

ACCIÓ DE L'HORMONA ALLIBERADORA DE LA TIROTROPINA (TRH) DAMUNT MECANISMES ADRENÈRGICS

T. GUDIOL,¹ E. RODRÍGUEZ I FARRÉ,¹ M. I. SERRANO,²
J. GIBERT I RAHOLA,² E. CUENCA,² F. G. VALDECASAS¹

Des de fa uns quants anys hom sospitava l'existència de substàncies d'origen hipotalàmic amb acció reguladora de les secrecions anterohipofisàries; convencionalment eren denominades «factor d'alliberació» (*releasing factors*). Generalment hom substituïa el terme «factor» pel d'«hormona» tan aviat com aconseguia de determinar-ne l'estructura química. Aquest és el cas de l'hormona alliberadora de la tiotropina hipofisària (TRH: thyrotropin-releasing hormone), coneguda abans com a factor alliberador de la tiotropina (TRF: thyrotropin-releasing factor).

La TRH és un tripèptid: L-pirolglutamil-L-histidil-L-prolinamida (figura 1). Els pèptids aïllats del teixit hipotalàmic d'origen porcí, oví, boví i humà resulten idèntics. A més, l'activitat hormonal disminueix en provocar modificacions en l'estructura indicada.¹ És conegut, tanmateix, un anàleg de síntesi metilat d'activitat específica molt més gran: el N-3-imidazol-metil TRH.²

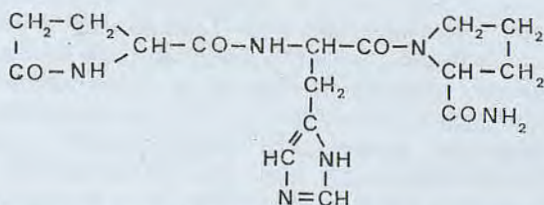


Fig. 1. — Estructura química de la TRH: L-pirolglutamil-L-histidil-L-prolinamida.

Contràriament a allò que hom suposava en els primers treballs, la TRH no es localitza exclusivament, ni tan sols principalment, a l'hipotàlem. Ha estat trobada en diferents proporcions a diverses zones cerebrals. Bé que és l'hipotàlem el que la posseeix en quantitat més gran, si tenim en compte els pesos relatius resulta que la major part de TRH és extrahipotalàmica.

1. Departament de Farmacologia; Institut Nacional de Ciències Biomèdiques del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona-17.

2. Departament de Farmacologia. Facultat de Medicina. Cadix.

No ha estat aïllat l'enzim o el sistema enzimàtic responsable de la seva síntesi, ni hom sap on té lloc aquesta. Hom pot suposar, en principi, que la síntesi es localitza a diverses cèl·lules cerebrals, i que la TRH és transportada seguidament a l'hipotàlem. També, però, hom pot postular la síntesi hipotalàmica i la posterior distribució a les diverses estructures cerebrals. D'altra part, no és conegut el paper que pot desenvolupar la TRH extrahipotalàmica.

L'acció endocrina més coneguda de la TRH, d'on li ve el nom, consisteix a estimular l'alliberament de tiotropina (TSH) per l'anterohipòfisi. La TSH, al seu torn, actua damunt la tiroide, i determina la secreció d'hormones tiroïdals (fig. 2). Aquestes exerceixen un efecte regulador de tipus retroactiu (*feed-back*) a nivell de la resposta hipofisària a l'estímul de la TRH. Aquesta intervé també en la síntesi de la TRH a més d'intervenir en la seva alliberació. La seva acció resulta inhibida per les hormones tiroïdals, principalment per la triiodotironina, i també per la L-DOPA i per l'hormona del creixement.^{3, 4}

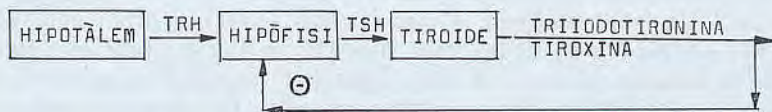


FIG. 2.— Interaccions entre TRH, TSH i hormones tiroïdals.

Un altre efecte fisiològic típic de la TRH és de provocar l'elevació dels nivells circulants de prolactina. La inhibició d'aquest efecte exigeix dosis molt més grans de triiodotironina o de tiroxina que no pas en el cas d'inhibició de la secreció de TSH. El mecanisme d'alliberament de prolactina per mitjà de TRH podria resultar tant d'una acció directa damunt la hipòfisi, com d'una inhibició de la PIH (*prolactine inhibitory hormone*) o hormona inhibidora de la producció de prolactina, d'origen hipotalàmic.

La inactivació de la TRH es produeix amb una gran intensitat en el plasma humà *in vitro*. Es tracta, segons que sembla, d'una desamidació enzimàtica de la resta de prolinamida terminal. D'altra part, una petita proporció s'elimina immodificada per l'orina.⁵

Fins ara, l'aplicació principal de la TRH en terapèutica ha estat com a antidepressiu. Es caracteritza per l'acció ràpida, en contrast amb la lentitud dels antidepressius usuals. Bé que han estat obtingudes bones respostes en la depressió primària unipolar, especialment en dones,⁶ els resultats globals observats són inconstants i a voltes passatgers, i no manquen autors que neguen l'eficàcia de la TRH com a psicofàrmac.^{7, 11} Hom ha especulat amb la possibilitat que els resultats contradictoris

obtinguts pels diversos investigadors siguin deguts a la notable heterogeneïtat de les dosis emprades, que oscillen entre 2 mg i 100 mg diaris per via oral, i entre 0,5 mg i 1,2 mg diaris per via intravenosa. D'altra banda, la gran disparitat en els resultats terapèutics pot també ésser relacionada amb la complexitat clínica de les síndromes depressives. Efectivament, quadres clínics similars poden cursar amb alteracions bioquímiques diferents, i hom arriba a proposar amb finalitats terapèutiques una classificació o tipologia bioquímica de la depressió.¹² Cal tenir també present, en relació amb l'efecte de la TRH, la implicació de disfuncions hipotalàmiques en els trastorns afectius.

En subjectes normals, la TRH administrada i.v. a dosis antidepressives determina l'aparició d'un estat eufòric durant diverses hores.⁶

Per a l'esclariment dels processos bioquímics implicats en els efectes psicoestimulants i antidepressius, hom ha assajat d'establir una relació amb els mecanismes d'actuació ja descrits per als antidepressius clàssics, tant els inhibidors de la monoamino-oxidasa (IMAO) com els del grup tricíclic. Amb aquesta finalitat han estat duts a terme experiments encaminats a detectar possibles variacions en el metabolisme de les catecolamines induïdes per la TRH.

Alguns resultats suggereixen un increment del metabolisme cerebral de la noradrenalina, i també de l'alliberament d'aquesta, amb l'augment consegüent de la seva concentració a nivell dels receptors específics cerebrals.^{13, 14} L'efecte antidepressiu estaria aleshores relacionat amb aquesta acció, semblantment als IMAO i imipramínics, que per diversos mecanismes afavoreixen l'augment del nivell de noradrenalina disponible pels receptors específics. Així, la TRH augmentaria la síntesi de noradrenalina cerebral, amb l'augment consegüent d'alliberament; el nivell endogen no variaria, però sí el catabolisme, que quedaria reflectit en l'increment de les taxes cerebrals de MOPEG (3-metoxi-4-hidroxifenil-etilene-glicol), que n'és el principal metabòlit. Tanmateix aquest augment del recanvi de la noradrenalina induït per la TRH no és acceptat per tots els autors, i han estat comunicats resultats contraris als anteriors.¹⁵

En treballs previs ha estat mostrat un efecte directe de la TRH damunt els mecanismes adrenèrgics perifèrics.^{16, 20} Les accions observades ens han menat a precisar-ne el mode d'acció. En el present treball estudiem la interacció de la TRH amb la noradrenalina a nivell perifèric, a fi d'establir una comparació més precisa entre el perfil farmacològic de la TRH i el de la resta d'antidepressius. Aquest estudi facilitarà una més gran informació sobre els seus mecanismes d'actuació a nivell fisiològic i bioquímic, tot establint, si és possible, una base racional més sòlida per a les aplicacions terapèutiques.

En efecte, tant els IMAO com els antidepressius tricíclics potencien l'acció de la noradrenalina en estructures perifèriques aïllades. En rea-

litat, en el cas dels imipramínics l'efecte és bifàsic, puix que si hom utilitza dosis molt altes s'inverteix l'efecte potenciador observat a dosis petites.²¹

Com a reactiu biològic hem emprat el conducte deferent aïllat de rata. Aquest òrgan presenta una considerable innervació simpàtica en relació amb la seva petita massa, la qual cosa determina una notable reactivitat a les catecolamines, amb resultats relativament constants si és manejat adequadament. Per això n'és recomanat l'ús i és emprat freqüentment en experiències relacionades amb la transmissió adrenèrgica, psicofàrmacs, etc.²²

La utilització del conducte deferent en l'estudi de psicofàrmacs ha d'ésser considerada en tot cas com un model farmacològic. En efecte, bé que els resultats obtinguts no poden ésser extrapolats al sistema nerviós central, permeten d'obtenir una valuosa informació sobre les accions dels fàrmacs a nivell de la terminació nerviosa adrenèrgica. Com que en uns aspectes determinats la terminació adrenèrgica perifèrica funciona com la central, els resultats a nivell d'un model simple com és ara el que hem utilitzat —en el qual poden ésser controlades totes les variables— permeten de plantejar les hipòtesis per a una investigació orientada a nivell central.

MATERIAL I MÈTODES. — Els efectes de la TRH damunt la transmissió nerviosa adrenèrgica en el conducte deferent han estat estudiats a diferents nivells. Des d'un punt de vista fisio-farmacològic hom n'ha considerat l'efecte sobre l'acció contracturant de la fibra llisa produïda per la noradrenalina. A nivell bioquímic ha estat investigada la possible acció inhibidora de la monoamino-oxidasa i els efectes sobre la captació i l'emmagatzematge de noradrenalina per part del teixit.

I. *Estudi de l'efecte de la TRH damunt la resposta a la noradrenalina:* Han estat utilitzades rates mascles Wistar de 300 a 350 g de pes, a les quals han estat extrets els conductes deferents un cop sacrificades per decapitació.

El líquid nutrici emprat és Krebs bicarbonat, de la composició següent: ClNa 117,9 mM, ClK 4,7 mM, Cl₂Ca 1,9 mM, PO₄H₂K 1,1 mM, SO₄Mg 1,1 mM, CO₃HNa 25 mM i glucosa 11,6 mM.

Ha estat utilitzat un bany termostàtic convencional. El registre de les contraccions del deferent ha estat damunt paper fumat mitjançant una placa inscriptora, en un quimògraf Jaquet. En tot moment es bombolleja el bany amb carbogen (95 % de O₂ i 5 % de CO₂). La temperatura del bany ha estat mantinguda constant a 30° C.

Després d'un període de 45 minuts d'estabilització del deferent ja muntat, hem anat afegint als 20 ml del bany dosis creixents de bitartrat de L-noradrenalina (REARGON, SCHERING), dissoltes cadascuna en 1 ml de solució de Krebs. Cada dosi és afegida quan s'ha arribat al màxim

de contracció determinada per l'anterior. Les concentracions obtingudes en el bany són: 2,4 - 4,7 - 9,5 - 19 - 37,9 - 75,5 - 151,5 - 303×10^{-7} M. La concentració de L-noradrenalina en el bany a cada moment és la suma de totes les addicionades fins aleshores. En afegir-hi la darrera dosi hom obté la concentració maximal. Per tal de confirmar-la se n'hi afegeix una altra de doble concentració.

Un cop comprovada la maximal, es renta el deferent, tot buidant i omplint ràpidament quatre vegades el vas del bany. A continuació hom deixa el deferent en repòs durant 15 o 30 minuts, segons les experiències. Un cop passat aquest temps es repeteix l'addició de dosis acumulatives exactament igual com abans. En total cal fer 3 o 4 corbes consecutives, amb l'objecte de tenir respostes constants, i es rebutja el deferent en cas que això no sigui aconseguit.

Després dels rentats consecutius a la darrera corba, hom incuba *in situ* el deferent amb la solució de TRH (Prem) en líquid de Krebs, durant 15 o 30 minuts segons els casos, però sempre coincidint amb el temps de repòs emprat en les anteriors corbes sense TRH. La concentració d'aquesta darrera és variable en les diverses experiències. S'ha treballat amb 3,5 - 7 - 14 - 25,7 - 55 i 110 μ M. En aquestes condicions hom efectua una nova corba de dosis acumulatives de noradrenalina, afegides damunt el bany que conté la TRH.

Per calcular els resultats hom mesura la distància en mil·límetres entre la línia basal i el punt de màxima contracció obtingut per a cada dosi de noradrenalina. El valor de la maximal és considerat 100 %, i els altres resultats s'expressen en % de la contracció maximal.

En cada deferent hom calcula només la darrera corba obtinguda abans d'incubar amb TRH. Aquests resultats es consideren com a controls. Amb la corba en presència de la TRH hom opera anàlogament. En aquest cas, però, les distàncies mesurades són expressades en percentatges de la maximal corresponent a la corba considerada com a control, del mateix deferent.

II. *Estudi de l'efecte de la TRH damunt la monoamino-oxidasa (MAO)*: Per tal de valorar l'activitat MAO del conducte deferent ha estat emprada la tècnica de Krajl.²³ Aquest mètode es basa en el fet d'emprar flinuramina com a substrat de la MAO. Per desaminació oxidativa es produeix un aldehid intermedi que, en ciclar-se, forma 4-hidroxiquinoleïna (4-OHQ), substància fluorescent. Per a determinar la quantitat de 4-OHQ formada ha estat emprat un espectrofotofluorímetre Aminco Bowman, excitant a 315 i llegint l'emissió a 380 nm.

Els animals utilitzats són del mateix tipus que els que hem descrit a l'apartat anterior. Un cop sacrificats, se n'extreuen els conductes deferents i es pesen ràpidament, i a continuació hom els col·loca en solució de Krebs a 30° C durant 45 minuts, amb bombolleig de carbogen, a fi

de reproduir les condicions d'estabilització del mètode anterior. A continuació el deferent és homogeneïtzat en aigua destil·lada (100 ml per gram d'organ) amb un aparell TRI-R, bo i mantenint el tub en fred. A 1 ml de l'homogeneïtzat hom hi afegeix 0,5 ml de tampó fosfat 0,5 M a pH 7,4, i 0,5 ml d'una solució de 200 µg/ml de kinuramina en aigua destil·lada, i es completa fins a 3 ml amb aigua destil·lada. S'incuba a 37° C durant 30 minuts. Després hom hi afegeix 2 ml d'àcid tricloroacètic al 10 %, i es centrifuga durant 10 minuts a 2.500 - 3.000 r.p.m. per tal d'eliminar les proteïnes. A 1 ml del sobrenedant, hom hi addiciona 2 ml de NaOH 1 N, justament en el moment de dur a terme la lectura de la fluorescència.

Al resultat han d'ésser-li sotretes les mesures de dos blancs diferents: l'extern, al qual no ha estat afegit homogeneïtzat, i l'anomenat blanc de teixit, el qual, tenint homogeneïtzat, manca de kinuramina. Per la resta, ambdós segueixen els mateixos passos del problema, i el component de què manquen és substituït pel volum corresponent d'aigua destil·lada.

La fluorescència corregida és transformada en concentració de 4-OHQ mitjançant una corba patró establerta amb aquesta substància.

Els resultats són expressats en µmols de 4-OHQ formats per incubació d'1 g de deferent durant 1 hora.

De cada rata prenem un deferent com a control, tot operant tal com ja ha estat indicat. L'altre deferent de la mateixa rata és manipulat d'una manera semblant, però la incubació és feta en presència de TRH a les mateixes concentracions que hem utilitzat per als assaigs de contracció del deferent, és a dir: 7 - 14 - 27,5 - 55 i 110 µM, segons els casos.

III. *Estudi de l'efecte de la TRH damunt la captació i l'emmagatzematge de noradrenalina:* En un grup d'experiències han estat considerats els efectes de la TRH damunt la captació i l'emmagatzematge de la noradrenalina pel conducte deferent aïllat de rata. La finalitat d'aquestes experiències és d'intentar d'establir una relació entre els efectes de la TRH damunt la contracció determinada per la noradrenalina i la captació i emmagatzematge d'aquesta, per tal de dur a terme una aproximació als mecanismes d'acció de l'hormona.

Han estat utilitzades per a les experiències de captació i d'emmagatzematge 120 rates mascles Sprague-Dawley de 225-250 g de pes. Els animals foren decapitats, i els conductes deferents extrets, pesats i mantinguts a 30° C durant 30 minuts, per a estabilització, en líquid de Krebs bicarbonat de la composició següent: C1Na 117,9 mM, C1K 4,7 mM, C12Ca 2,5 mM, PO₄H₂K 1,1 mM, SO₄Mg 1,1 mM, CO₃HNa 25 mM, glucosa 10 mM i, com a reductor, 5,2 mM de S₂O₅Na₂.

La solució fou airejada contínuament. En totes les experiències el deferent control procedia del mateix animal que el tractat. A la ma-

joria de les experiències el deferent dret fou emprat com a control i l'esquerre com a tractat, tret d'un grup d'experiments duts a terme a fi d'observar la possible diferència d'efecte entre ambdós deferents.

ESTUDI DE LA CAPTACIÓ.— a) *Acció de la TRH damunt la captació de noradrenalina com a funció del temps d'incubació*: Hom addiciona al medi de manteniment dels deferents 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (7 μM) de TRH —dosi que produeix la màxima potenciació dels efectes de la noradrenalina (vegeu figures 3 i 4)— i hom continua incubant-ho a 30° C durant 30 minuts, amb agitació suau. Els deferents controls segueixen el mateix procés d'incubació en absència de TRH. Un cop transcorregut aquest temps, hom afegeix a tots els deferents —controls i tractats— 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-noradrenalina- ^3H (The Radiochemical Centre, Amersham) de 10,3 Ci/mM d'activitat específica. Per tal d'assolir una concentració de noradrenalina en el medi propera a la DE50 (dosi efectiva 50, vegeu figures 3 i 4), hom hi afegeix ensems 0,627 $\mu\text{g/ml}$ (3,7 μM) de L-noradrenalina (en forma de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de d-bitartrat de L-noradrenalina, Fluka).

Un cop addicionada la noradrenalina, continua la incubació durant temps compresos entre 1 minut i 11 minuts, i hom procedeix a continuació a determinar la radioactivitat captada per l'òrgan segons el mètode que descrivim més endavant.

Una altra sèrie d'experiències fou duta a terme amb 1 $\mu\text{g/ml}$ de L-noradrenalina amb 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-noradrenalina- ^3H (8,1 Ci/mM), amb temps compresos entre 10 minuts i 18 minuts.

Ha estat també estudiada la influència damunt la captació de noradrenalina del temps d'incubació amb TRH solament, considerant l'administració simultània de TRH i noradrenalina, la incubació durant 15 minuts i la de 30 minuts abans esmentada. La noradrenalina captada fou determinada en aquests casos 5 minuts després de l'addició al medi.

b) *Acció de la TRH damunt la captació de noradrenalina com a funció de la concentració de noradrenalina en el medi*: Finalitzada la incubació dels deferents controls i dels tractats amb 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de TRH, hom addiciona en aquesta sèrie d'experiències concentracions variables de L-noradrenalina, compreses entre 0,021 i 10 $\mu\text{g/ml}$. En tots els casos hom hi afegeix, juntament a la L-noradrenalina, 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de L-noradrenalina- ^3H de 8,1 Ci/mM, tret de les concentracions de 0,455 i 0,625 $\mu\text{g/ml}$ en què la noradrenalina- ^3H és de 10,9 Ci/mM. Al cap de 5 minuts d'haver-hi afegit la noradrenalina es detura la incubació i es determina la radioactivitat captada.

En una sèrie d'experiències ha estat estudiada també l'acció de 5 $\mu\text{g/ml}$ de TRH damunt la captació de 1 $\mu\text{g/ml}$ de L-noradrenalina, segons el procediment descrit.

ESTUDI SIMULTANI DE L'EMMAGATZEMATGE I DE LA CAPTACIÓ. —
a) *Acció de la TRH damunt l'emmagatzematge i la captació de la noradrenalina com a funció del temps:* Després dels 30 minuts d'estabilització, hom procedí a carregar els dipòsits d'emmagatzematge de noradrenalina mitjançant l'addició al medi d'un excés de L-noradrenalina. Amb aquesta finalitat hi foren afegits 12,5 µg/ml de L-noradrenalina que contenen 0,132 µCi/ml de L-noradrenalina-¹⁴C de 57 mCi/mM (The Radiochemical Centre, Amersham). Amb aquesta concentració hom incubà durant 15 minuts, i procedí a rentar tres vegades amb intervals d'1 minut, amb el líquid de Krebs, per tal d'eliminar l'excés de noradrenalina i l'afegida extracel·lularment. D'aquesta manera, part de l'adrenalina marcada s'incorpora als dipòsits i es comporta com la noradrenalina endògena que hi és emmagatzemada. Tot seguit hom afegeix al medi 2,5 µg/ml de TRH i s'incuba durant 15 minuts. Els deferents controls segueixen el mateix procés en absència de TRH.

A continuació hom estudia la captació de noradrenalina tot afegint al medi 1,25 µg/ml de L-noradrenalina contenant 1 µCi/ml de L-noradrenalina-³H de 10,3 Ci/mM.

La utilització de noradrenalina marcada amb ¹⁴C primer i amb ³H després permet de diferenciar ambdues noradrenalines i caracteritzar sobre el mateix deferent la fase d'emmagatzematge i la de captació.

Al cap de 6, 10 i 15 minuts finalitza la incubació de la segona noradrenalina i hom procedeix a la determinació de la radioactivitat procedent de cada isòtop utilitzat.

Per tal d'obviar un possible efecte isotòpic en el fenomen d'emmagatzematge i de captació, hom duugué a terme una altra sèrie d'experiències bo i carregant els dipòsits amb L-noradrenalina-³H (12,5 µg/1 µCi/ml) i estudiant la captació amb L-noradrenalina-¹⁴C (1,25 µg/0,132 µCi/ml).

b) *Acció de la TRH damunt l'emmagatzematge i la captació de la noradrenalina en una seqüència d'administració de la noradrenalina a dosis acumulatives:* Per tal d'estudiar l'acció de la TRH damunt l'emmagatzematge i la captació en condicions com més aproximades millor a les descrites per a les corbes dosi-efecte, hom procedí de la manera següent: Finalitzada l'estabilització de 30 minuts, hom afegí al medi L-noradrenalina-³H, completada amb la quantitat de L-noradrenalina necessària, en una seqüència acumulativa similar a la descrita per a les corbes dosi-efecte. Les dosis afegides, separades 1 minut l'una de l'altra, són: 0,04 - 0,08 - 0,16 - 0,32 - 0,64 - 1,28 - 2,56 - 3,84 µg/ml de L-noradrenalina, contenant 2,15 - 4,3 - 8,6 - 17,2 - 34,4 - 68,8 - 138 - 206 µCi/ml de L-noradrenalina-³H de 10,3 Ci/mM. La concentració acumulada final és de 8,92 µg/ml contenant 0,479 µCi/ml.

Un minut després de la darrera dosi es renta tres vegades el deferent, es deixa en repòs 15 minuts i es repeteix la seqüència d'adminis-

tració acumulativa descrita dos cops més. Després del rentats corresponents a la darrera dosi de càrrega, hom afegeix la TRH (2,5 µg/ml) i s'incuba 15 minuts. Els controls segueixen el mateix procés en absència de TRH. Un cop passat aquest temps, hom hi addiciona L-noradrenalina-¹⁴C de 57 mCi/mM, amb la quantitat de L-noradrenalina necessària, en una seqüència de temps i de dosis idèntica a la descrita per a la càrrega. Les concentracions de noradrenalina afegides contenen en aquest cas 0,54 - 1,08 - 2,16 - 4,32 - 8,64 - 17,3 - 34,6 - 51,9 nCi/ml respectivament, i la concentració acumulada final és de 8,92 µg/ml contenint 0,12 µCi/ml.

Un cop finalitzada la seqüència acumulativa (1 vegada) de captació, hom procedeix a la determinació d'ambdós isòtops.

DETERMINACIÓ DE LA RADIOACTIVITAT. — Per tal de determinar la radioactivitat present en els deferents hom procedeix primerament a rentar-los, un cop finalitzada la incubació. A continuació s'assequen i es digereixen en 0,5 ml d'una mescla a parts iguals d'àcid perclòric 70 % i d'aigua oxigenada 30 %.²⁴ La digestió és duta a terme a temperatura ambient, durant 48 minuts i a les fosques, i hom obté una solució transparent i sense partícules. Una alíquota de 300 µl del digerit s'afegeix a 15 ml del líquid de centelleig de la composició següent: PPO 4 g, dimetil-POPOP 0,1 g, toluè 1.000 ml, etanol absolut 500 ml.

La radioactivitat es determina en un espectròmetre de centelleig líquid (Beckman LS-250). Per als deferents en què fou estudiat l'emmagatzematge i la captació amb noradrenalina ³H i ¹⁴C simultàniament hom reglè l'espectròmetre per comptar la radioactivitat pel mètode del doble marcatge i diferenciar així la noradrenalina emmagatzemada de la captada. Els cpm foren transformats en dpm pel mètode del patró extern.

S'han efectuat blancs reactius, que consisteixen en deferents que passen per tot el procés però als quals no els és addicionada noradrenalina reactiva.

MÈTODES ESTADÍSTICS. — La significació estadística entre deferents tractats i no tractats fou duta a terme mitjançant la prova t de Student (bimarginal).

Per tal d'obviar la variabilitat biològica de la captació i tenint en compte que en cada experiència el deferent tractat es compara amb el control procedent del mateix animal, fou aplicada la prova t per a dades aparellades.²⁵ També, i per tal de poder estudiar la significació de tractats enfront de controls en tots els casos, fou considerada la modificació percentual en els tractats enfront dels respectius controls considerats 100, i fou aplicada la prova t per a dades aparellades (bimarginal). Hom dugué a terme també, aplicant aquesta prova, l'anàlisi de significació entre controls esquerres i drets i entre tractats i control encreuats.

RESULTATS. — I. *Efecte de la TRH damunt la resposta a la noradrenalina*: Els resultats obtinguts mostren un clar efecte bifàsic de potenciació i d'inhibició de la resposta del conducte deferent a la noradrenalina, dependent de la concentració de TRH. Així, quan hom opera amb concentracions 3,5 - 7 - 14 o 27,5 μ M de TRH obté una clara potenciació de la contracció provocada per la noradrenalina. La potenciació més marcada s'observa amb una concentració 7 μ M de TRH. Per contra, la resposta a la noradrenalina és menor que en els controls (inhibició) quan hom treballa amb concentracions 55 o 110 μ M de TRH, especialment amb aquesta darrera.

Els resultats més destacats són expressats gràficament per mitjà de corbes dosi-efecte, de les quals unes corresponen a 15 minuts (fig. 3) i unes altres a 30 minuts (fig. 4) d'incubació amb TRH. S'hi aprecia notablement l'esmentat efecte bifàsic: la corba dosi-efecte de la noradrenalina en presència de la concentració més potenciadora de TRH (7 μ M) resta considerablement desplaçada cap a l'esquerra de la corba control, tant a 15 minuts com a 30. Inversament, el desplaçament és cap a la dreta en presència de les concentracions 55 i 110 μ M de TRH, també en ambdós temps.

A les figures 3 i 4 hom indica el nombre d'experiències i els nivells de significació estadística de cada punt, i les diferències entre tractats i controls són altament significatives a la majoria dels casos.

Comparant els resultats obtinguts a 15 minuts i a 30 minuts d'incubació amb TRH, hom ha trobat que en alguns punts no hi ha diferències significatives entre ambdós temps. Tanmateix, per a la majoria dels punts no tan sols n'hi ha, sinó que les diferències respecte als controls solen ésser més marcades amb 30 minuts d'incubació, tant per a la potenciació com per a la inhibició.

II. *Efecte de la TRH damunt la monoamino-oxidasa (MAO)*: Els resultats obtinguts són presentats a la taula I, classificats segons les diferents concentracions de TRH estudiades.

La comparació de cada grup de deferents tractats amb llur control corresponent dona diferències no significatives a tots els casos. No és possible, per tant, de detectar cap mena d'acció de la TRH com a inhibidora de la MAO.

III. *Efecte de la TRH damunt la captació i l'emmagatzematge de noradrenalina*.

ESTUDI DE LA CAPTACIÓ. — a) Acció de la TRH damunt la captació de la noradrenalina com a funció del temps d'incubació: A la figura 5 és representada l'acció de la TRH damunt la captació de noradrenalina pel conducte deferent com a funció del temps d'incubació amb aquesta. A tots els punts, menys a 1 minut, la captació en presència de la TRH és lleugerament superior (2-5 %) a la dels controls.

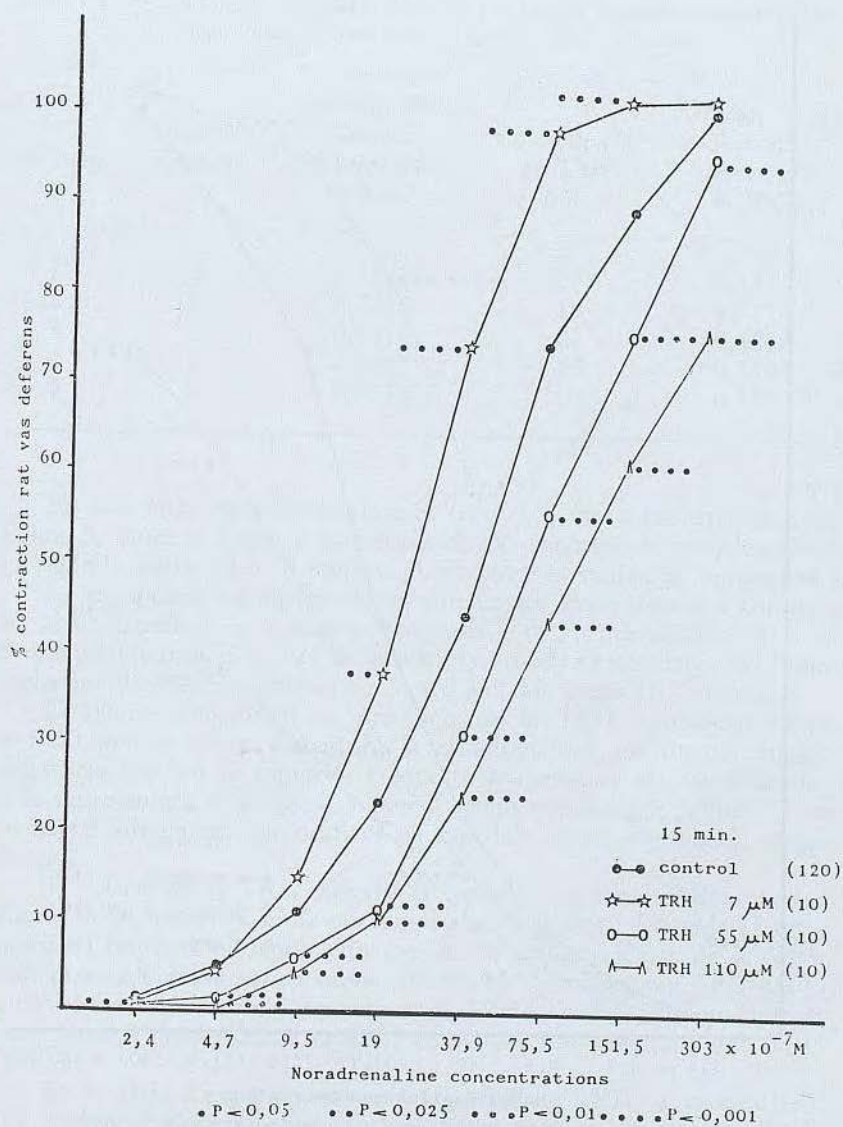


FIG. 3. — Corbes dosi-efecte de la noradrenalina. Hi són representades la corba control i les obtingudes després d'una incubació de 15 minuts amb TRH 7-55 i 110 μM.

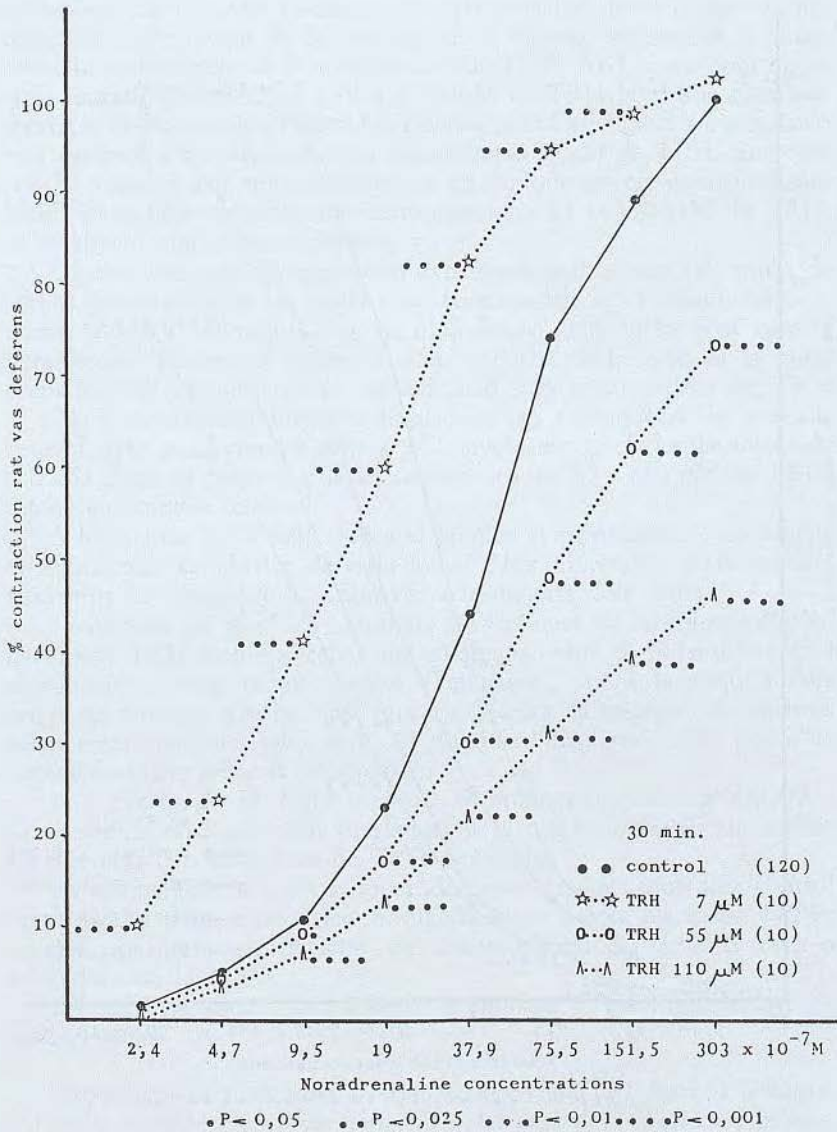


FIG. 4.—Corbes dosi-efecte de la noradrenalina. Hi són representades la corba control i les obtingudes després d'una incubació de 30 minuts amb TRH 7-55 i 110 μM .

TAULA I. — *Efecte de la TRH damunt l'activitat monoamino-oxidàsica (MAO) en el conducte deferent aïllat de rata.*

Lot núm.	Nombre animals	Activitat MAO	
		Controls $\mu\text{mols/g/h}$ 4-OHQ	Concentració de TRH μM
1	9	0,4817	7
2	10	0,5023	14
3	8	0,4512	27
4	6	0,3957	55
5	6	0,3735	110

En una altra sèrie d'experiències ($n = 10$), no representades a la figura 5, dutes a terme a una concentració superior de noradrenalina ($1 \mu\text{g/ml}$), entre 10 i 18 minuts, el fenomen és similar al representat.

La significació estadística de les diferències entre tractats i controls ha estat estudiada a 5 minuts (controls $n = 5$, tractats $n = 5$) i a 9 minuts (controls $n = 12$), mitjançant la prova t de Student, i no foren trobades diferències significatives entre ambdós grups ($P > 0,05$).

El temps d'incubació en presència de la TRH, considerat entre 0 i 30 minuts abans d'afegir-hi la noradrenalina, no tingué tampoc influència damunt la captació, i aquesta fou en tots els casos similar a la representada a la figura 5 per al temps estudiat (5 minuts), i no hi hagué diferències significatives en cap dels temps d'incubació considerats.

b) *Acció de la TRH damunt la captació de noradrenalina com a funció de la concentració de noradrenalina en el medi:* La taula II resumeix els resultats obtinguts. En cap de les concentracions de noradrenalina estudiades hom observa diferències significatives ($P > 0,05$) entre deferents control i tractats amb TRH. També ací hom aprecia una captació lleugerament superior en els deferents tractats amb TRH (2-6 %).

En la sèrie d'experiències amb $5 \mu\text{g/ml}$ de TRH, a concentració d' $1 \mu\text{g/ml}$ de noradrenalina, no s'observen tampoc diferències significatives: controls 913 ± 34 ($n = 10$) i tractats 941 ± 54 ($n = 10$) dpm/mg. La captació és també lleugerament superior (3,07 %) en presència de TRH.

Com es pot observar en els apartats anteriors, la TRH ha mostrat que incrementa lleugerament la captació en tots els casos, però en cap

grup d'una manera significativa. Tenint en compte la constància de l'increment, ha estat aplicada una prova de significació més discriminativa: la prova t per a dades aparellades (bimarginal). En tots els casos els controls han estat considerats 100 i ha estat calculada la modificació percentual determinada pel tractament amb TRH. Aquesta prova indica que alguns dels grups s'apropen a la significació ($0,05 < P < 0,1$). Per tal d'augmentar la dimensió de la mostra i tenint en compte que els increments són molt semblants a tots els grups, han estat considerats tots els casos estudiats a temps constants, i així hom ha obtingut que la TRH determina un augment mitjà de la captació de $5,07 \pm 1,64 \%$

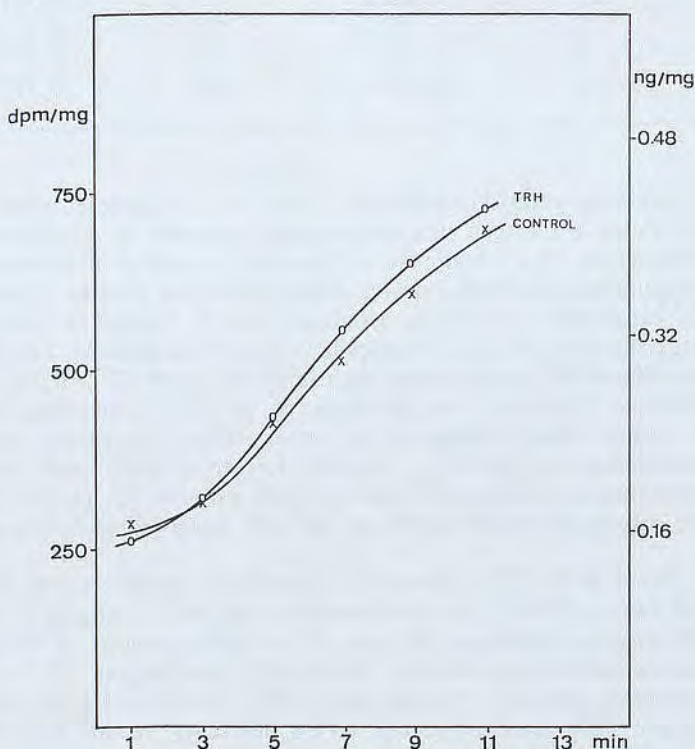


FIG. 5. — Acció de la TRH damunt la captació de L-noradrenalina- ^3H pel conducte deferent aïllat de rata funció del temps. En ordenades hi ha expressada en dpm/mg de teixit fresc la radioactivitat continguda en el deferent procedent de la noradrenalina captada; hi és indicada també l'equivalència teòrica dels dpm/mg en ng/mg de noradrenalina. En abscisses hi ha indicat el temps d'incubació del deferent en presència de $0,63 \mu\text{g/ml}$ de L-noradrenalina contenint $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ de L-noradrenalina- ^3H . Els punts — x — x — representen la captació pels deferents controls, i els — o — o — la captació en presència de $2,5 \mu\text{g/ml}$ ($7 \mu\text{M}$) de TRH addicionat 30 minuts abans que la noradrenalina.

La figura representa un total de 44 experiments.

TAULA II. — *Acció de la TRH damunt la captació de noradrenalina pel conducte deferent aïllat de rata com a funció de la concentració de noradrenalina present en el medi.*

Noradrenalina en el medi	Captació dpm/mg	
	Control	TRH (2,5 µg/ml)
µg/ml		
0,021	904 ± 26 (10)	932 ± 56 (10)
0,45	936 ± 68 (4)	953 ± 47 (4)
0,500	1182 ± 92 (10)	1222 ± 46 (10)
0,625	1011 ± 53 (12)	1041 ± 56 (12)
1	810 ± 58 (5)	830 ± 64 (5)
10	684 ± 52 (5)	727 ± 68 (5)

En tots els casos la noradrenalina present en el medi conté 1 µCi/ml de L-noradrenalina-³H. La captació es refereix a dpm de noradrenalina captats per mg de teixit fresc. La TRH fou afegida 30 minuts abans que la noradrenalina, i la determinació fou duta a terme 5 minuts després de l'addició d'aquesta. Entre parèntesi, nombre d'experiències. Cada dada és afectada de l'error típic de la mitjana.

(n = 47 parells de dades), i aquest increment és altament significatiu (0,001 < P < 0,005).

Per tal de validar aquesta prova hom observà la possible existència de diferències entre la captació del deferent dret i la de l'esquerre sense tractar, considerant que generalment havia estat utilitzat el dret com a control i l'esquerre com a tractat. No fou observada cap diferència significativa entre ambdós deferents (P > 0,9; 12 parells de dades). Tractant el dret i usant l'esquerre com a control, els resultats foren similars als descrits.

ESTUDI SIMULTANI DE L'EMMAGATZEMATGE I DE LA CAPTACIÓ. —
a) *Acció de la TRH damunt l'emmagatzematge i la noradrenalina funció del temps:* La radioactivitat incorporada al deferent després de la càrrega amb 12,5 µg/ml de noradrenalina roman estable al llarg dels temps de determinació. La TRH (7 µM) augmenta discretament aquesta radioactivitat retinguda (vegeu fig. 6), bé que l'augment és només estadísticament significatiu (P < 0,025) als 6 minuts, mentre que als altres

temps no és significatiu ($P > 0,05$). L'increment de les quantitats retinudes és de 7,37 % als 6 minuts, 2,95 % als 10 minuts i 2,32 % als 15 minuts.

Quan a la càrrega hom utilitza L-noradrenalina- ^3H per a marcar la noradrenalina emmagatzemada, els resultats són similars als representats a la figura 6. Tanmateix, els resultats d'emmagatzematge amb ^{14}C i captació amb ^3H són menys subjectes a error que els d'emmagatzematge amb ^3H i captació amb ^{14}C . Això és degut al fet que la proporció en el deferent entre ^{14}C emmagatzemat i ^3H captat, en els temps de determinació, és més favorable per a la detecció simultània en dos canals de

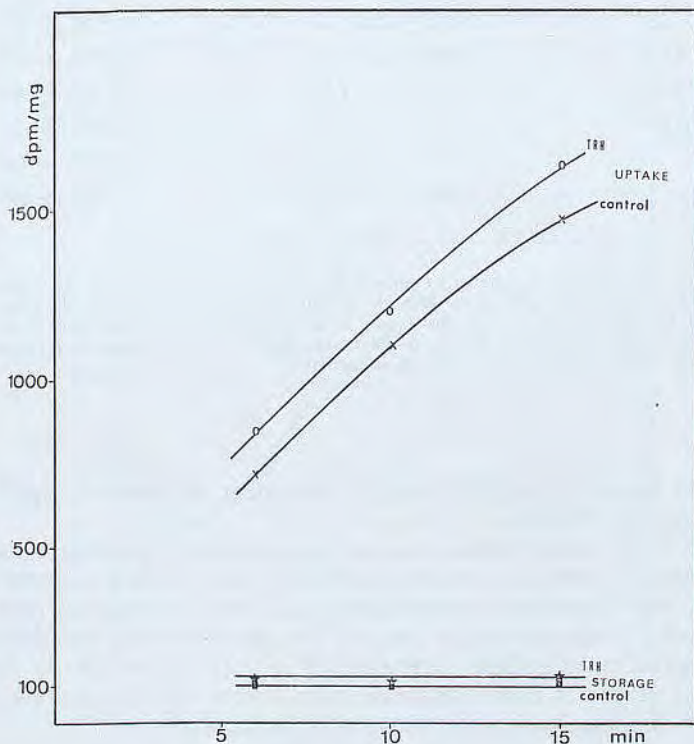


FIG. 6.— Acció de la TRH sobre l'emmagatzematge i la captació de la L-noradrenalina. L'emmagatzematge fou estudiat en aquestes experiències amb L-noradrenalina- ^{14}C , i la captació amb L-noradrenalina- ^3H (vegeu text). La TRH ($2,5 \mu\text{g/ml} = 7 \mu\text{M}$) començà d'actuar després de carregar els dipòsits amb L-noradrenalina- ^{14}C ($12,5 \mu\text{g/ml}$ i $0,132 \mu\text{Ci/ml}$), i hom n'observà l'efecte damunt la radioactivitat emmagatzemada i damunt la captació de L-noradrenalina- ^3H ($1,25 \mu\text{g/ml}$ i $1 \mu\text{Ci/ml}$) afegida posteriorment. A les ordenades hi ha expressats dpm/mg emmagatzemats (*storage*) i captats (*uptake*) pel mateix deferent, i a les abscisses el temps en què és efectuada la determinació a partir de l'addició de la segona noradrenalina. Cada punt representa la mitjana de quatre experiments.

comptatge que no pas la proporció ^3H emmagatzemat/ ^{14}C captat per a les concentracions emprades d'ambdós isòtops (és convenient que en el moment de la determinació el ^3H hi sigui en proporcions almenys 5-10 vegades superiors a les de ^{14}C).

Si hom considera les experiències de la figura 6 en tots els temps, per tal com no hi ha diferències significatives entre ells, l'emmagatzematge de $108,05 \pm 3,49$ ($n = 12$) dpm/mg per als controls, i de $113,12 \pm 3,79$ ($n = 12$) dpm/mg per als tractats, equivalents a 4,61 i 4,86 ng/mg respectivament. L'increment de retenció és de 4,69 % i no és significatiu ($P > 0,05$). Tanmateix, si hom aplica a les experiències d'emmagatzematge la prova de t per a dades aparellades, obté que l'increment de retenció determinat per la TRH ($5,07 \pm 2,07$ dpm/mg, $n = 12$ parells) és estadísticament significatiu ($P < 0,05$). Considerant cada control 100, l'increment determinat per la TRH és $4,76 \pm 1,83$ % ($n = 12$ parells).

La captació d'una dosi de noradrenalina similar a la DE50, després d'addicionar la TRH (7 μM), segueix característiques similars a les descrites a l'apartat anterior. Com podem observar a la figura 6, la TRH augmenta la radioactivitat captada, i aquest moment és estadísticament significatiu als 6 minuts ($P < 0,02$) i als 10 minuts ($P < 0,05$), però no als 15 minuts, bé que s'hi apropa ($P < 0,1$).

Els increments de captació per als temps indicats equivalen a 18,35 %, 19,7 % i 11,03 %, respectivament. A la figura 6, els dpm/mg captats són superiors als emmagatzemats, però representen quantitats de noradrenalina inferiors a causa de les proporcions marcada/freda. Així, la màxima radioactivitat captada correspondria, si fos totalment adrenalina, a 0,92 ng/mg, mentre que l'emmagatzemada equivaldria a 4,86 ng/mg.

Els resultats de captació amb ^{14}C són similars als representats a la figura 6.

Aplicant la prova de dades aparellades i considerant cada control 100, l'increment mitjà de la captació determinat per la TRH és de $15,66 \pm 2,2$ % ($n = 12$ parells), valor altament significatiu ($0,001 < p < 0,005$).

b) *Acció de la TRH damunt l'emmagatzematge i la captació de la noradrenalina en una seqüència d'administració de la noradrenalina a dosis acumulatives*: L'estudi de l'emmagatzematge i la captació de la noradrenalina, seguint una seqüència d'administració idèntica a la que ha estat emprada per a l'obtenció de les corbes desi-efecte acumulatives, mostra una acció de la TRH similar a la descrita. En aquestes condicions, equivalents a l'obtenció de l'efecte de contracció maximal (vegeu figures 3 i 4), la radioactivitat emmagatzemada en els deferents controls és de $88,73 \pm 4,15$ ($n = 6$) dpm/mg, i en els tractats amb TRH de $94,53 \pm 3,45$ ($n = 6$) dpm/mg. L'increment determinat pel TRH és

de 6,54 % i no és significatiu ($P > 0,05$). La prova de t per a dades aparellades indica que l'augment de retenció és de $7,22 \pm 2,8$ % ($n = 6$ parells), i és significatiu ($P \approx 0,05$).

La captació en aquestes condicions també és lleugerament augmentada, i s'obtenen per als controls $103,25 \pm 6,13$ ($n = 6$) dpm/mg i per als tractats $109,91 \pm 3,9$ ($n = 6$) dpm/mg. L'increment és de l'ordre de 5,68 %, i no és estadísticament significatiu ($P > 0,05$). En la prova de dades aparellades, l'increment de captació és de $3,64 \pm 0,81$ % ($n = 6$ parells), i és significatiu ($P < 0,025$).

DISCUSSIÓ. — Els efectes directes de la TRH damunt els mecanismes adrenèrgics perifèrics, observats en la present investigació, han mostrat d'ésser complexos.

La potenciació o la inhibició dels efectes de la noradrenalina segons la dosi de TRH utilitzada, estableix per a aquesta substància un mecanisme d'acció bifàsic similar al descrit per als antidepressius tricíclics.^{21, 22}

L'acció antidepressiva dels tricíclics es postulla basada en una inhibició de la recaptació de la noradrenalina alliberada per la terminació nerviosa adrenèrgica. Això dona lloc a una major quantitat de noradrenalina a nivell del receptor, amb la potenciació d'efectes consegüent.

Les dosis altes d'antidepressius tricíclics inhibeixen els efectes de la noradrenalina perquè bloquen, segons que sembla, el receptor. Aquest fet deu estar en relació amb la necessitat d'obtenir nivells plasmàtics de medicament ajustats dins uns límits, per tal d'aconseguir una resposta clínica favorable. Si la concentració plasmàtica d'antidepressiu tricíclic no assoleix un valor determinat, no hi ha efecte, perquè no es bloca la recaptació de noradrenalina. Igualment s'esdevé si són ultrapassats uns certs nivells, per tal com aleshores es bloquen la recaptació i el receptor. La gran variabilitat individual en els nivells plasmàtics assolits davant una dosi determinada —per diferències de metabolització d'origen genètic— explicaria uns certs tipus de «resistència» a la medicació tricíclica.²⁶

La potenciació i la inhibició observades amb la TRH i els seus efectes clínics discrepans, plantegen, per analogia amb els antidepressius tricíclics, la necessitat de conèixer si hi ha alguna correlació entre nivells plasmàtics variables individualment i efecte clínic observat.

Per tal d'aproximar-se al mecanisme d'acció dels efectes descrits per a la TRH, cal considerar la seva intervenció damunt els processos de transmissió adrenèrgica.

La potenciació dels efectes de la noradrenalina pot ésser explicada de diverses maneres: augment de l'alliberament, inhibició de la MAO, bloqueig de la captació, sensibilització del receptor, modificació del recanvi, etc.

La inhibició de la MAO resta descartada a la vista dels resultats obtinguts en el present treball.

En les experiències descrites, la TRH ha mostrat que tenia uns efectes discrets, però significatius, damunt la captació i l'emmagatzematge de la noradrenalina pel conducte deferent aïllat.

De totes les experiències dutes a terme, les més discriminatives són aquelles en què es considera l'emmagatzematge i la captació damunt el mateix deferent, tot carregant els dipòsits amb una dosi única i estudiant la captació a la DE50. En aquestes condicions la TRH determina un petit increment, estadísticament significatiu, de la radioactivitat retinuda, de l'ordre de 4,76 % sobre els deferents no tractats. Quan la càrrega és efectuada en forma de dosis acumulatives, com a les experiències biològiques, també s'hi observa una retenció semblant. La radioactivitat determinada en el teixit pot considerar-se que correspon en la major part a noradrenalina, per tal com ha estat descrit²⁷ que durant els temps d'incubació que ací han estat emprats la metabolització de l'amina captada és molt petita.

La radioactivitat emmagatzemada es deu comportar com la noradrenalina endògena, i aquesta s'allibera espontàniament dels dipòsits a un ritme determinat. En les condicions estudiades, aquest alliberament deu ésser lent, i les quantitats emmagatzemades s'estabilitzen en arribar a un equilibri amb el medi, que és allò que hom observa en els temps de determinació. L'increment determinat per la TRH suggereix, doncs, una lleugera acció blocadora de l'alliberament de la noradrenalina dels dipòsits.

Pel que fa a la captació de la dosi efectiva 50, estant els dipòsits carregats, la TRH determina —en aquestes condicions— un increment altament significatiu, aproximadament del 16 %, sobre la captació control. Les condicions per a observar aquest increment han d'ésser estrictes, per tal com, quan hom considera la captació, amb càrrega prèvia, després de dosis acumulatives, a la dosi maximal l'increment determinat per la TRH és només del 3,6 %. Igualment, en estudiar la captació sense càrrega prèvia dels dipòsits, a diversos temps i dosis, l'increment determinat per la TRH és petit —5 %— i molt variable de l'un cas a l'altre, i és només significatiu en considerar l'increment percentual de tots els casos. En aquest darrer tipus d'experiència, la variabilitat pot ésser determinada per la manca de càrrega prèvia dels dipòsits, on aniria més o menys noradrenalina segons les quantitats endògenes presents.

La interpretació de l'increment de captació originat per la TRH, no és factible de dur-la a terme a partir de les dades del present treball. Hi pot haver una relació entre l'augment de noradrenalina captada i la potenciació de l'efecte biològic determinats per la TRH, com suggereix el fet que el major increment de captació s'esdevingui a la DE50, en la qual la potenciació de l'efecte és molt patent i significativa (vegeu figu-

res 3 i 4) i, per contra, l'increment a la dosi maximal pot ésser molt discret, corresponent a la manca de potenciació de l'efecte.

D'altra banda, un augment de la captació de noradrenalina és incompatible amb mecanismes d'acció tipus amfetamínic o antidepressius tricíclics. Efectivament, bé que la TRH potencia els efectes de l'amfetamina i de la imipramina, el seu mode d'acció sembla diferent tant per raons farmacològiques²⁸ com per raons bioquímiques.

A nivell de la captació de noradrenalina, tant l'amfetamina com la imipramina la bloquen d'una manera important, tot disminuint notablement la incorporació al teixit de noradrenalina-³H present a les solucions d'incubació d'òrgans *in vitro*.²⁷

Un augment de l'alliberament tipus amfetamina tampoc no és compatible amb els resultats d'emmagatzematge obtinguts.

Podria també especular-se que l'augment de captació, si és que es troba relacionat directament amb l'efecte, és dut a terme a nivell del receptor. La TRH modificaria la «sensibilitat» del receptor (com les hormones tiroïdals, per exemple), determinant una major fixació de noradrenalina.

Hom pot també considerar que l'augment d'incorporació té efecte a nivell de les estructures postsinàptiques inespecífiques, responsables de la captació.²⁹

De fet, les dades de la literatura sobre els efectes de la TRH a nivell adrenèrgic no contribueixen a esclarir-ne el mecanisme d'acció. La modificació del recanvi de noradrenalina és contradictòria,^{31, 15} els nivells cerebrals de neurotransmissors no es modifiquen, però pot incrementar-se el nivell de cAMP, potenciar-se la DOPA, variar la quantitat d'alguns metabòlits, etc.^{6, 13, 15, 28} L'increment de captació pot ésser, per tant, relacionat amb múltiples factors, i calen futures investigacions per a elucidar la manera d'actuació directa sobre la terminació nerviosa adrenèrgica d'aquesta peculiar hormona hipotalàmica i possibilitar una explicació de la modificació dels efectes de la noradrenalina i de l'acció antidepressiva.

BIBLIOGRAFIA

1. BOWERS, C. Y., SCHALLY, A. V., SCHALCH, D. S., GUAL, C., KASTIN, A. J., FOLKERS, K.: Activity and specificity of synthetic thyrotropin-releasing hormone in man. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 39, 352-355, 1970.
2. VALE, W., RIVIER, J., BURGUS, R.: Synthetic TRF (thyrotropin-releasing factor) analogues: pGlu-N³¹-Me-His-Pro-NH₂: A synthetic analogue with specific activity greater than that of TRF. *Endocrinology*, 8, 1.485-1.488, 1971.
3. SPAULDING, S. W., BURROWS, G. N., DONABEDIAN, R., VAN WOERT, M.: L-Dopa suppression of thyrotropin-releasing hormone response in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 35, 182-185, 1972.
4. ROOT, A. W., SYNDER, P. J., REZVANI, I., DIGEORGE, A. M., UTIGER, R. D.: Inhibition of thyrotropin-releasing hormone-mediated secretion of thyrotropin by human growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36, 103-107, 1973.
5. BASSIRI, R. M., UTIGER, R. D.: Metabolism and excretion of exogenous Thyrotropin-Releasing Hormone in humans. *J. Clin. Invest.*, 52, 1.616-1.619, 1973.

6. PRANGE, A. J., WILSON, I. C., BREESE, G. R., PLOTNIKOFF, N. P., LARA, P. P., LIP-
TON, M. A.: Hypothalamic releasing hormones and catecholamines: a new interface.
Dins: *Frontiers in Catecholamine Research*, Ed. per E. Usdin i S. Snyder, Pergamon
Press, Oxford, 1973, pp. 1.149-1.155.
7. TUREK, I. S., ROCHA, J.: Oral Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in depressive
illness. *J. Clin. Pharmacol.*, 14, 612-616, 1974.
8. DIMITRIOUDI, M., HANSON-NORTY, E., JENNER, F. A.: TRH in psychosis. *Lancet*, 1,
456, 1974.
9. HOLLISTER, L. E., BERGER, P., OGLER, F. L., ARNOLD, R. C., JOHNSON, A.: Protirelin
(TRH) in depression. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 31, 468-470, 1974.
10. MOUNTJOY, C. Q., PRICE, J. S., WELLER, M., HUNTER, P., HALL, R., DEWAR, J. H.:
A double-blind crossover sequential trial of oral thyrotropin-releasing hormone in de-
pression. *Lancet*, 1, 958-960, 1974.
11. COPPEN, A., PEET, M., MONTGOMERY, S., BAILEY, J.: Thyrotropin-releasing hormone
in the treatment of depression. *Lancet*, II, 433-435, 1974.
12. VAN PRAAG, H. M.: Towards a Biochemical Typology of Depression? *Pharmakopsy-
chiat.*, 7, 281-292, 1974.
13. KELLER, H. H., BARTHOLINI, G., PLETSCHER, A.: Enhancement of cerebral noradrena-
line turnover by thyrotropin-releasing hormone. *Nature*, 248, 528-529, 1974.
14. HORST, W. D., SPIRIT, N.: A possible mechanism for the antidepressant activity of
thyrotropin-releasing hormone. *Life Sciences*, 15, 1.073-1.082, 1974.
15. REIGLE, T. G., AVNI, J., PLATZ, P. A., SCHILDKRAUT, J. J., PLOTNIKOFF, N. P.:
Norepinephrine metabolism in the Rat brain following acute and chronic administra-
tion of thyrotropin-releasing hormone. *Psychopharmacologia*, 37, 1-6, 1974.
16. CUENCA, E., SERRANO, M. I., GIBERT-RAHOLA, J., GALIANA, J.: Enhancement of nora-
drenaline responses by thyrotropin-releasing hormone. *J. Pharm.*, 27, 199-200, 1975.
17. CUENCA, E., SERRANO, M. I., GIBERT-RAHOLA, J.: Quelques aspects pharmacologiques
de la T.R.H. *J. Pharmacol. (Paris)*, 6, 378-379, 1975.
18. CUENCA, E., SERRANO, M. I., RODRÍGUEZ FARRÉ, E., GIBERT-RAHOLA, J., GUDIOL, T.:
Influence of TRH and MIF on adrenergic mechanisms. *Pharmacological and biochemi-
cal aspects. Abtr. Xth C.I.N.P. Congr.*, Québec, 1976, p. 220.
19. GUDIOL, T.: Acción de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) sobre meca-
nismos adrenérgicos. *Tesina de Farmàcia*, Barcelona, 1976.
20. CUENCA, E., SERRANO, M. I., GIBERT-RAHOLA, J., GALIANA, J., ALAMO, C.: TRH y
mecanismos adrenérgicos. Dins: *Avances en Farmacología* (ed. dirigida per F. G. VAL-
DECASAS i E. RODRÍGUEZ FARRÉ), Ediciones Acacia, pp. 271-274, Barcelona, 1977.
21. CUENCA, E., RIVERA, P., RODRÍGUEZ, L., VALDECASAS, F. G.: Estudio comparativo en-
tre imipramina y desmetilimipramina «in vitro». Influencia sobre la respuesta que
determinan adrenalina y noradrenalina en el conducto deferente aislado de rata. *Act.
Soc. Esp. Cienc. Fisiol.*, X, 127-131, 1967.
22. URSILLO, R. C., JACOBSON, J.: Potentiation of norepinephrine in the isolated vas defe-
rens of the rat by some CNS stimulants and antidepressants. *J. Pharmac. Exp. Ther.*,
148, 246-251, 1965.
23. KRAJL, M.: A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem.
Pharmac.*, 14, 1.684-1.686, 1965.
24. SEIDEL, A., VOLF, V.: Rapid determination of some transuranium elements in biolo-
gical material by liquid scintillation counting. *Int. J. appl. Radiat. Isotop.*, 23, 1-4,
1972.
25. SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W. G.: *Statistical methods*. Iowa State University Press,
Ames, 1967.
26. ALEXANDERSON, B., SJÖQVIST, F.: Individual differences in the pharmacokinetics of mo-
nomethylated tricyclic antidepressants: Role of genetic and environmental factor and
clinical importance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 179, 739-751, 1971.
27. RUTLEDGE, CH. O., AZZARO, A. J., ZIANCE, R. J.: Dissociation of amphetamine induced
release of norepinephrine from inhibition of neuronal uptake in isolated brain tissue.
Dins: *Frontiers in Catecholamine Research*, Ed. E. Usdin i S. Snyder, Pergamon
Press, Oxford, 1973, pp. 973-975.
28. KRUSE, H.: Thyrotropin Releasing Hormone: Interaction with chlorpromazine in mice,
rats and rabbits. *J. Pharmacol. (Paris)*, 6, 249-268, 1975.
29. IVERSEN, L. L.: Neuronal and extraneuronal uptake mechanisms. Dins: *Frontiers in
Catecholamine Research*, Ed. E. Usdin i S. Snyder, Pergamon Press, Oxford, 1973,
pàgines 403-408.