

Efecto del hipotiroidismo e hipertiroidismo sobre la actividad aminopeptidasa en plasma de ratas

I. PRIETO, A.B. SEGARRA, G. ARECHAGA, J.M. MARTÍNEZ, M.J. RAMÍREZ-EXÓSITO, F. VARGAS^a, F. ALBA^b y M. RAMÍREZ

Área de Fisiología, Universidad de Jaén.

^aDepartamentos de Fisiología y ^bBioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada.

Las alteraciones en la función del tiroides originan importantes cambios en la respuesta cardiovascular, en los que están implicadas modificaciones en el sistema renina-angiotensina circulante (SRA) y otros péptidos vasoactivos. Las actividades aminopeptidasas (AP), a través del control de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH), el SRA y otros péptidos vasoactivos como la vasopresina desempeñan un importante papel en el control de la función del tiroides y de la presión arterial. Con el fin de evaluar el papel de distintas aminopeptidasas plasmáticas en la función tiroidea, determinamos las actividades alanina (AlaAP), cistina (CysAP), piroglutamato (pGluAP), glutamato (GluAP) y aspartato (AspAP) aminopeptidasa, utilizando derivados de la naftilamida como sustratos en animales eu hipo e hipertiroideos. Los resultados demuestran que el hipertiroidismo disminuye significativamente las actividades pGluAP y CysAP, mientras que aumenta la actividad AlaAP. Sin embargo, no se observaron diferencias para las actividades AspAP y GluAP. El hipotiroidismo incrementó significativamente los valores de AlaAP, no observándose diferencias en el resto de las actividades. Los presentes resultados apuntan a un papel preponderante de la actividad AlaAP (AP M) en lugar de la GluAP (AP A) en la regulación del SRA circulante, en modelos animales de hiper e hipotiroidismo.

AMINOPEPTIDASE ACTIVITY AND THYROID FUNCTION IN RATS

Alterations in thyroid function imply important changes in cardiovascular response, in which are also involved modifications in the renin angiotensin system (SRA) and other vasoactive peptides. Aminopeptidase (AP) activity, through the control of thyrotrophin releasing hormone, the SRA and other vasoactive peptides such as vasopressin, plays an important role in thyroid function and blood pressure control. To evaluate the role of AP activities in thyroid function, we determined alanyl- (AlaAP), cystinyl- (CysAP), glutamyl- (GluAP), aspartyl- (AspAP) and pyroglutamyl- (pGluAP) activities using naphthylamide derivatives as substrates in euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid animals. Results demonstrated that hyperthyroidism decreased significantly pGluAP and CysAP, and increased significantly AlaAP. However, no differences were observed for AspAP and GluAP. Hypothyroidism increased significantly AlaAP but no differences were observed in the rest of activities. These results suggest a major role for AlaAP (APM) instead of GluAP (APA) in the regulation of the circulating SRA in animal models of hiper- and hypothyroidism.

Key words: Aminopeptidase. TRH. Renin-angiotensin-aldosterone system. Hypothyroidism. Hyperthyroidism.

Aunque el significado funcional de las aminopeptidasas (AP) aún no es del todo conocido, su actividad hidrolítica cumple un papel importante en la inactivación y regulación hormonal de péptidos activos circulantes o a nivel local tisular¹. La relación entre las AP y las hormonas tiroideas se ha establecido en varios sentidos. En primer lugar, alteraciones en el estado tiroideo afectan a distintos péptidos vasoactivos y diversas AP han demostrado actuar catalizando la biotransformación de estos péptidos². En segundo lugar, la piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) es una de las principales vías para la inactivación del factor liberador de la tirotropina (TRH)³.

El papel de las AP en el control de la presión arterial se ha estudiado esencialmente en relación con su actuación sobre componentes activos del sistema renina-angiotensina (SRA)² y sobre otros péptidos como la vasopresina, cuya función reguladora de la presión arterial y del balance acuoso es ampliamente conocida.

Las AP desempeñan un papel prominente en el metabolismo de las angiotensinas (Ang). Las conversiones hidrolíticas de Ang II a Ang III y de

Correspondencia: Prof. I. Prieto.

Área de Fisiología. Universidad de Jaén. Edificio B3. 23071 Jaén.

Correo electrónico: iprieto@ujaen.es

Palabras clave: Aminopeptidasa. TRH. Sistema renina-angiotensina. Hipotiroidismo. Hipertiroidismo.

Manuscrito recibido el 8-1-2001; aceptado para su publicación el 11-1-2001.

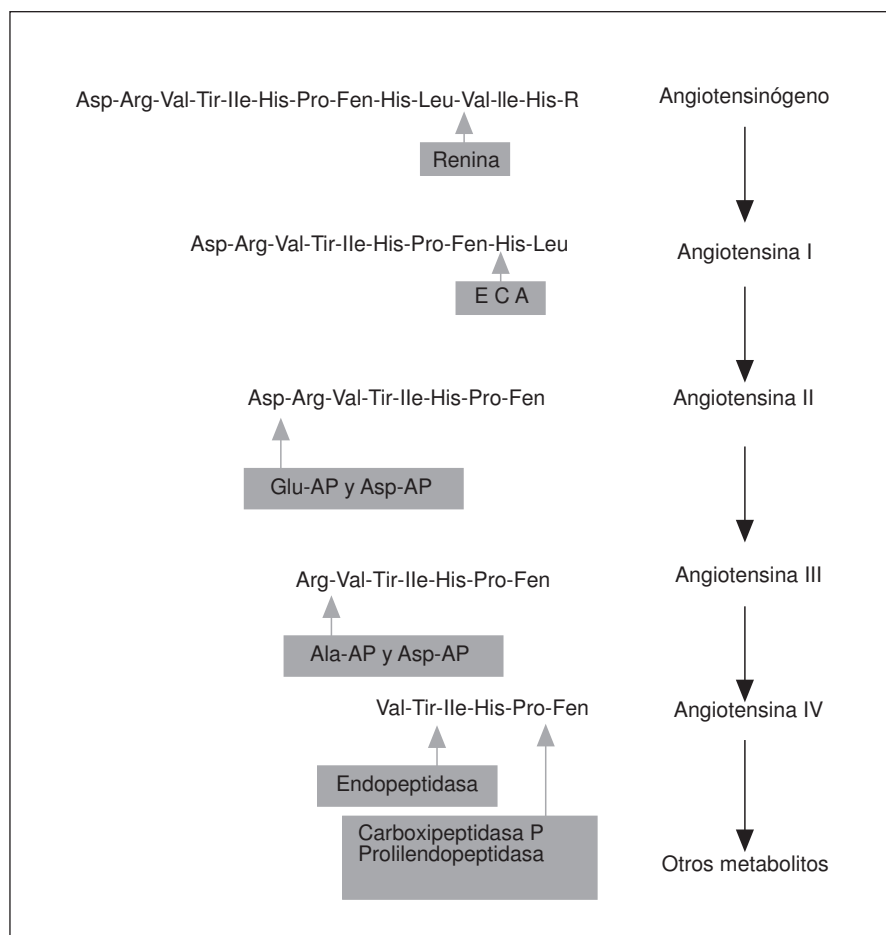


Fig. 1. Enzimas implicadas en la cascada enzimática del sistema renina-angiotensina. Se indica la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del angiotensinógeno, así como la secuencia completa de las angiotensinas I, II, III y IV.

Ang III a Ang IV destacan la importancia del papel regulador de estas enzimas. Así, la actividad de AP A –aspartato aminopeptidasa (AspAP) y glutamato aminopeptidasa (GluAP)– es la causante de la rotura del ácido aspártico a partir de la molécula de Ang II, y la AP M –alanina aminopeptidasa (AlaAP)–, junto a la AP B –arginina aminopeptidasa (ArgAP)–, de la transformación metabólica de Ang III en Ang IV^{4,5} (fig. 1).

Las disfunciones en la glándula tiroides dan lugar a importantes respuestas cardiovasculares en las que se ha demostrado que está implicado el SRA^{6,7}. El hipertiroidismo activa dicho sistema plasmático aumentando los valores de angiotensinógeno, concentración y actividad de renina y, fundamentalmente, cifras de Ang II. El hipotiroidismo, por el contrario, reduce los niveles de angiotensinógeno, Ang II y actividad de renina plasmática, pero sin modificar su concentración⁶.

Los títulos plasmáticos de aldosterona se reducen tanto en el hipertiroidismo como en el hipotiroidismo, aunque mucho más notablemente en este último caso. Así mismo, la densidad de receptores para la Ang II en las glándulas adrenales disminuye con el hipertiroidismo y aumenta de forma acentuada con el hipotiroidismo⁷.

Por otro lado, se ha señalado una posible acción intrahipotalámica de la Ang II sobre la liberación de hormonas hipotalámicas, bloqueando de esta forma la liberación de la hormona estimulante del tiroides (TSH)⁸. Por tanto, la relación entre las angiotensinas y las hormonas tiroideas se establece mediante diversos mecanismos.

La actividad CysAP también se ha implicado en el control de la presión arterial al actuar sobre la vasopresina, cuya función vasopresora y de retención de agua por el riñón es bien conocida. Algunos autores han observado una relación entre la vasopresina y el funcionamiento del tiroides. Por ejemplo, se ha demostrado que la vasopresina puede actuar como factor liberador de la tiotropina⁹. La vasopresina actúa modulando el funcionamiento del sistema hipófisis-tiroides, siendo esta neurohormona posiblemente un estimulador fisiológico de la secreción de TSH y hormonas tiroideas^{10,11}.

Como decíamos al inicio, la TRH se inactiva en parte por acción de la piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP)³ de la que se diferencian una forma soluble (pGluAP I) y una unida a membrana (pGluAP II)¹. La actividad pGluAP I se ha comprobado que es capaz de hidrolizar residuos piroglutámicos N-terminales de varios péptidos, como la TRH, GnRH, neurotensina, bombesina, péptido anorexigénico y sustratos artificiales como la pGlu-β-naftilamida (pGlu-β-NA)¹² (fig. 2).

La actividad pGluAP II adenohipofisaria de rata está estrechamente controlada por hormonas del tiroides, cosa que no ocurre con la actividad pGluAP II cerebral^{13,14}. Esta regulación “específica de tejido” por hormonas tiroideas hace pensar que la pGluAP II podría regular la extensión y duración de la actividad endocrina de la TRH.

Se ha descrito un tercer tipo de actividad pGluAP en suero de mamíferos con características similares a la pGluAP II de membrana y con especificidad de sustrato restringida a la

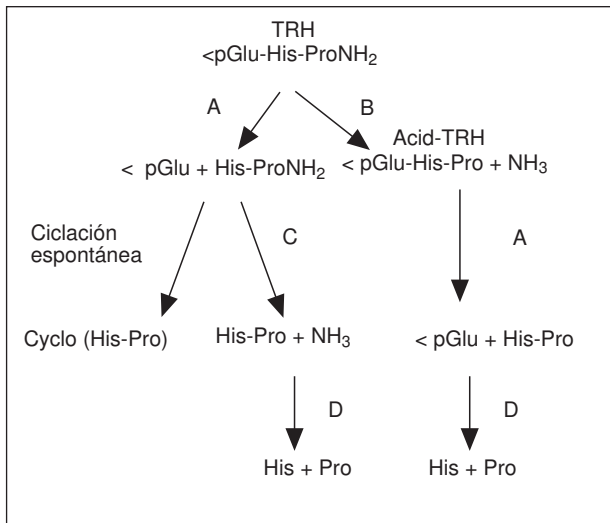


Fig. 2. Vías para la inactivación de la hormona liberadora de la tirotrina (TRH). A: piroglutamato aminopeptidasa; B: prolina endopeptidasa; C: dipeptidil aminopeptidasa A; D: imidopeptidasa. (Modificada de Browne y O'Cuinn¹².)

TRH. Es por ello que a esta actividad sérica se la ha denominado "tiroliberina"^{15,16}. La degradación de TRH por la tiroliberina del suero durante su transporte por la vena porta hipofisaria hasta la hipófisis anterior podría representar un elemento de control en la regulación de la unión de TRH a sus receptores en las células diana. La actividad de esta enzima también es controlada por hormonas del tiroides¹⁷; así, cambios en el desarrollo, que coinciden con importantes cambios en la fisiología del tiroides, alteran la actividad tiroliberina^{18,19}.

El objetivo del presente trabajo ha sido establecer el posible efecto que cambios en el estado tiroideo del animal, bien por inyección de T_4 o por tratamiento con metimazol, podrían ejercer sobre distintas AP relacionadas directamente con las hormonas tiroideas (pGluAP) o con péptidos vasoactivos que sufren alteraciones relacionadas con el funcionamiento del tiroides (AlaAP, GluAP, AspAP y CysAP).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 ratas macho de la raza Wistar con pesos comprendidos entre 180 y 200 g, las cuales fueron divididas en tres grupos: eutiroides (n = 7), hipotiroideas (n = 7) e hipertiroideas (n = 6). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz, humedad y temperatura, y con libre acceso tanto a la comida como al agua.

El hipertiroidismo fue inducido por tratamiento con tiroxina (T_4 , Sigma), inyectada por vía subcutánea a una dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. La hormona se disolvió en una mezcla de suero salino isotónico y NaOH 0,5 N (100: 1 v/v) hasta una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ²⁰. Al grupo de ratas eutiroides (utilizadas como controles) se le inyectó la misma solución, pero sin T_4 . El hipotiroidismo se indujo por administración de metimazol (Sigma) en el agua de bebida al 0,03%²¹.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo durante 6 semanas. Pasado este período de tiempo, los animales se anestesiaron con equitensin (2 ml/kg de peso corporal) y se procedió a la extracción de las muestras de sangre por punción en el ventrículo izquierdo. El cuidado de los animales y su uso experimental en todo momento se ciñeron a las directivas del Consejo de la Comunidad Económica Europea (86/609/EEC).

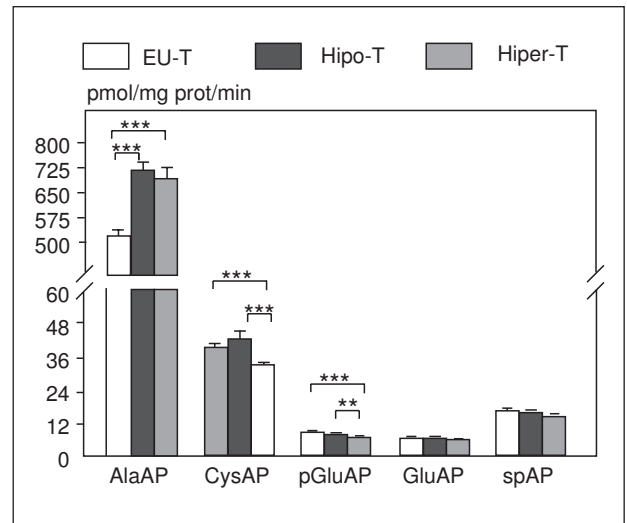


Fig. 3. valores medios \pm error estándar de actividad AlaAP, CysAP, pGluAP, GluAP y AspAP en plasma, expresados como pmol de la Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 5.000 g durante 30 min para obtener el plasma, en el que se determinaron los valores de proteína y las distintas actividades aminopeptidásicas.

Para la determinación de las proteínas se utilizó el método Bradford²², basado en la afinidad de un colorante (Coomassie azul brillante) por las proteínas.

Las actividades enzimáticas de AlaAP y CysAP se midieron fluorimétricamente (espectrofluorímetro LS 50, Perkin-Elmer) utilizando como sustratos L-Ala- β -NA y L-Cys- β -NA (Sigma), de acuerdo con el método de Greenberg²³ modificado por Alba et al²⁴.

La determinación de las actividades GluAP, AspAP y pGluAP se llevó a cabo fluorimétricamente usando L-Glu- β -NA, L-Asp- β -NA y L-pGlu- β -NA (Sigma) como sustratos según los métodos de Tobe et al²⁵ (para GluAP), Cheung y Cushman²⁶ (para AspAP) y Schwabe y McDonald²⁷ (para pGluAP), modificados por Ramírez et al (1997)²⁸.

Previamente se comprobó que todas las actividades enzimáticas fueran lineales frente al tiempo de hidrólisis y al contenido en proteínas de las muestras. La β -naftilamina, liberada en cada caso como resultado de la actividad enzimática, se cuantificó fluorimétricamente a 412 nm de emisión con una excitación de 345 nm.

Los valores de fluorescencia obtenidos se transformaron en nmoles de β -naftilamina liberada, mediante la extrapolación a una recta previamente obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de β -naftilamina. Las actividades AlaAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP se expresaron como pmoles de L-Ala- β -NA, L-Cys- β -NA, L-Glu- β -NA, L-Asp- β -NA o L-pGlu- β -NA, hidrolizados por min y por mg de proteína.

El estudio de las variaciones en la concentración de proteínas y de actividades aminopeptidasas entre los tres grupos de animales se llevó a cabo estableciendo un modelo de análisis de la variancia de una vía (ANOVA I), considerándose como significativos los valores de p inferiores a 0,05. Para las posteriores comparaciones entre medias se utilizó el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos de los resultados se efectuaron con el paquete estadístico Statistical Graphics System (STATGRAPHICS).

RESULTADOS

No se observaron variaciones en el contenido de proteínas plasmáticas en los animales hiper ($4,34 \pm 0,024$ mg/100 μl) o hipotiroideos ($4,27 \pm 0,012$ mg/100 μl) frente a los eutiroides ($4,31 \pm 0,016$ mg/100 μl), pero sí se detectó un ligero aumento ($p < 0,05$) en los animales hipertiroideos frente a los hipotiroideos.

En la figura 3 se presentan los distintos valores plasmáticos medios y sus correspondientes errores estándar obtenidos para las actividades pGluAP, AlaAP, GluAP, AspAP y CysAP, tanto en los animales utilizados como controles (eutiroideos) como en los sometidos a tratamiento con T₄ (hipertiroideos) o metilmazol (hipotiroideos).

El tratamiento con tiroxina dio lugar a una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,001$) del 23% en la actividad pGluAP ($6,5 \pm 0,28$ frente a $8,4 \pm 0,26$ pmol/mg prot/min). El desarrollo del hipotiroidismo no afectó a la actividad degradativa de TRH ($7,9 \pm 0,29$ frente a $8,4 \pm 0,26$ pmol/mg prot/min), pero al compararse los animales hipertiroideos con los hipotiroideos el descenso fue del 17% ($p < 0,01$) ($6,5 \pm 0,28$ frente a $7,9 \pm 0,29$ pmol/mg prot/min).

De las diversas actividades determinadas por su participación dentro del SRA, sólo la AlaAP sufrió variaciones. Encontramos un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) del 36% en los animales hipotiroideos ($716 \pm 27,60$ frente a $525 \pm 14,42$ pmol/mg prot/min) y del 32% en los hipertiroideos ($692 \pm 34,96$ frente a $525 \pm 14,42$ pmol/mg prot/min). Ni la actividad GluAP ($5,8 \pm 0,24$, $6,0 \pm 0,35$ y $5,1 \pm 0,29$ pmol/mg prot/min en los animales eu, hipo e hipertiroideos, respectivamente) ni la actividad AspAP ($15,8 \pm 0,79$, $15,4 \pm 0,46$ y $13,6 \pm 0,88$ pmol/mg prot/min en los animales eu, hipo e hipertiroideos, respectivamente) sufrieron modificaciones tras los tratamientos.

Por último, la actividad CysAP experimentó un descenso del 17% ($p < 0,001$) relacionado con el desarrollo del hipotiroidismo ($32,4 \pm 0,69$ frente a $39,0 \pm 1,05$ pmol/mg prot/min), descenso que alcanzó el 23% ($p < 0,001$) cuando estos animales se comparaban con los hipotiroideos ($32,4 \pm 0,69$ frente a $41,9 \pm 1,86$ pmol/mg prot/min).

DISCUSIÓN

La actividad degradativa de pGlu- β -NA ha demostrado ser activa sobre la TRH y la enzima sérica es controlada por las hormonas tiroideas²⁹. También se ha demostrado que esta actividad en ratas machos se reduce significativamente tras el tratamiento con propiltiouracilo (un agente bociógeno), y que dicha actividad se recupera tras la inyección de hormonas tiroideas³⁰. Nuestros resultados demuestran que la actividad hidrolítica plasmática de pGlu- β -naftilamida disminuye en los animales hipertiroideos cuando se comparan con los eutiroideos o con los hipotiroideos. Sin embargo, el tratamiento con metimazol (un agente bociógeno al igual que el propiltiouracilo) no produce cambios en la actividad frente a los controles.

Es necesario destacar que en los resultados encontrados en la bibliografía se determinó específicamente la actividad pGluAP II, no la pGluAP I, que es la enzima sérica mayoritaria, lo que podría explicar el contraste de estos resultados con los anteriormente citados. Además, la pGluAP I no sólo es activa sobre la TRH, sino también sobre la GnRH¹, y trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la actividad sérica hidrolítica de pGlu- β -naftilamida parece estar más relacionada con la regulación de este péptido que con la de la hormona liberadora de tiroxina³¹.

Por otro lado, se cree que la actividad AlaAP en suero proviene del hígado y está muy aumentada en las enfermedades hepatobiliares. En química clínica su determinación se usa para detectar o confirmar una obstrucción biliar³². Sin embargo, además de su papel diagnóstico, esta enzima desempeña un papel importante en la regulación de hormonas circulantes vasoactivas^{2,5,32}. En los resultados obtenidos en el presente trabajo es interesante resaltar que el efecto tanto

del hipotiroidismo como del hipertiroidismo es el mismo sobre la actividad AlaAP en plasma: un aumento muy significativo de dicha actividad.

Es conocido que las disfunciones de la glándula tiroidea dan lugar a importantes respuestas cardiovasculares en las que está implicado el SRA^{6,7}. El hipertiroidismo activa el sistema renina-angiotensina plasmático aumentando los valores de angiotensinógeno, concentración y actividad de renina y, fundamentalmente, cifras de Ang II. El hipotiroidismo, por el contrario, reduce los títulos de angiotensinógeno, Ang II y actividad de renina plasmática, pero sin modificar su concentración⁶.

Se ha descrito que la AlaAP presenta actividad de aminopeptidasa M (EC 3.4.11.14), una enzima con capacidad angiotensinasa⁷; en concreto, hidroliza la Ang III en Ang IV⁴. Por tanto, los valores aumentados de AlaAP en plasma podrían hacer pensar en una alta actividad angiotensinasa que se correspondería con una modificación de las angiotensinas circulantes.

Por su parte, la actividad GluAP también se ha descrito como angiotensinasa, e intervendría dentro de la cascada renina-angiotensina llevando a cabo la hidrólisis de la Ang II para transformarla en Ang III, péptido biológicamente activo⁴. En nuestros resultados no encontramos variaciones significativas en los títulos de angiotensinasa A (GluAP). Esto, junto con el aumento paralelo de la actividad AlaAP (aminopeptidasa M), podría dar lugar a un descenso de los títulos del péptido Ang III, junto a un desequilibrio en el SRA que podría estar en el origen de los cambios en los valores de PA que aparecen en estos animales. Al mismo tiempo, en los animales hipertiroideos aparecería un aumento en los valores plasmáticos de Ang II⁶, sin que aumentasen los niveles de actividad encargados de su hidrólisis, lo que contribuiría a potenciar sus efectos.

La actividad AspAP, junto con la GluAP, también ha sido definida como angiotensinasa A, ya que su rápida acción sobre los residuos de ácido aspártico N-terminales de los péptidos apunta a una posible función fisiológica en la degradación de la Ang II y su conversión en Ang III (des-Asp-angiotensina II)²⁶. Esta actividad también interviene a otro nivel del SRA, ya que es capaz de actuar sobre la Ang I dando lugar al péptido des-Asp-Ang I¹.

En plasma, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que no hay variaciones en la actividad AspAP, al igual que tampoco las encontrábamos para la GluAP, lo que no apoyaría un papel predominante de la angiotensinasa A en los cambios de la presión arterial que suelen aparecer en los animales hiper e hipotiroideos, y estaría también de acuerdo con la falta de efecto encontrada, en trabajos previos, en distintos modelos de hipertensión^{28,33}. Sin embargo, como se ha indicado, sí observamos cambios en la actividad AlaAP, lo que indicaría que en estas condiciones existe un papel preponderante de la actividad aminopeptidasa M en la regulación del SRA circulante.

Finalmente, nuestros resultados demuestran cambios en la actividad de CysAP, la cual actúa sobre los sustratos oxitocina y vasopresina³⁴. La Ang II es un agente estimulador para la secreción de vasopresina^{10,11}; por tanto, el aumento de Ang II en animales hipertiroideos podría significar un incremento en los valores de vasopresina³⁵, lo que estaría de acuerdo con la disminución de la actividad CysAP que se describe en el presente trabajo.

En resumen, nuestros resultados indican que el estado hormonal del animal, por lo que se refiere a las hormonas de la glándula del tiroides, puede determinar cambios en diversas actividades AP que han demostrado actuar como factores de regulación de distintos péptidos, a su vez con carácter hormonal.

BIBLIOGRAFÍA

1. McDonald JK, Barrett AJ. Mammalian proteases. A glosary and bibliography. Exopeptidases. Londres: Academic Press, 1986; vols. 1-2.
2. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity and regulación of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 643-650.
3. Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem* 1994; 224: 387-396.
4. Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept* 1995; 59: 269-295.
5. Abhold RH, Harding JW. Metabolism of angiotensin II and III by membrane-bound peptidases from rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245: 171-177.
6. Marchant C, Brown L, Sernia C. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 449-455.
7. Asmah BJ, Wan Nazaimon WM, Norazmi K, Tan TT, Khalid BA. Plasma renin and aldosterone in thyroid diseases. *Horm Metab Res* 1997; 29: 580-583.
8. Franci CR, Anselmo-Franci JA, McCann SM. Angiotensinergic neurons physiologically inhibit prolactin, growth hormone and thyroid-stimulating hormone, but not adrenocorticotrophic hormone, release in ovariectomized rats. *Peptides* 1997; 18: 971-976.
9. Whitmall MH, Smallridge RC. Altered thyroid axis function in Lewis rats with genetically defective hypothalamic CRH/VP neurosecretory cells. *Endocr Res* 1997; 23: 365-376.
10. Ciosek J, Stempniak B. The influence of vasopressin or oxytocin on thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones concentrations in blood plasma of euthyroid rats. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 813-823.
11. John TH, George JC, Brown GM. Effects of exogenous arginine vasotocin on circulating levels of thyroid hormones and melatonin in the pigeon, *Columba livia*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995; 112: 345-351.
12. Browne P, O'Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamate aminopeptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur J Biochem* 1983; 137: 75-87.
13. Wilk S. Neuropeptide-specific-peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci* 1986; 39: 1487-1492.
14. Bauer K. Degradation and biological inactivation of TRH: regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988; 70: 69-74.
15. O'Connor B, Cuinn G. Localization of a narrow specificity thiroliberin hydrolizing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 1984; 144: 271-278.
16. O'Connor B, Cuinn G. Purification of and kinetic studies on a synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 1985; 150: 47-52.
17. Emerson CH, Wu CF. Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. *Endocrinology* 1987; 120: 1215-1217.
18. Vigouroux E. Dynamic study of post-natal thyroid function in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976; 83: 752-762.
19. Friedman TC, Yanovski JA, Jayasvasti V, Yanovski SZ, Koenig RJ, Wilk S. Pyroglutamyl peptidase-II ("thyroliberinase") activity in human serum: weight and thyroid status. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1086-1089.
20. García del Río C, Moreno MR, Osuna A, Luna JD, García-Estan J, Vargas F. Role of the renin-angiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 656-660.
21. Sabio JM, Rodríguez-Maresca M, Luna JD, García del Río C, Vargas F. Vascular reactivity to vasoconstrictors in aorta and renal vasculature of hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology* 1994; 49: 257-264.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
23. Greenberg LJ. Fluorimetric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10-14 mole. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 430-435.
24. Alba F, Iribar C, Ramírez M, Arenas C. Un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas cerebrales. *Arch Neurobiol* 1989; 52: 169-173.
25. Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta* 1980; 613: 459-468.
26. Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 1971; 242: 190-193.
27. 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: 1501-1504.
28. Ramírez M, Prieto I, Martínez JM, Vargas F, Alba F. Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension. *Regul Pept* 1997; 72: 155-159.
29. Neary JT, Kieffer JD, Federico P, Malooff F. TRH: development of inactivation system during maturation of the rat. *Science* 1976; 193: 403-405.
30. Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 1995; 136: 3480-3485.
31. Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, De Gasparo M, Hermoso F, Arias JM et al. Sex differences and age-related changes in human serum aminopeptidase A activity. *Clin Chim Acta* 1998; 274: 53-61.
32. Sanderink GJ, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases: a review of the literature. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 795-807.
33. Prieto I, Martínez A, Martínez JM, Ramírez MJ, Vargas F, Alba F et al. Activities of aminopeptidases in a rat saline model of volume hypertension. *Horm Metab Res* 1998; 30: 246-248.
34. Itoh C, Nagamatsu A. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243: 203-208.
35. Vargas F, Baz MJ, Luna JD, Andrade J, Jodar E, Haro JM. Urinary excretion of digoxin-like immunoreactive factor and arginine-vasopressin in hyper- and hypo-thyroid rats. *Clin Sci (Colch)* 1991; 81: 471-476.