1963, BRECHER (5) comunicó por primera vez la existencia de este enzima en la fracción soluble, mitocondrial y microsomal de cerebro de buey, demostrando su capacidad para hidrolizar los sus-

tratos Leu-, Tyr-, y Phe-NH₂. No es, sin embargo, hasta 1991 (6), cuando se estudian las propiedades de este enzima purificado a partir del cerebro humano. En el proceso de purificación se consiguió separar completamente su actividad de la de alanil aminopeptidasa soluble, demostrándose su pH óptimo de 9.5 y su requerimiento de Mg⁺⁺ para obtener la máxima eficacia. El enzima es poco activo frente a sustratos sintéticos del tipo de las aminoacil-7-amido-4-metil-cumarinas, pero muy activo sobre las encefalinas. Sin embargo, otros péptidos biológicos son, o poco hidrolizables (colecistoquinina, angiotensina), o nada en absoluto (somatostatina, vasopresina). Como sucede en otros tejidos, se inhibe por bestatina y amastatina, pero no por puromicina. La leucil aminopeptidasa, por tanto, presenta propiedades similares a la detectada en otras localizaciones y, debido a su capacidad de hidrolizar a las encefalinas, debería tenerse en cuenta como posible inactivador fisiológico de éstos péptidos. No obstante, la alanil aminopeptidasa posee mayor actividad sobre estos sustratos. Ambos enzimas, de localización citosólica, se consideran con pocas posibilidades de acceder a los neuropéptidos sinápticamente liberados, y por tanto, a no ser que exista un proceso de recaptación peptídica, su importancia fisiológica es aún poco clara.

La actividad enzimática de *alanina aminopeptidasa soluble* (EC 3.4.11.14) en el SNC y SNP (sistema nervioso periférico) fue detectada en ratas, utilizando aminoacil-β-naftilamidas (Leu-, Ala-, Phe-β-naftilamida) como sustratos, por ADAMS y GLENNER en el año 1962 (7). Dicha actividad, determinada colorimétricamente, se obtuvo a partir del sobrenadante de homogeneizados centrifugados a 700 g del nervio ciático, nervio óptico, cuerpo caloso y lóbulo frontal del cerebro de rata. La hidrólisis de las aminoacil-β-naftilamidas correspondían a aminopeptidasas distintas de la leucil aminopeptidasa detectada en riñón utilizando como sustratos dipéptidos y leucinamida, y a su vez distinta de la catepsina

C detectada en bazo. Debido a sus propiedades, resulta ser la primera descripción en el SNC de la actividad que hoy conocemos como alanil aminopeptidasa soluble. Durante la misma década, otros grupos de investigadores estudiaron las propiedades y localización de este enzima en el SNC. ELLIS y PERRY (8, 9), centraron su estudio en la hipófisis de cerebro bovino, determinando la actividad aminopeptidásica en fracción soluble con distintas aminoacil-β-naftilamidas. Confirmaron que el enzima se activa por compuestos tiólicos tales como el mercaptoetanol, el cual sirve para su conservación y reactivación, y que tal actividad se manifestaba también en otros tejidos. Además describieron en hipófisis otra actividad aminopeptidásica, que denominaron arginil aminopeptidasa, específica para los aminoácidos Arg y Lys (posteriormente conocida también como aminopeptidasa B). La primera requería compuestos tiólicos para su activación, se inhibía por puromicina y mostraba además actividad hidrolítica para otros aminoácidos básicos y neutros. Posteriormente va a ser conocida como alanil aminopeptidasa soluble.

El grupo de investigadores encabezados por MARKS (10), realiza una serie de estudios de estos enzimas en el SNC. A partir de homogeneizados de cerebros de ratas (presumiblemente fracción soluble), purificaron parcialmente con DEAE-celulosa (diethylaminoetil-celulosa) tres distintos picos de actividad aminopeptidásica. El primero de ellos resultaba específicamente sensible hacia el tripéptido Leu-Gly-Gly, y no hidrolizaba las aminoacil-β-naftilamidas (leucil aminopeptidasa). El segundo era específico para los aminoácidos Arg y Lys (aminopeptidasa B), y el tercero era activo tanto con aminoácidos básicos como neutros (alanil aminopeptidasa). Sólo se encontraron actividades muy pequeñas para aminoácidos ácidos. Tanto el segundo como el tercer pico requerían compuestos tiólicos y eran inhibidos por puromicina, pero sus cinéticas enzimáticas y pH óptimos eran diferentes entre sí y además diferentes de la típica

leucil aminopeptidasa de riñón, no sensible a la puromicina.

Estos mismos autores demostraron también (11) que la actividad aminopeptidásica se encontraba predominantemente a nivel soluble, aunque podía detectarse asimismo en el núcleo, en las mitocondrias y en las membranas, pero no a nivel ribosomal. Una concentración especialmente alta fue observada a nivel de las terminales nerviosas, lo que hizo sugerir a los autores la posible participación de estos enzimas en el metabolismo de péptidos o proteínas involucradas en la función sináptica.

Además de su requerimiento de grupos tioles en estado reducido para su completa actividad, estos enzimas necesitaban la presencia de un metal en estado iónico tal como zinc, cobalto o manganeso, puesto que los agentes quelantes como el EDTA ocasionaban pérdida de su actividad.

Un nuevo estudio sobre la distribución subcelular de alanil aminopeptidasa se llevó a cabo por BECK y cols. en 1968 (12), en la médula espinal de rata, confirmando la predominancia de este enzima a nivel soluble y su presencia en otras fracciones en menor proporción. Encuentran, además, que una parte considerable de la actividad enzimática se localiza en la mielina. Asimismo, mediante un estudio electroforético en gel de poliacrilamida y siempre utilizando alanina- β -naftilamida como sustrato, consiguieron separar la actividad enzimática en dos bandas en todas las fracciones subcelulares, incluida la fracción soluble.

La alanil aminopeptidasa soluble también ha sido estudiada en cerebro de primate. BRECHER y SUSZKIW (13, 14) purificaron en la fracción soluble del cerebro de mono un enzima capaz de hidrolizar aminoacil- β -naftilamidas de aminoácidos neutros y básicos y con poca actividad para aminoácidos ácidos. El enzima no exhibía actividad dipeptidásica, tripeptidásica o amidásica y resultaba inhibido por puromicina. Sin embargo, a diferencia de MARKS y cols. (10), no pudieron demostrar la existencia de isoenzimas en su preparación. Posteriormente,

HAYASHI y cols. (15, 16) purificaron nuevamente alanil aminopeptidasa soluble en cerebro de mono que mostraba resultados coherentes con los previamente conocidos. El enzima se inhibía con puromicina y EDTA, no poseía actividad endopeptidásica, se estimulaba por DTT y se inhibía por bestatina reversiblemente. Los péptidos tales como la LHRH y TRH (ambos con piroglutámico en sus extremos N-terminales), la sustancia P y la bradikinina (cuyos aminoácidos N-terminales son prolina), no resultaban afectados por el enzima. Sin embargo, péptidos con un aminoácido N-terminal neutro como las encefalinas, resultaban rápidamente hidrolizadas. Asimismo, y sorprendentemente, la preparación hidrolizaba secuencialmente angiotensina I y II (cuyos aminoácidos N-terminales son aspártico).

Un nuevo impulso al estudio de las aminopeptidasas y otros enzimas proteolíticos, se produjo tras el descubrimiento de los péptidos opiáceos, particularmente los pentapéptidos Met- y Leu-encefalina. El hecho de que estas sustancias mostrasen un efecto analgésico de muy corta duración, dirigió las investigaciones hacia los enzimas que las degradan. HAMBROOK y cols. (17) demostraron que la exposición de las encefalinas a homogeneizados cerebrales producía una rápida hidrólisis del primer enlace del extremo amino-terminal (Tyr-Gly). Posteriormente se estudió la localización subcelular de esta actividad hidrolítica en cerebro de rata, detectándose una gran actividad en la fracción soluble en comparación con el resto de las fracciones estudiadas, así como una apreciable actividad a nivel sinaptosomal (aunque menor que la anterior) que los autores consideraban compatible con el hipotético papel neurotransmisor de las encefalinas. Un elevado número de trabajos de investigación confirmaron posteriormente la degradación de las encefalinas por efecto de aminopeptidasas solubles procedentes de distintos tejidos (18-22) así como la capacidad de los extractos de membrana cerebrales de degradar también las

encefalinas por su extremo amino-terminal (23).

Durante la década de los ochenta, el estudio de las aminopeptidasas en general y de la alanil aminopeptidasa en particular, se hace cada vez más complejo y diversificado debido probablemente a la introducción de nuevas técnicas de determinación de estas sustancias y al descubrimiento de un número cada vez mayor de péptidos cerebrales con probable función neurotransmisora o neuromoduladora. Así, por ejemplo, SHAW y COOK (24) desarrollaron un método histoquímico para la localización de aminopeptidasas en el SNC basado en la visualización microscópica de la hidrólisis de aminoacil- β -naftilamidas mediante acoplamiento de la β -Naftilamina a un colorante. Los autores mostraron una distribución no uniforme de la actividad enzimática que se concentraba especialmente en distintos tipos neuronales, así como en las paredes vasculares. Esta desigual distribución de aminopeptidasas en el SNC ha sido recientemente confirmada en nuestro laboratorio mediante métodos bioquímicos (25).

Experimentos posteriores contribuyen a crear una situación cada vez más compleja en relación al proceso de inactivación de los neuropéptidos. GUYON y cols. (26), utilizando una técnica de HPLC para separar los fragmentos de las encefalinas, describieron la existencia conjunta de actividad aminopeptidásica soluble (atribuible a alanil aminopeptidasa) y unida a membrana en el estriado de cerebro de ratón, así como una dipeptidil carboxipeptidasa unida a membrana que a partir de entonces se conoció como «encefalinas» y que actualmente se ha identificado con la previamente conocida como endopeptidasa 24.11 (27). Las referencias de que una aminopeptidasa no unida a membrana y sensible a puromicina podía hidrolizar Leu- y Met-encefalina en cerebro de rata, han sido confirmadas posteriormente por diversos autores (22, 28-30). Tal aminopeptidasa posee propiedades que la identifican como alanil aminopeptidasa soluble. Dicha actividad es distinta y sepa-

rable de la detectada a nivel de las membranas, incluida la membrana sinaptosomal (28), circunstancia que ha dado origen a una controversia sobre qué enzima es responsable de la degradación fisiológica de las encefalinas presumiblemente liberadas en la terminal sináptica.

La alanil aminopeptidasa soluble no sólo tiene capacidad para hidrolizar las encefalinas, sino que es también capaz de degradar otros neuropéptidos, tanto opiáceos como no opiáceos. Ya en 1980, HERSH y cols. (31) demostraron que los homogeneizados de cerebro de rata poseían actividad aminopeptidásica capaz de hidrolizar, además de las encefalinas, las α -, β - y γ -endorfinas, liberando la tirosina N-terminal común de los tres péptidos. Estos mismos autores purificaron posteriormente alanil aminopeptidasa soluble en cerebro bovino, y la identificaron por sus propiedades con las previamente descritas en otros laboratorios (32). Asimismo, la capacidad de este enzima para degradar distintas dinorfinas (familia de neuropéptidos que comienzan por la secuencia del pentapéptido Leu-encefalina) ha sido puesta de manifiesto por BERC y MARKS (33) en cerebro de rata. Otros péptidos que pueden ser degradados por alanil aminopeptidasa soluble son las kininas 10 y 11 para rendir kinina 9 (bradikinina) (34, 35).

En relación al número de aminopeptidasas capaces de hidrolizar a las encefalinas, un trabajo parcialmente clarificador ha sido llevado a cabo por HUI y cols. en 1988 (36) en cerebro de rata. Los autores purifican simultáneamente actividades de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana, y pueden caracterizar al menos cuatro enzimas distintos (SI, SII, MI, MII). SI y SII, además de degradar a las encefalinas, hidrolizaban el sustrato arginil- β -naftilamida. SII también hidroliza alanil- β -naftilamida, por lo que en principio podría ser análogo a la alanina aminopeptidasa soluble, mientras SI resulta similar a la aminopeptidasa B. Existen sin embargo, discrepancias en cuanto al efecto de los inhibidores. Las ami-

nopeptidasas de membrana se discutirán posteriormente.

La alanil aminopeptidasa ha sido purificada recientemente (37) a partir de la corteza de cerebro humano, y se ha corroborado su capacidad para hidrolizar encefalinas y péptidos relacionados. Aunque generalmente se asume que la inactivación de los neuropéptidos es mediada por la peptidasas unidas a 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; 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) fue proporcionada por ELLIS y PERRY en 1966 (9) en hipófisis bovinas. Independientemente, SCHNEBLI y cols., (22) purificaron una aminopeptidasa en la fracción citosólica del cerebro de rata que mostraba una alta actividad por las aminoácil-B-naftilamidas con aminoácidos básicos, aunque se mostró también sensible a aminoácidos neutros, pero no en presencia de aminoácidos ácidos. Según los autores, las propiedades del enzima diferían de las aminopeptidasas cerebrales previamente conocidas, aunque no comparan dicho enzima con el descrito por ELLIS y PERRY (9) en hipófisis bovina.

La actividad de este enzima ha sido especialmente estudiada en relación a su posible participación en el metabolismo del sistema renina-angiotensina cerebral. Para ello han sido de importancia capital la utilización de inhibidores de los enzimas implicados en este sistema. Concretamente, la sustancia denominada bestatina (38) ha sido utilizada como inhibidor de la aminopeptidasa B, que parece corresponderse con la

arginil aminopeptidasa soluble. WRIGHT y cols. (39), la inyectaron intracerebroventricularmente a ratas hipertensas y ratas normales junto con angiotensina II y III. Demostraron que el pretratamiento con éste inhibidor potenciaba y prolongaba la elevación de la presión arterial producida por la angiotensina III en ratas hipertensas. Los autores sugirieron que estas ratas podrían tener una deficiencia de actividad aminopeptidásica a nivel central que permitiría a las angiotensinas endógenas permanecer en forma activa más tiempo de lo normal, circunstancia que justificaría la existencia de hipertensión.

Tanto la bestatina como la amastatina, un inhibidor de la aminopeptidasa A (40), no parecen producir efecto alguno en el cerebro (41) cuando se aplican iontoforéticamente en el mismo, y se registra la actividad eléctrica en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Tales neuronas son mucho más sensibles a angiotensina III que a angiotensina II, y ambas actividades se potencian dramáticamente cuando simultáneamente se suministra bestatina (inhibidor de la aminopeptidasa B). Por otro lado, la amastatina (inhibidor de la aminopeptidasa A) reduce o bloquea los efectos estimulatorios de la angiotensina II a este nivel. Debe tenerse en cuenta que la aminopeptidasa B tiene capacidad para hidrolizar la angiotensina III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) y que la angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) es susceptible de ser hidrolizada por la aminopeptidasa A.

Tanto la angiotensina II como la III poseen actividad dipsogénica e hipertensora cuando se administran intracerebroventricularmente. La bestatina (inhibidor de la aminopeptidasa B) administrada intracerebroventricularmente induce un considerable incremento del consumo de agua en ratas que no produce la amastatina (un inhibidor de la aminopeptidasa A) (42). Por tanto, la bestatina induce un incremento de la vida media de la angiotensina III impidiendo su inactivación por parte de la ami-

nopeptidasa B. Dado que la bestatina incrementa además la respuesta presora de la angiotensina III, mientras que la amastatina suprime la respuesta presora de la angiotensina II (43), se ha llegado a la conclusión de que la angiotensina II debe ser convertida en angiotensina III para que sea activa en el cerebro y que esta última es inactivada por la aminopeptidasa B.

La arginil aminopeptidasa soluble ha sido purificada en cerebro humano postmortem y resuelta en dos isoenzimas estrechamente relacionados, ambos activados por Cl^- (3). Curiosamente, ambos poseen además actividad endopeptidásica capaz de hidrolizar varios péptidos biológicamente activos, entre los que se encuentran la neurotensina, bradiquinina, angiotensina I, sustancia P, LHRH y somatostatina. Sin embargo, la actividad endopeptidásica no se estimula por Cl^- ni se inhibe por bestatina.

La actividad de *aminopeptidasas unida a membrana* detectada tanto en el cerebro como en otros tejidos, siempre ha sido muy inferior a las altas actividades medidas a nivel citosólico. Pero dicha actividad ha merecido una especial atención por parte de los investigadores (sobre todo a nivel del SNC), puesto que por su localización, son los candidatos a participar en el proceso de degradación de los neurotransmisores liberados al espacio extracelular. Ya en 1977, MILLER y cols. (23), utilizando una preparación de membranas de cerebro de rata, demostraron que la degradación de las encefalinas se realiza primordialmente por una aminopeptidasa, al parecer presente en extractos crudos de éstas membranas. Tales resultados han sido confirmados posteriormente en numerosas ocasiones. En este sentido resulta curioso que la lipotropina 61-91, cuya secuencia aminoterminal se corresponde con el pentapéptido metionina-encefalina, es resistente a la ruptura por la aminopeptidasa de membrana del cerebro de rata (19). Los autores atribuyen este fenómeno al hecho de que este péptido y otros similares, por su longitud, posee propiedades conformacionales que protegen su

extremo amino-terminal de la degradación enzimática. Tal fenómeno, junto con otro parecido que afecta al extremo carboxilo-terminal, aporta una explicación para la larga duración del efecto analgésico de los fragmentos largos similares a la lipotropina comparado con los efectos de corta duración de los péptidos más pequeños de la misma familia.

La degradación de las encefalinas por aminopeptidasas de membrana parece encontrarse acoplada a la interacción de estas sustancias con su receptor, lo que aceleraría su velocidad de degradación (44). De este modo, la unión al receptor opiáceo podría servir como un mecanismo de concentración que asegurara la eficiente inactivación de las encefalinas por medio de una peptidasa situada en su vecindad. Dicha actividad enzimática es potentemente inhibida por el antibiótico puromicina.

Hacia 1980 se conocía que la degradación de las encefalinas se llevaba a cabo por una aminopeptidasa, predominantemente citosólica, y por una endopeptidasa unida a membrana que constituiría el más firme candidato a la consideración de inactivador de estos péptidos si se considera que son liberados al espacio intersináptico como mensajeros intercelulares (45). Sin embargo, durante ese mismo año se descubre que la inactivación de las encefalinas puede llevarse a cabo por tres distintos enzimas unidos a las membranas (46): una aminopeptidasa, una dipeptidil-carboxipeptidasa (encefalinas A), y una dipeptidil aminopeptidasa (encefalinas B). La contribución de cada uno de estos enzimas a la inactivación fisiológica de las encefalinas era desconocida.

La actividad aminopeptidásica unida a membrana ha estado sometida durante la década de los 80 a un exhaustivo estudio (que aún continúa), cuyos resultados parecen concluir que a nivel de membrana existen varios enzimas con actividad aminopeptidásica. Un resumen de los trabajos publicados más relevantes sobre esta cuestión se expone a continuación.

En 1981, HERSH (32) separa dos aminopeptidasas unidas a membrana (MI y MII) en cerebro de ratas capaces de hidrolizar a la Met-enkefalina. MI y MII pueden ser distinguidas porque la primera hidroliza arginil- β -naftilamida 17 veces más rápido que alanil- β -naftilamida, mientras que la segunda muestra mayor afinidad por las aminoácil β -naftilamidas en general, pudiendo hidrolizar naftilamidas tanto de aminoácidos básicos como neutros, es decir, muestra menor especificidad por la naturaleza del aminoácido sustituyente. Tal patrón de actividad ha sido también descrito para las aminopeptidasas solubles, y los resultados fueron confirmados posteriormente por el mismo autor (47). En este último estudio se examina la distribución regional de ambas aminopeptidasas, llegándose a la conclusión de que MII, que hidroliza a las encefalinas, se distribuye de manera parecida a la de los receptores opiáceos.

La aminopeptidasa M II ha sido también purificada en cerebro de mono por SHIMAMURA y cols. (48) y nuevamente en cerebro de rata por HUI y cols. (49) y por ULRICH y HERSH (50), demostrándose que se inhibe por puromicina, bestatina y amastatina (51). HUI y cols. (52) también han purificado una aminopeptidasa de membrana en cerebro de rata que muestra la interesante propiedad de coeluir con el receptor para los opiáceos. Los autores propugnan que ésta es una aminopeptidasa distinta de las previamente conocidas. Estos resultados necesitan posterior confirmación.

En 1985, a raíz de los trabajos de GROS y cols. (53), surge la posibilidad de la existencia de una tercera aminopeptidasa asociada a las membranas celulares del SNC. Estos autores separan dos aminopeptidasas unidas a membrana en el cerebro de rata, una de las cuales se inhibe por puromicina y la otra no. Esta segunda fue identificada como la *aminopeptidasa M* (EC 3.4.11.2) descrita en otros tejidos. Ambas actividades, sin embargo, son inhibibles por bestatina y capaces de hidrolizar a las encefalinas. En un trabajo posterior (54) los autores re-

saltan la similitud existente entre la aminopeptidasa M cerebral y la MI de Hersh (32), aunque las constantes cinéticas de ambos enzimas fuesen diferentes. En el mismo sentido se intentó identificar la actividad aminopeptidásica de membrana restante (más sensible a puromicina) con la aminopeptidasa MII de Hersh. Estudios posteriores (54) han aportado más detalles sobre la localización precisa de esta enzima. En primer lugar (55), la aminopeptidasa M se identificó como un enzima vascular unido a las membranas de músculo liso y células endoteliales de vasos periféricos. Posteriormente, esta misma actividad se detectó y purificó a nivel de los vasos de la microcirculación cerebral (56) y, finalmente, mediante técnicas de inmunización histoquímica (57) se llegó a la conclusión de que el enzima se encontraba exclusivamente (según los autores) localizado a nivel de los vasos sanguíneos en todos los tejidos examinados incluyendo el cerebro. Puesto que es capaz de degradar diversos neuropéptidos, incluidos las encefalinas, se propuso que su específica localización podría estar diseñada para limitar la difusión de péptidos a través de ciertas barreras. Un argumento a favor de esta función es su amplia especificidad de sustrato, lo que le serviría para hidrolizar un amplio espectro de péptidos. En los vasos sanguíneos cerebrales concretamente, el enzima podría servir para limitar el contacto entre las neuronas y los materiales transportados por la sangre. La actividad de aminopeptidasa M constituye alrededor de un 3% de la actividad total obtenida mediante la extracción de membranas de cerebro de rata con Tritón X-100. Además, el antisuero anti-aminopeptidasa M no interacciona con las aminopeptidasas MI y MII de los trabajos previamente citados.

CHAN y cols. (58), han estudiado una aminopeptidasa asociada a las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de rata. Encontraron que el 40% de la actividad de aminopeptidasa total medida con leucina- β -naftilamida estaba unida a membranas, y

podía solubilizarse con Triton X-100. Los autores no probaron con otros sustratos, pero sí demostraron que era capaz de degradar el péptido Met-enkefalina. Además, el enzima mostraba propiedades diferentes a la leucil aminopeptidasa y resultaba inhibido por EDTA y puromicina.

En 1986, GIROS y colaboradores (59), recapitulan sobre las tres aminopeptidasas unidas a membranas de cerebro de ratas que han sido hasta el momento descritas. Las tres son sensibles a la inhibición por bestatina. La primera, llamada aminopeptidasa MI, posee muy baja afinidad por las encefalinas (32, 47), mientras que las otras dos poseen mayor afinidad. Una de ellas ha sido designada aminopeptidasa MII (32, 47), aminoencefalinas de membrana (4, 49,) o aminopeptidasa sensible a puromicina (53, 60), puesto que, a diferencia de la tercera, denominada aminopeptidasa M (53, 60-62), es además sensible a dicho antibiótico. Utilizando bestatina, puromicina y anticuerpos anti-aminopeptidasa M, los autores concluyen que ambas aminopeptidasas participan en la degradación de las encefalinas, pero que es predominante la actividad de la aminopeptidasa M, a pesar de que se encuentra en menores concentraciones que las dos anteriores.

Aunque se consideraba que la aminopeptidasa M restringía su localización a los vasos sanguíneos, un estudio posterior (63), utilizando análisis mediante centrifugación diferencial, demostró que también se localizaba en fracciones que contenían membranas sinápticas, con lo que además de su papel en la prevención del acceso de péptidos circulantes al cerebro, se proponía su participación en la inactivación de los neuropéptidos liberados por las neuronas cerebrales.

Finalmente, se ha descrito una nueva aminopeptidasa a partir de la fracción membrana del cerebro de mono, al parecer distinta de las tres comentadas anteriormente (64). Este enzima posee un peso molecular menor y unas constantes cinéticas diferentes a las anteriores. Sin embargo, el contenido

de este enzima en cerebro es muy bajo, y su caracterización e importancia fisiológica están por determinar.

La aminopeptidasa M que se utiliza comercialmente procedente de la casa Sigma, puede ser utilizada para hacer descender la presión arterial tanto en ratas normotensas como hipertensas (65). El efecto es bloqueado por los inhibidores actinomicina, amastatina y bestatina, con lo que parece demostrado que el sistema renina-angiotensina-aminopeptidasa juega un papel preponderante en el mecanismo del control central de la presión arterial.

De las aminopeptidasas capaces de hidrolizar a residuos N-terminales de carácter ácido (Aminopeptidasa A; EC 3.4.11.17 y Aspartil aminopeptidasa; EC 3.4.11.1), ya descritas en tejidos periféricos, sólo existe un caso en la literatura donde se describa algo semejante en el SNC. KELLY y colaboradores (66), aislaron en el citosol del cerebro de ratón una aminopeptidasa dirigida específicamente hacia péptidos con residuos amino-terminales ácidos (aspártico y glutámico). El enzima es también capaz de hidrolizar dipéptidos y tripéptidos, aunque su actividad por los sustratos artificiales aspartil y glutamil- β -naftilamida es muy escasa. También lo es para otros sustratos derivados de la β -naftilamina. Las propiedades del enzima son diferentes a la aminopeptidasa A y a la aspartil aminopeptidasa reseñadas previamente.

Aunque no se ha descrito una verdadera oxitocinasa en el SNC, sí puede detectarse actividad hidrolítica sobre el sustrato cistina- β -naftilamida, e incluso actividad de cistinil aminopeptidasa (EC 3.4.11.3). Sin embargo, queda por demostrar si esta actividad no es idéntica a la detectada con el sustrato leucina- β -naftilamida, lo que correspondería a una de las aminopeptidasas previamente descritas (alanil aminopeptidasa soluble y de membrana). Según HOPKINSON y HOOPER (67), la distribución subcelular de oxitocinasa hipotalámica medida con los sustratos cistina- y leucina- β -naftilamida es prácticamente la misma en el SNC del

perro, pero sugiere la posible existencia de una aminopeptidasa específica para oxitocina y vasopresina sensible a los niveles de estrógenos. Curiosamente, según los trabajos de PLISKA y cols. (68), los enzimas que degradan a ambos péptidos se encuentran precisamente en el sitio de almacenamiento y liberación de los mismos y, en cualquier caso, la actividad proteolítica más abundante corresponde a una actividad aminopeptidásica.

La arginil aminopeptidasa lisosomal, también llamada catepsina H (EC 3.4.22.16), es una aminoendopeptidasa poco estudiada a nivel del SNC. Sólo se ha purificado a nivel del cerebro humano y bovino (69) y comprobado que posee propiedades similares al purificado en otros tejidos. Se inhibe por pumomicina y requiere compuestos tiólicos (DTT) para su máxima actividad. Su mejor

sustrato es arginina- β -naftilamida y su pH óptimo es 6.5. Es capaz de hidrolizar los péptidos Leu-encefalina y tuftsin con su actividad aminopeptidásica, y bradikina con su actividad endopeptidásica. Existe cierta similitud entre éste enzima y la aminopeptidasa MI purificada por HERSH en 1981 (32), que hidroliza preferentemente naftilamidas de aminoácidos básicos. Aunque queda por investigar la naturaleza de ambos enzimas, constituyen los dos únicos ejemplos de aminopeptidasas cerebrales no citosólicas con especificidad de sustratos similares a la arginil aminopeptidasa de la fracción soluble.

F. Alba, C. Aguirre, A. Aguilera, M. Ramírez, *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada*

Bibliografía

1. KRIEGER, DT.: «Brain Peptides: What, Where and Why?». *Science*, 1983, 222:975-985.
2. KRISCH, B., and MENTLEIN, R.: *The Peptidergic Neuron*. Birkhäuser Verlag, Basel, 1996.
3. McDERMOTT, JR.; MANTLE, D.; LAUFFART, B.; GIBSON, AM., and BIGGINS, JA.: «Purification and characterization of two soluble Cl-activated arginyl aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptides». *J. Neurochem.*, 1988 50:176-182.
4. HUI, KS., and LAJTHA, A.: «Neuropeptidases. in: Lajtha A. (Dir.). *Handbook of Neurochemistry*, vol. 4. Plenum Publishing Corp. New York. 1-9, 1983.
5. BRECHER, AS.: «The distribution and activity of calf brain peptidases». *J. Neurochem.*, 1963, 10: 1-6.
6. GIBSON, AM.; BIGGINS, JA.; LAUFFART, B.; MANTLE, D., and McDERMOTT, JR.: «Human brain leucyl aminopeptidase: isolation, characterization and specificity against some neuropeptides». *Neuropeptides*, 1991, 19: 163-168.
7. ADAMS, CW. M., and GLENNER, GG.: «Histochemistry of myelin-IV. Aminopeptidase activity in CNS and PNS». *J. Neurochem.*, 1962, 9: 233-239.
8. ELLIS, S.: «A thiol-activated aminopeptidase of the pituitary». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 12: 452-456.
9. ELLIS, S., and PERRY, M.: «Pituitary arylamidases and peptidases». *J. Biol. Chem.*, 1966, 241: 3.679-3.686.
10. MARKS, N.; DATTA, RK., and LAJTHA A.: «Partial resolution of Brain arylamidases and aminopeptidases». *J. Biol. Chem.*, 1968a, 243: 2.882-2.889.
11. MARKS, N.; DATTA, RK., and LAJTHA A.: «The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain». En: Lodin Z. (Dir.). *Macromolecules and the function of the neurone*. Excerpta Medica. Amsterdam. 220-231, 1968b.
12. BECK, CS.; HASINOFF, CW., and SMITH, ME. (1968): «L-Alanyl-L-naphthylamidase in rat spinal cord myelin». *J. Neurochem.*, 1968, 15: 1.297-1.301.
13. BRECHER, AS., and SUSZKIW, JB.: «Purification and characterization of the soluble bovine enzyme». *Biochem. J.*, 1969, 112: 335-342.
14. SUSZKIW, JB., and BRECHER, AS.: «Brain aminoacyl arylamidase. Further purification of the soluble bovine enzyme and studies on substrate specificity and possible active-site residues». *Biochemistry*, 1970, 9: 4.008-4.017.
15. HAYASHI, M., and OSHIMA, K.: «Purification and characterization of arylamidase from monkey brain». *J. Biochem.*, 1977, 81: 631-639.
16. HAYASHI, M.: «Monkey brain arylamidase II. Further characterization and studies on mode of hydrolysis of physiologically active peptides». *J. Biochem.*, 1978, 84: 1.363-1.372.
17. HAMBROOK, JM.; MORGAN, BA.; RANCE, MJ., and SMITH, CF. C.: «Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates». *Nature*, 1976, 262: 782-783.
18. DUPONT, A.; CUSAN, L.; GARON, M., and ALVARADO-URBINA, G.: «Extremely rapid degradation of [³H] methionine-enkephalin by various rat tissues in vivo and in vitro». *Life Sci.*, 1977, 21: 907-914.
19. AUSTEN, BM.; SMYTH, DG., and SNELL, CR.: « γ Endorphin, α endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment». *Nature*, 1977, 269: 619-621.
20. VOGEL, Z., and ALFSTEIN, M.: «The adsorption of enkephalin to porous polystyrene beads: A simple assay for enkephalin hydrolysis». *FEBS Letters*, 1977, 80: 332-336.
21. MARKS, N.; GRYNBAUM, A., and NEIDLE, A.: «On the degradation of enkephalins and endorphins by rat and mouse brain extracts». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 74: 1.552-1.559.
22. SCHNEBLI, HP; PHILLIPS, MA., and BARCLAY, RK.: «Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain». *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 569: 69-98.
23. MILLER, RJ.; CHANG, KJ., and CUATRECASAS, P.: «The metabolic stability of the enkephalins». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 74: 1.311-1.317.
24. SHAW, SG., and COOK, WF.: «The histochemical localisation of aminopeptidases in the central nervous system and an analysis of factors contributing to the final staining pattern». *Histochemistry*, 1979, 63: 145-154.
25. ALBA, F.; ARENAS, J C.; IRIBAR, C., y RAMÍREZ, M.: «Regional distribution of soluble and membrane-bound aminopeptidase activities in rat brain». *Brain Res. Bull.*, 1993, 31: 393-396.
26. GUYON, A.; ROQUES, BP; GUYON, F.; FOUCAULT, A.; PERDRISOT, R.; SWERTS, JP., y SCHWARTZ, JC.: «Further characterisation and kinetics of appearance of hydrolysis products of met-enkephalin». En: Way E. L. (Dir.). *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Pergamon Press. 349-352, 1980.



27. HERSH, LB.: «Nomenclature for enkephalin degrading peptidases». *Life Sci.*, 1986, 38: 1.151-1.153.
28. VOGEL, Z., and ALSTEIN, M.: «Degradation of enkephalin by two brain enzymatic activities». En: Way E. L. (Dir). *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Pergamon Press. London. págs. 353-356, 1980.
29. BARCLAY, RK., and PHILLIPS, MA.: «Inhibition of enkephalin-degrading aminopeptidase activity by certain peptides». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 96: 1.732-1.738.
30. WAGNER, CW.; TAVIANINI, MA.; HERRMANN, KM., and DIXON, JE.: «Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain». *Biochemistry*, 1981, 20: 3.884-3.890.
31. HERSH, LB.; SMITH, TE., and MCKELVY, JE.: «Cleavage of endorphins to des-Tyr endorphins by homogenous bovine brain aminopeptidase». *Nature*, 1980, 286: 160-162.
32. HERSH, LB., and MCKELVY, JE.: «An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin». *J. Neurochem.*, 1981, 36: 171-178.
33. BERG, MJ., and MARKS, N.: «Formation of desTyr dynorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain». *Journal of Neuroscience Research*, 1984, 11: 313-321.
34. CAMARCO, ACM.; RAMALHO-PINTO, FJ., and GREENE, LJ.: «Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones». *J. Neurochem.*, 1972, 19: 37-49.
35. MARTINS, AR.; CALDO, H.; COELHO, HLL.; MOREIRA, AC.; ANTUNES-RODRIGUEZ, J.; GREENE, LJ., and MARTINS DE CAMARCO, AC.: «Screening for rabbit brain neuropeptide-metabolizing peptidases. Inhibition of endopeptidase B by bradykinin potentiating peptide 9a (SQ 20881)». *J. Neurochem.*, 1980, 34: 100-107.
36. HUI, KS.; HUI, MPP, and LAJTHA, A.: «Major rat brain membrane-associated and cytosolic enkephalin-degrading aminopeptidases: comparison studies». *J. Neurosci. Res.*, 1988, 20: 231-240.
37. GIBSON, AM.; McDERMOTT, JR.; LAUFFART, B., and MANTLE, D.: «Specificity of action of human brain alanyl aminopeptidase on Leu-enkephalin and Dynorphin-related peptide». *Neuropeptides*, 1989, 13: 259-262.
38. UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; SUDA, H.; HAMADA, M., and TAKEUCHI, T.: «Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes». *J. Antibiot.*, 1976, 29: 97-99.
39. WRIGHT, J.; SULLIVAN, MJ., and HARDING, JW.: «Dysfunction of central angiotensinergic aminopeptidase activity in spontaneously hypertensive rats». *Neurosci. Lett.*, 1985, 61: 351-356.
40. AOYAGI, T.; TOBE, H.; KOJIMA, E.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T., and UMEZAWA, H.: «Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced in actinomycetes». *Circulation Res.*, 1984, 46: 1.118-1.127.
41. FÉLIX, D., and HARDING, JW.: «Manipulation of aminopeptidase activities: differential effects on iontophoretically applied angiotensins in rat brain». *J. Hipertens.*, 1986, 4: S398-S341.
42. WRIGHT, JW.; QUIRK, WS.; HANEZORTH, JM., and HARDING, JW.: «Influence of aminopeptidase inhibitors on brain angiotensin metabolism and drinking in rats». *Brain Res.*, 1988, 441:215-220.
43. SULLIVAN, MJ.; HARDING, JW., and WRIGHT, JW.: «Differential effects of aminopeptidase inhibitors on angiotensin-induced pressor responses». *Brain Res.*, 1988, 456: 249-253.
44. KNIGHT, M., and KLEE, WA.: «The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy». *J. Biol. Chem.*, 1978, 253: 3.843-3.847.
45. SULLIVAN, S.; AKILL, H.; BLACKER, D., and BARCHAS, JD.: «Enkephalinase: preliminary characterization and comparison with angiotensin converting enzymes». En: Way E. L. (Dir). *Endogenous opiate agonist and antagonists*. Pergamon Press. 357-360, 1980.
46. GORENSTEIN, C., and SNYDER, SH.: «Characterization of enkephalinases». En: Way E. L. (Dir). *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Pergamon Press. New York. 345-348, 1980.
47. HERSH, LB.: «Characterization of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: identification of the enkephalin-degrading aminopeptidase». *J. Neurochem.*, 1985, 44: 1.427-1.435.
48. SHIMAMURA, M.; HAZATO, T., and KATAYAMA, T.: «A membrane-bound aminopeptidase isolated from monkey brain and its action on enkephalin». *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 756: 223-229.
49. HUI, KS.; WANG, YJ., and LAJTHA, A.: «Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain membranes». *Biochemistry*, 1983a, 22: 1.062-1.067.
50. ULRICH, C., and HERSH, LB.: «Degradation of α and β Neo-endorphin by rat membrane peptidases». *Peptides*, 1985, 6: 475-482.
51. HUI, KS.; HUI, M., and LAJTHA, A.: «Properties of a brain membrane aminoenkephalinase: inhibition studies». En: Sun G. Y., Bazan N., Wu J-Y, Porcelatti G. y Sun A. Y. (Dir). *Neural membranes*. The Humana Press. Clifton. New Jersey. Págs. 375-393, 1983b.

52. HUI, KS.; GIOANNINI, T.; HUI, M.; SIMON, E.J., and LAJTHA, A.: «An opiate receptor-associated aminopeptidase that degrades enkephalins». *Neurochem. Res.*, 1985, 10: 1.047-1.058.
53. GROS, C.; GIROS, B., and SCHWARTZ, J.C.: «Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: identification of aminopeptidase M». *Neuropeptides*, 1985a 5: 485-488.
54. GROS, C.; GIROS, B., and SCHWARTZ, J.C.: «Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes». *Biochemistry*, 1985b 24: 2.179-2.185.
55. BAUSBACK, H.H., and WARD, P.E.: «Degradation of low-molecular-weight opioid peptides by vascular plasma membrane aminopeptidase M». *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 882: 437-444.
56. CHURCHILL, L.; H.H. BAUSBACK.; GERRITSEN, M.E., and WARD, P.E.: «Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M». *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, 923: 35-41.
57. HERSH, L.B.; ABOUKHAIR, N., and WATSON, S.: «Immunohistochemical localization of aminopeptidase M in rat brain and periphery: relationship of enzyme localization and enkephalin metabolism». *Peptides*, 1987, 8: 523-532.
58. CHAN, W.W.-C.; DEMMER, W., and BRAND, K.: «Some properties of aminopeptidase associated with rat brain cortical synaptosomes». *Canad. J. Biochem. Cell Biol.*, 1983, 61: 1.185-1.190.
59. GIROS, B.; GROS, C.; SOLHONNE, B., and SCHWARTZ, J.C.: «Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met5)Enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies». *Mol. Pharmacol.*, 1986, 29: 281-287.
60. SCHWARTZ, J.C.; GIROS, B.; GROS, C.; LLORENS, C., and MALFROY, B.: «Metabolism of enkephalins and its inhibition». En: *Proceedings of the IUPHAR 9th international Congress of Pharmacology*. Paton W., Mitchell S. y Turner P. (Dir.), 3, 277-282. McMillan Press Ltd. London, 1984.
61. BARCLAY, R.K., and PHILLIPS, M.A.: «Inhibition of the enzymatic degradation of Leu-enkephalin by puromycin». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 81: 1.119-1.123.
62. VOGEL, Z., and ALTSTEIN, M.: «The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin». *FEBS Letters*, 1979, 98: 44-48.
63. SOLHONNE, B.; GROS, C.; POLLARD, H., and SCHWARTZ, J.C.: «Major localization of aminopeptidase M in rat brain microvessels». *Neuroscience*, 1987, 22: 225-232.
64. SHIMAMURA, M.; HAZATO, T., and IWAGUCHI, T.: «A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction: hydrolysis of enkephalin». *Brain Res.*, 1988, 445: 350-353.
65. WRIGHT, J.W.; AMIR, H.Z.; MURRA, C.E.; ROBERTS, K.A.; HARDING, J.W.; MIZUTANI, S., and WARD, P.E.: «Use of aminopeptidase M as a hypotensive agent in spontaneously hypertensive rats». *Brain Res. Bull.*, 1991, 27: 545-551.
66. KELLY, J.A.; NEIDLE, E.L., and NEIDLE, A.: «An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues». *J. Neurochem.*, 1983, 40: 1.727-1.734.
67. HOPKINSON, C.R., and HOOPER, K.C.: «Peptidase activity in the hypothalamus». *Proc. Natl. Biochem. Soc.*, 1970, 36-37.
68. PLISKA, V.; THORN, N.A., and VILHARDT, H.: «In vitro uptake and breakdown of tritiated lysine-vasopressin by bovine neurohypophyseal and cortical tissue». *Acta Endocrinol.*, 1971, 67: 12-22.
69. AZARYAN, A., and GALOYANA, A.: «Human and bovine brain cathepsin L and cathepsin H: purification, physico-chemical properties, and specificity». *Neurochem. Res.*, 1987, 12: 207-213.

