

Modificaciones de la actividad angiotensinasa de sinaptosomas corticales de ratón por la ingesta crónica de etanol: influencia sobre el sistema renina-angiotensina cerebral

María Dolores Mayas¹, María Jesús Ramírez-Expósito², Manuela Cobo³, Bernardo Camacho³, María Jesús García⁴, Pilar Carrera⁵, José Manuel Martínez-Martos²

RESUMEN

Objetivo: las actividades aspartato aminopeptidasa (AspAP) y glutamato aminopeptidasa (GluAP), denominadas conjuntamente actividad aminopeptidasa A (APA), ejercen actividad angiotensinasa debido a su relación con el metabolismo de las angiotensinas en el sistema renina-angiotensina cerebral (SRAc). Puesto que el alcohol es una droga de abuso que altera diferentes e importantes sistemas neurotransmisores/neuromoduladores, induciendo una amplia variedad de daños neurológicos, el propósito del presente trabajo es analizar la influencia de la ingesta crónica de etanol (15%; 30 días) sobre la actividad APA. **Material y métodos:** la APA se midió en sinaptosomas de corteza frontal de ratón, utilizando aspartato- y glutamato-β-naftilamida como sustratos, en condiciones basales y despolarizantes (K^+ 25 mM), en presencia y ausencia de calcio en el medio de incubación. **Resultados:** mientras que

el etanol disminuye la actividad APA en condiciones despolarizantes en presencia de calcio y en ausencia de calcio en condiciones basales, la despolarización incrementa los niveles de la actividad APA. **Conclusiones:** los resultados ponen de manifiesto la existencia de cambios en la actividad angiotensinasa de la corteza frontal de ratones tras la administración de etanol. Estos cambios estarían relacionados con modificaciones en el metabolismo de las angiotensinas del SRAc, por lo que se podría afirmar que el etanol potencia los efectos en la regulación del flujo sanguíneo local o el balance de fluidos y electrolitos.

Palabras clave: corteza frontal, etanol, sinaptosomas, sistema renina-angiotensina.

MODIFICATIONS ON ANGIOTENSINASE ACTIVITY IN MOUSE FRONTAL CORTEX SYNAPTOSOMES BY CHRONIC ETHANOL INTAKE: INFLUENCE ON REGIONAL BRAIN RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM

ABSTRACT

Objetivo: aspartyl aminopeptidase (AspAP) and glutamyl aminopeptidase (GluAP), named together as aminopeptidase A (APA), exert angiotensinase activity due to its interaction to the metabolism of angiotensins in the regional brain renin-angiotensin system (bRAS). Due to ethanol (EtOH) is a drug of abuse that alters several important neurotransmitter/neuromodulatory systems, inducing a variety of neurological damages, the aim of this work is to study the APA activity Under

Recibido: 1 junio 2007. Aceptado: 18 junio 2007.

¹Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya, Málaga, España. ²Área de Fisiología, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén, España. ³Servicio de Neurología, Complejo Hospitalario de Jaén, España. ⁴Laboratorio Central de Sanidad Animal, Santafé, Granada, España. ⁵Unidad de Fisiología y Nutrición. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, España. Correspondencia: María Dolores Mayas Torres. Laboratorio de Medicina Regenerativa. Fundación IMABIS. Hospital Carlos Haya; Pabellón de Gobierno, Planta Sótano. Avenida Carlos Haya 82, E-29010, Málaga, España E-mail: mariad.mayas.exts@juntadeandalucia.es

chronic ethanol intake (15%; 30 days). *Material y methods:* the APA activity was determined in synaptosomes obtained from the frontal cortex of Mouse using aspartate- and glutamate-naphthylamide as substrates, on basal and K⁺-stimulated conditions, in a Ca²⁺-containing or Ca²⁺-free artificial cerebrospinal fluid (aCSF). *Results:* EtOH inhibits APA activity in K⁺-stimulated conditions in a Ca²⁺-containing or Ca²⁺-free aCSF on basal conditions. Depolarization increases levels of APA activity. *Conclusions:* the results show changes on angiotensinase activity on frontal cortex synaptosomes under chronic EtOH intake. These changes would be related to modifications on the metabolism of bRAS and it could be affirmed that EtOH enhances the effects on cerebral fluids and electrolites homeostasis.

Key words: frontal cortex, ethanol, synaptosomes, renin-angiotensin system.

Los enzimas proteolíticos reguladores (EPR) cerebrales están implicados en la activación y degradación enzimática de diferentes péptidos biológicamente activos¹. Las actividades aspartato aminopeptidasa (AspAP) y glutamato aminopeptidasa (GluAP), denominadas conjuntamente como actividad aminopeptidasa A (APA)^{1,2}, ejercen actividad angiotensinasa debido a su relación con el metabolismo de la angiotensina II (Ang II) en el sistema renina-angiotensina cerebral (SRAc)³⁻⁶. Clásicamente la Ang II se ha considerado como el principal péptido efector del SRA, pero no es el único péptido activo de este sistema. Cada vez son más numerosos los datos que apoyan esta idea de que la Ang II no es el único péptido activo del SRA y que los fragmentos obtenidos de su degradación tienen importantes funciones biológicas⁷, entre las que destaca la Ang III obtenida por acción de las angiotensinasas sobre la Ang II^{7,8}. La APA convierte la Ang II en Ang III^{4,8-10}, ya que elimina el residuo aspartilo N-terminal de la Ang II, regulando a nivel central la presión sanguínea sistémica y la homeostasis de fluidos y electrolitos^{11,12}. Esta función de la Ang II y Ang III es en particular importante en el cerebro debido a que el sistema nervioso es muy sensible a los cambios de la presión sanguínea^{8-10,13}. La APA no sólo tiene función neuromoduladora, sino que también modifica el conjunto de aminoácidos libres a través de la liberación de residuos glutamilos y aspartilos N-terminales, los cuales son activos en el sistema nervioso central (SNC)^{2,14-16}. Por tanto, cambios en la actividades AspAP y/o GluAP pueden contribuir o reflejar modificaciones en la regulación del SRA y/o

el recambio de aminoácidos excitatorios.

El etanol (EtOH) es una droga de abuso que altera diferentes e importantes sistemas neurotransmisores/neuromoduladores, tanto en condiciones agudas como crónicas, induciendo una amplia variedad de daños neurológicos^{17,18}. La acción de estos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores todavía no está clara. El propósito del presente trabajo es analizar la influencia del EtOH sobre las actividades AspAP y GluAP en sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes y en presencia o ausencia de calcio en el medio, para estudiar la posible contribución de estas actividades enzimáticas en la regulación de la presión sanguínea a través del SRA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

En los experimentos realizados en este estudio se han utilizado 78 ratones macho de la variedad Balb/C, con un peso medio de 28.9±6.1 g. Los animales fueron proporcionados por el Estabulario de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén y estuvieron acondicionados con un fotoperiodo día/noche de 12 hs, bajo condiciones constantes de temperatura (20 a 25°C). Se dividieron de forma aleatoria en dos grupos. Un grupo recibió una solución de EtOH al 15% durante 30 días y el otro grupo fue considerado como control. Los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*. Los protocolos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa 86/609/CEE de la Comunidad Europea.

Obtención de la fracción de sinaptosomas

La fracción de sinaptosomas utilizada en los diferentes experimentos realizados en el presente estudio se ha obtenido siguiendo protocolos previamente descritos¹⁹. Brevemente, tras la muerte del animal por decapitación, se extrae el cerebro y se secciona la parte correspondiente a la corteza cerebral. El tejido obtenido, que se mantiene a 4°C durante todo el proceso, se homogeneiza en sacarosa 0.32 M, utilizando un homogeneizador de émbolo de teflón. El homogeneizado obtenido se centrifuga a 2.000 g y se recoge el sobrenadante. Este se centrifuga a 30.000 g. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en sacarosa 0.32 M. Este volumen se añade sobre un gradiente de densidad previamente preparado y se centrifuga a 30.000 g. Tras centrifugar, se elimina el sobrenadante y se recoge el precipitado

que aparece en el centro del gradiente de densidad. El precipitado obtenido, correspondiente a la fracción sinaptosomal, se resuspende en medio de incubación con calcio o libre de calcio (EGTA 2 mM), ajustando el volumen para obtener una concentración final de proteína en la muestra de 0.5 mg/ml. Después, los sinaptosomas se incuban en condiciones basales o tras despolarización con KCl 25 mM en un baño a 37°C durante 15 minutos. Después de este tiempo, se centrifugan a 30.000 g y se resuspenden en el medio de incubación correspondiente para los distintos ensayos. La fracción de sinaptosomas obtenida se verificó mediante técnicas habituales de microscopía electrónica.

Determinación de la actividad específica aminopeptidasa A

Las actividades específicas AspAP y GluAP (APA) se determinaron usando como sustratos aspartilo glutamil- β-naftilamidas (AspNNap o GluNNap), como se ha descrito previamente^{6,20}. Así, se incubaron 20 μl de la fracción sinaptosomal con 50 μl de la solución de sustrato contenido AspNNap o GluNNap 100 μM durante 30 minutos a 37°C. Las reacciones enzimáticas se finalizaron mediante la adición de 50 μl de tampón acetato 0.1 M pH 4.2 que contenía sal Fast Garnet GBC al 2%. La cantidad de β-naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se acopla a la sal GBC, dando un compuesto coloreado que puede determinarse fotométricamente a 550 nm de longitud de onda. La actividad específica APA se expresa en nanomoles de AspNNap o GluNNap hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína, tras usar una curva de β-naftilamina determinada en las mismas condiciones.

Determinación de proteínas totales

Las proteínas fueron analizadas mediante el método de Bradford¹⁶, usando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre grupos, se ha usado el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguida del test de rango múltiple de Newman-Keul's. Todas las comparaciones con P<0.05 se han considerado estadísticamente significativas.

RESULTADOS

El análisis de la ingesta crónica de EtOH sobre la actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón en condiciones basales y en

presencia de calcio en el medio de incubación no muestra modificaciones significativas. Sin embargo, tras la despolarización se observa un incremento significativo (P<0.01) del 17.41% en situaciones control, mientras que en situaciones de ingesta de EtOH la despolarización tampoco produce modificaciones significativas. En condiciones despolarizantes, la ingesta crónica de EtOH produce un descenso significativo (P<0.01) de la actividad específica de AspAP en un 16.86%. Por otro lado, en ausencia de calcio en el medio de incubación el EtOH provoca una disminución significativa (p<0.01) de la actividad específica de AspAP del 42.05%. Sin embargo, la despolarización produce un incremento significativo (P<0.01) del 63.62% en situaciones control. De la misma forma en situaciones de ingesta crónica de EtOH la despolarización provoca un incremento del 180.76% (P<0.01). En condiciones despolarizantes la ingesta crónica de etanol no produce modificaciones significativas de la actividad específica de AspAP (figura 1).

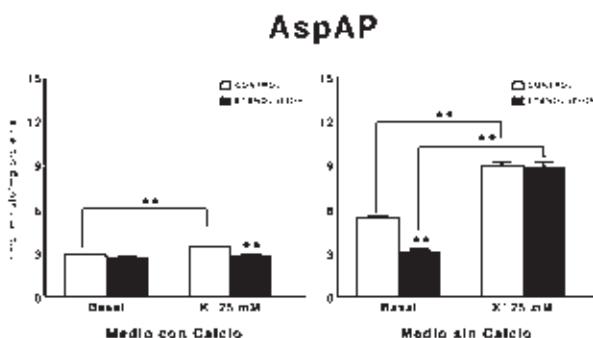


Figura 1. Efecto de la ingesta crónica de etanol (EtOH) sobre la actividad específica aspartato aminopeptidasa (AspAP) de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales y despolarizantes (K⁺ 25 mM) y en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nanomoles de aspartil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramos de proteína (media ± SEM; n=11; **P<0.01).

El análisis de la ingesta crónica de EtOH sobre la actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón en condiciones basales y en presencia de calcio en el medio de incubación no muestra modificaciones significativas. Sin embargo, tras la despolarización se observa un incremento significativo (P<0.01) del 20.24% en situaciones control. Mientras que en situaciones de ingesta de etanol, la despolarización tampoco produce modificaciones significativas. En condiciones despolarizantes, la ingesta crónica de EtOH produce un descenso significativo (P<0.05) de la actividad específica de GluAP en un 11.46%. Por otro lado, en ausencia de calcio en el

medio de incubación el EtOH provoca una disminución significativa ($p<0.01$) de la actividad específica de GluAP del 27.04%, mientras que la despolarización produce un incremento significativo ($P<0.01$) del 55.48% en situaciones control. De la misma forma en situaciones de ingesta crónica de EtOH la despolarización provoca un incremento del 113.74% ($P<0.01$). En condiciones despolarizantes la ingesta crónica de etanol no produce modificaciones significativas de la actividad específica de GluAP (figura 2).

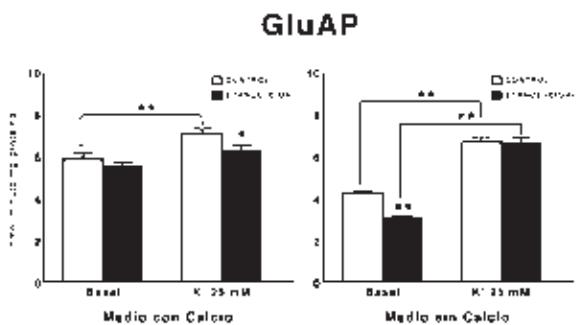


Figura 2. Efecto de la ingesta crónica de etanol (EtOH) sobre la actividad específica glutamato aminopeptidasa (GluAP) de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales y despolarizantes ($K^+ 25 \text{ mM}$) y en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramos de proteína (media \pm SEM; $n=11$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$).

DISCUSIÓN

Varias observaciones se han obtenido de este trabajo. Primera, la capacidad del etanol para modificar de diferente forma las actividades específicas de AspAP y GluAP a nivel de la sinapsis. Tras la administración de alcohol, las actividades AspAP y GluAP sinaptosomales a nivel basal no se modifican en presencia de calcio en el medio, pero ambas se inhiben en ausencia de calcio. Los cambios observados en la actividad AspAP y GluAP pueden deberse a un efecto directo del etanol y/o sus metabolitos sobre estos enzimas o también puede ser la consecuencia de los efectos del etanol en los constituyentes de las membranas sinaptosomales, ya que se ha descrito ampliamente que el etanol aumenta la fluidez de las membranas y cambia su composición lipídica alterando una gran variedad de funciones de las membranas^{21,22}. Además, estudios más recientes han sugerido que la hipótesis primera de que el etanol actúa de una forma no selectiva alterando la microfluidez de las membranas biológicas puede ser verdad sólo con concentraciones superiores a aquellas farmacológicamente activas²³. Quizá, los efectos del etanol se deban a cam-

bios en ciertos receptores de neurotransmisores tales como los NMDA²⁴, los GABA_A²⁵ y los canales iónicos dependientes de voltaje^{26,27}. Pero el etanol también induce la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas no estimulados independientemente de la concentración extrasinap-tosomal de calcio, indicando una redistribución de calcio intracelular²⁸, la cual puede estar relacionada con los efectos moduladores del etanol sobre la actividad AspAP y GluAP.

En segundo lugar, se observa que la estimulación con $K^+ 25 \text{ mM}$ en presencia de calcio induce un incremento de la actividad AspAP y GluAP. Este incremento puede deberse, quizás a un proceso de liberación de los enzimas desde los sinaptosomas al medio de incubación, como previamente habíamos descrito para otras actividades de EPR²⁹. Esto podría indicar que los péptidos activos y los enzimas encargados de su degradación pueden liberarse juntos a la hendidura sináptica para regular la función neurotransmisora/neuromoduladora de estos péptidos. En ausencia de calcio, la actividad AspAP sinaptosomal aumenta de forma notable, mientras que la actividad GluAP se incrementa levemente. Estos cambios pueden ser debidos a la imposibilidad de la AspAP de ser liberada bajo condiciones despolarizantes en un medio libre de calcio, por un mecanismo que no afecta a la GluAP, como puede ser la redistribución intracelular de calcio.

Una tercera observación es que tras la administración de alcohol, tanto la actividad AspAP como GluAP sinaptosomal se inhiben en presencia de calcio, pero no se modifican en ausencia de calcio. A nivel del sobrenadante, tanto la actividad AspAP como la GluAP se inhiben en un medio con calcio, si bien en ausencia de calcio la actividad AspAP se inhibe mientras que la actividad GluAP no se modifica. Se ha demostrado que la adición *in vitro* de etanol a sinaptosomas de rata o ratón inhibe la recaptación de calcio en condiciones despolarizantes sin afectar la recaptación bajo condiciones no despolarizantes. Estos resultados sugieren que los conocidos efectos inhibidores del etanol en la liberación evocada de neurotransmisores pueda ser mediada por la inhibición del flujo de calcio dependiente de la despolarización³⁰. Quizás, el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje en sinaptosomas puede ser responsable de los efectos del etanol sobre las actividades AspAP y GluAP. De hecho, resultados previos de nuestro laboratorio, han sugerido que los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N están implicados en la liberación estimulada por potasio de EPR³¹.

En último lugar, los presentes resultados eviden-

cian cambios importantes en las actividades AspAP y GluAP como consecuencia de la administración de etanol. El SRA, en el que estas dos actividades participan, está implicado en la patogénesis de la hipertensión. Sus principales péptidos bioactivos, la Ang II y III, participan en el incremento de la presión sanguínea de varios modos como son la vasoconstricción directa, la activación del sistema nervioso simpático³², la inhibición sináptica del reflejo baroreceptor a nivel del núcleo del tracto solitario y la liberación de la hormona hipofisaria vasopresina^{33,34}, induciendo un incremento en el apetito de la sal y de la ingesta de bebida^{35,36}. La estimulación de la liberación de vasopresina por Ang II y III es quizás uno de los mecanismos por los que estos péptidos regulan la homeostasis de líquidos y electrolitos bajo condiciones de hipovolemia, mediante la reducción de la pérdida renal de agua e incrementando la presión sanguínea³⁷. El cerebro es en especial sensible a la hipertensión, la cual causa una gran variedad de cambios celulares y vasculares.

Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran en general un efecto inhibidor del etanol sobre las actividades AspAP y GluAP bajo condiciones basales y estimuladas, pudiendo indicar la existencia de altos niveles de Ang II y niveles menores de Ang III, provocando, por tanto, *a priori* un incremento en la presión sanguínea. No obstante, las funciones de la Ang II y Ang III en el control de la presión sanguínea no están claras. La inhibición de la formación de Ang III endógena en el cerebro por la inyección central del inhibidor de la APA denominado EC33 induce un gran descenso de la presión sanguínea de forma dosis-dependiente. También, el bloqueo de la APA por la administración intracerebroventricular de antisuero inhibe la actividad de este enzima y disminuye el incremento de la presión sanguínea inducido por la Ang II en un 59%³⁸. Por tanto, parece ser la Ang III cerebral endógena, pero no la Ang II, como ocurre a nivel periférico, la que ejerce su efecto estimulador en el control de la presión sanguínea¹⁰. Además, la infusión central de APA induce un incremento significativo en la presión sanguínea debido al mayor nivel de producción de Ang III cerebral. Estos estudios muestran evidencias claras de que la Ang III, producida por la acción de APA sobre la Ang II, es el péptido más efectivo del SRA cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulador en el control de la presión sanguínea. No obstante, la similar afinidad de la Ang II y Ang III por los receptores AT1 no explica porque la conversión de la Ang II cerebral a Ang III es un requisito para aumentar la presión sanguínea. Hasta ahora se han dado dos

razones, la primera es que puede haber otros receptores semejantes a los AT1 específicos para la Ang III, con un perfil farmacológico similar al del receptor AT1 y la segunda es que es posible que el bloqueo de la conversión de Ang II a Ang III favorezca la activación de otras rutas metabólicas que inactiven a la Ang II y produzca fragmentos de péptido que no puedan unirse a los receptores AT1 o AT2^{13,39,40}. Pero como indicábamos con anterioridad, la Ang II y la Ang III también estimulan la liberación de vasopresina para controlar la homeostasis de líquidos y electrolitos, reduciendo la pérdida renal de agua e incrementar la presión sanguínea³⁷. La inyección de Ang II o Ang III en los núcleos supraóptico o paraventricular aumenta la actividad de las neuronas magnocelulares productoras de vasopresina induciendo la liberación de vasopresina en la sangre^{33,34}. Sin embargo, la actividad exacta de este péptido no está clara. Mientras que los niveles plasmáticos de vasopresina se duplican por la inyección intracerebroventricular de Ang II, el inhibidor EC33 de la APA inhibe la liberación de vasopresina inducida por Ang II de una forma dosis-dependiente. Esto sugiere de nuevo que la conversión de Ang II a Ang III es un paso necesario para estimular la secreción de vasopresina^{10,34}.

CONCLUSIÓN

El daño cerebral observado tras el consumo de etanol puede no estar exclusivamente relacionado con la regulación de la presión sanguínea, la regulación del flujo sanguíneo local o el balance de fluidos y electrolitos⁴¹.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS) PIO 030922.

REFERENCIAS

1. McKeon UG, O'Connor B. Mammalian pyroglutamyl-peptidase I. In Barret AJ, Rawlings ND, Woesner JF, eds. *Handbook of proteolytic enzymes*. Londres: Academic Press. 1998.
2. McDonald Barret. *Mammalian proteases: a glossary and bibliography*. Academic press London 1986
3. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 643-50.
4. Leung PS. The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Prot Peptide Sci* 2004; 5: 267-73.
5. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the reninangiotensin system – an endocrine and paracrine system. *Endocrinol* 2003; 144: 2179-83.
6. Wang J, Cooper MD. Glutamyl aminopeptidase. En Barret AJ, Rawlings ND, Woesner JF, eds. *Handbook of proteolitic*

- enzymes. Londres. Academic Press. 1998.
7. Chansel D, Ardaillou R. Active metabolites derived from angiotensin II. *Nephrologie* 1998; 19: 427-32.
 8. Ardaillou R. Active fragments of ang II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6: 8-34.
 9. Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and angiotensin III: Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin secretion. *C R Seances Soc Biol Fil* 1998; 192: 607-18.
 10. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P, et al. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13415-20.
 11. Kim S, Iwao H. molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 11-34.
 12. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Oishi M, et al. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2, and AT4 receptors. *J Hypertens* 1998; 16: 2027-37.
 13. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: A central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 157-62.
 14. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-22.
 15. Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Arrazola-Saniger M, Ramírez-Huertas JM. Neurotoxicidad de aminoácidos excitatorios y sistema nervioso central. *Rev Clin Esp* 1996; 196: 113-8.
 16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
 17. Powrozek TA, Sori Y, Singh RP, Zhou FC. Neurotransmitters and substances of abuse: effects on adult neurogenesis. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1: 251-60.
 18. Slawecki JC, Jiménez-Vasquez P, Mathes AA, Ehlers CL. Effect of etanol on brain neuropeptides in adolescent and adult rats. *J Stud Alcohol* 2005; 66: 46-52.
 19. Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Mayas-Torres MD, García-López MJ, Ramírez-Sánchez M. Utility of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay to measure mitochondrial activity in K⁺- and ATP-stimulated rodent cortex synaptosomes. *Neurosci Res Commun* 2000; 27: 103-7.
 20. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Ethanol modifies differently aspartyl- and glutamyl-aminopeptidase activities in Mouse frontal cortex synaptosomes.
 21. Sánchez-Amate MC, Carrasco MP, Zurera JM, Segovia JL, Marco C. Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzyme activities of chick-liver membranes. *Eur J Pharmacol* 1995; 292: 215-21.
 22. Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 1997; 77: 1-20.
 23. Woodward JJ. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem Int* 1999; 35: 93-4.
 24. Wirkner K, Poelchen W, Koles L, Muhlberg K, Scheibler P, Allgaier C, et al. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int* 1999; 35: 153-62.
 25. Grobin AC, Papadeas ST, Morrow AL. Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA_A receptor expression: Potential mechanism. *Neurochem* 2000; 37: 453-61.
 26. Lovinger DM. Alcohols and neurotransmitters gated ion channels: past, present and future. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356: 267-82.
 27. Crews FT, Morrow AL, Criswell H, Breese G. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 1996; 39: 283-367.
 28. Shah J, Pant HC. Spontaneous calcium release induced by ethanol in the isolated rat brain microsomes. *Brain Res* 1988; 474: 94-9.
 29. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Tsuboyama G, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Calcium-dependent modulation by ethanol of mouse sinaptosomal pyroglutamyl aminopeptidase activity under basal and K⁺-stimulated conditions. *Neurosci Lett* 2000; 293: 199-202.
 30. Canda A, Yu BH, Sze PY. Biochemical characterization of ethanol actions on dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1711-8.
 31. Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Tsuboyama G, Prieto I, Aréchaga G, et al. Aminoglycoside antibiotics neomycin and kanamycin inhibit the increase of pyroglutamyl aminopeptidase activity by depolarizing synaptosomes of frontal cortex of the rat. *Rev Neurol* 2000; 30: 1022-6.
 32. Skoog I. A review on blood pressure and ischaemic shite matter lesions. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; 9: 113-19.
 33. Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger T. Angiotensin AT1 receptor mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1995; 275: 277-82.
 34. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 11968-73.
 35. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 1992; 13: 329-80.
 36. Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 1997; 25: 96-124.
 37. Renaud LP, Bourque CW. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 131-69.
 38. Song L, Wilk S, Healy DP. Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II induced dipsogenic and pressor responses. *Brain Res* 1997; 744: 1-6.
 39. Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Buffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: 535-42.
 40. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension* 1997; 30: 535-41.
 41. Mungall BA, Shinkel TA, Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscien* 1995; 67: 505-24.