

41  
2 ej

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología

"EFECTO DEL VERAPAMIL SOBRE LA LIBERACION DE  
NEUROTRANSMISORES EN SINAPTOSOMAS"

T E S I S   P R O F E S I O N A L

que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta LUZ MARIA CHIU VELAZQUEZ

México, D.F.

1990

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

	Pág.
I. ORGANIZACION DE LA TESIS.....	1
II. ANTECEDENTES	
II.A. GENERALIDADES.....	2
1. Tipos de sinapsis.....	3
2. La preparación sinaptosomal.....	4
3. Sinapsis químicas y neurotransmisores.....	6
4. Biosíntesis de neurotransmisores.....	7
II.B. DESORDENES AFECTIVOS	
1. Características generales.....	11
2. Tratamientos somáticos para las depresiones mayores.....	14
3. Hipótesis de las Aminas Biogénicas.....	15
4. Funciones neuroendócrinas alteradas en la depresión.....	18
II.C. ANTAGONISTAS ORGANICOS DEL CALCIO.....	19
III. OBJETIVOS.....	22
IV. MATERIALES Y METODOS	
1. Obtención de la preparación sinaptosomal.....	23
2. Sistema de Perfusión.....	25
3. Medios de Perfusión.....	26
4. Captación del transmisor marcado radioactivamente..	26
5. Liberación del neurotransmisor.....	28
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
VI. CONCLUSIONES.....	60
VII. REFERENCIAS.....	64

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Diagrama 1. Metabolismo de la dopamina y la norepinefrina.....	8
Diagrama 2. Metabolismo de la serotonina.....	10
Diagrama 3. Metabolismo del GABA.....	12
Diagrama 4. Estructura química de los dos grupos de "antagonistas orgánicos del calcio".....	21
Figura 1. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida por despolarización con $K^+$ alto en ausencia y presencia de $Ca^{2+}$ externo.....	31
Figura 2. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida con veratrina en ausencia y presencia de $Ca^{2+}$ externo.....	33
Figura 3. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA dependiente de $Ca^{2+}$ inducida por el ionóforo de $Ca^{2+}$ , A-23187.....	35
Figura 4. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA independiente de $Ca^{2+}$ inducida con el ionóforo de $Na^+$ monensina.....	37
Figura 5. Efecto del verapamil sobre la radioactividad total de dopamina.....	40
Figura 6. Efecto del verapamil y del bupropion sobre la $^3H$ -dopamina total durante el periodo de lavado.....	41
Figura 7. Efecto del DABA y del verapamil sobre el $^3H$ -GABA total durante el periodo de lavado.....	43
Figura 8. Efecto del verapamil sobre la liberación basal de $^3H$ -GABA y de $^3H$ -dopamina de sinaptosomas del estriado.....	44
Figura 9. Efecto del DABA y del bupropion sobre la liberación basal de $^3H$ -GABA y de $^3H$ -dopamina.....	46
Figura 10. Efecto del DABA sobre la liberación de $^3H$ -GABA estimulada por homointercambio con GABA frío.....	48
Figura 11. Homointercambio de dopamina.....	50
Figura 12. Efecto del bupropion sobre la liberación de $^3H$ -dopamina estimulada por homointercambio con dopamina fría.....	51
Figura 13. Efecto del verapamil y del bupropion sobre la liberación de $^3H$ -dopamina estimulada por homointercambio con dopamina fría.....	53
Figura 14. Efecto del verapamil sobre la liberación de $^3H$ -dopamina y de $^3H$ -GABA estimuladas con veratrina.....	55
Figura 15. Curva de inhibición por verapamil de la respuesta de $^3H$ -GABA a veratridina.....	57
Figura 16. Curva dosis-respuesta del efecto del verapamil sobre la liberación basal de $^3H$ -dopamina.....	59

## I. ORGANIZACION DE LA TESIS.

Esta tesis es un estudio del efecto del verapamil sobre la liberación de los neurotransmisores ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y dopamina en terminales nerviosas aisladas de cerebro de manífero. El verapamil pertenece al grupo de fármacos conocidos como "antagonistas orgánicos de los canales de calcio".

En los "Antecedentes" se incluye una parte englobada con el subtítulo de "Generalidades". Esta contiene: 1) aspectos generales de la estructura y del funcionamiento de las terminales nerviosas, 2) algunas de las ventajas de utilizar la preparación sinaptosomal y 3) una descripción del metabolismo de algunos neurotransmisores. En la segunda parte intitulada "Desórdenes afectivos", se describe la sintomatología y el tratamiento de estos padecimientos y se mencionan brevemente los mecanismos de acción que se han propuesto para los fármacos más utilizados en su tratamiento. En la tercera parte se incluye la clasificación de los fármacos genéricamente conocidos como "Antagonistas Orgánicos del Calcio" y se mencionan algunos de los estudios relacionados con los efectos del verapamil, el cual se une con alta afinidad a las membranas de los sinaptosomas y ha demostrado ser potencialmente útil en la profilaxis de la manía.

Enseguida se mencionan los objetivos del presente estudio, surgidos de acuerdo a los antecedentes descritos.

En la parte de "Materiales y Métodos" se describe el procedi-

miento utilizado para el desarrollo del trabajo experimental, así como los principios en los que están fundamentados los métodos utilizados.

En la parte correspondiente a "Resultados y Discusión", se da la interpretación de cada gráfica presentada, enseguida de la descripción de los resultados contenidos en ella.

Finalmente se incluye un resumen de las "Conclusiones" más importantes a las que nos permitieron llegar los resultados hasta el momento obtenidos, seguido de las Referencias citadas en la tesis.

## II. ANTECEDENTES.

### II.A. GENERALIDADES

El sistema nervioso está constituido básicamente por dos tipos de células: las células nerviosas o neuronas y las células de la neuroglia o gliales. Estas últimas representan el soporte físico de las neuronas, participan en la transmisión sináptica e intervienen en el transporte de materiales nutritivos desde los capilares hasta las neuronas. Las neuronas son las células especializadas para la recepción de los estímulos y la conducción de los impulsos nerviosos y son por consiguiente las responsables de la transmisión de la información. La diversidad de formas y tamaños que presentan las neuronas es considerable, pero de una manera simple una neurona típica está compuesta por un cuerpo neuronal del que parten por un lado las

dendritas, clásicamente consideradas como la porción por donde se recibe preferencialmente la información, y por otro lado el axón con sus ramificaciones, que se encarga de llevar dicha información a las células nerviosas con las que la neurona hace contacto. Los extremos de las ramificaciones de un axón constituyen las terminales sinápticas de una neurona.

Toda la información que proviene del mundo exterior y del resto del cuerpo llega al cerebro y es recibida, procesada y almacenada gracias a las neuronas y a sus interconexiones. La organización y funcionamiento de estas células da lugar a funciones que van desde las formas más simples de relación con el medio ambiente en los animales inferiores, hasta los procesos más complejos del pensamiento humano. En vista de esto, el estudio de los mecanismos básicos que hacen posible la comunicación entre las neuronas resulta de gran interés.

#### 1. Tipos de sinapsis

La superficie de una neurona con la que hace contacto la terminal presináptica se denomina postsinapsis. La zona de comunicación entre las neuronas pre y postsináptica representa la sinapsis. Desde el punto de vista morfofisiológico, existen dos tipos de sinapsis: la eléctrica y la química. La primera prácticamente no presenta retardo sináptico y carece del espacio o hendidura sináptica de aproximadamente 20 nm que se observa entre las membranas pre y postsináptica en las sinapsis químicas. En la sinapsis eléctrica el área de unión entre estas membranas es simétrica en apariencia, mientras

que la sinapsis química se caracteriza por la presencia de vesículas sinápticas apiladas en la vecindad de la membrana presináptica, las que junto con las mitocondrias y una mayor opacidad a los electrones, contribuyen a la apariencia asimétrica entre las porciones pre y postsinápticas que conforman las sinapsis químicas (Pappas y Waxman 1972, Bullock y col. 1977).

Con base en los sitios de contacto entre las neuronas pre y postsinápticas, las sinapsis se pueden clasificar como axo-somáticas, axo-dendríticas, axo-axónicas, dendro-dendríticas y somato-somáticas. Cada una de ellas tiene a su vez ciertas variaciones estructurales según la organización de los circuitos neuronales en que participan (Bullock y col. 1977).

## 2. La preparación sinaptosomal

Gracias a la propiedad de sellarse que presentan las membranas biológicas que han sido parcialmente rotas, es posible obtener terminales nerviosas aisladas a partir de homogenados parciales de una estructura cerebral o de cerebro completo en sacarosa isotónica (Gray y Whittaker 1962).

Durante el proceso de homogenización del cerebro o de alguna de sus estructuras previamente disecadas, la membrana de las terminales nerviosas se rompe en las zonas de mayor adelgazamiento, y menor resistencia (Dunkley y col. 1987). Esto permite que las terminales nerviosas se separen de su axón y conserven en su interior sus organelos y toda la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento y liberación de los neurotransmisores



(Bradford 1975). Gracias a la relativa fluidez de las membranas celulares y a su capacidad de mantener su continuidad, los extremos cortados de la membrana de la terminal nerviosa se sellan rápidamente para formar una estructura continua de forma regular. La continuidad de la membrana celular en los sinaptosomas, se ha evidenciado en preparaciones sinaptosomales vistas al microscopio electrónico (Bradford 1975, Gray y Whittaker 1962).

Existen evidencias morfológicas y bioquímicas que demuestran que los sinaptosomas recién formados conservan propiedades semejantes a las que se encuentran en las terminales nerviosas intactas (Bradford 1975). Se ha demostrado extensamente la presencia de un potencial de membrana en los sinaptosomas, gracias al cual éstos son capaces de responder a estímulos eléctricos como potenciales sinápticos, generando potenciales de acción (Richards y McIlwain 1967).

Los sinaptosomas regulan la entrada y salida de calcio a través de su membrana (McGraw y col. 1981) y mantienen un nivel de  $Ca^{2+}$  citosólico en el reposo similar al encontrado en las células intactas (Nachshen 1985). Además, en los sinaptosomas se observa un fuerte acoplamiento entre la liberación del transmisor y la entrada de  $Ca^{2+}$  durante la despolarización rápida (Drapeau y Blaustein 1983).

Bradford (1969) ha demostrado que los sinaptosomas mantenidos a 37°C y en presencia de sustratos adecuados pueden respirar con un consumo lineal de  $O_2$  durante varias horas después de su aislamiento. Además, Nachshen y Drapeau (1988) han demostrado que la membrana plasmática de los sinaptosomas conserva sus características de

sensibilidad osmótica, y que éstos tienen una gran capacidad amortiguadora para regular el pH citosólico.

Por todo ello, puede decirse que la preparación sinaptosomal permite analizar los aspectos neuroquímicos del componente presináptico del proceso de la transmisión.

### 3. Sinapsis químicas y neurotransmisores

Además de las diferencias que presentan las sinapsis eléctricas y las químicas en cuanto a su estructura fina y en cuanto a la velocidad con la cual es transmitida la información desde una célula nerviosa a otra, la principal característica que las distingue reside en que las terminales nerviosas que intervienen en las sinapsis químicas son capaces, a diferencia de las eléctricas, de sintetizar, almacenar y liberar "sustancias sinápticamente activas", las cuales se conocen con el nombre de neurotransmisores y pueden ser de dos tipos: excitadores e inhibidores. Los primeros funcionan despolarizando la membrana de la célula postsináptica con la cual hacen contacto, mientras que los neurotransmisores inhibidores la hiperpolarizan y de esta manera dificultan que los impulsos excitadores simultáneos o subsecuentes, produzcan una despolarización de la membrana postsináptica suficiente para alcanzar su umbral de disparo.

Los neurotransmisores inhibidores "clásicos" incluyen al ácido  $\sigma$ -aminobutírico (GABA), a la glicina y a las monoaminas biogénicas, dopamina, norepinefrina y serotonina. Aunque estas últimas tienen efectos excitadores sobre algunas neuronas. La acetilcolina y el ácido glutámico por lo general son neurotransmisores excitadores.

#### 4. Biosíntesis de neurotransmisores.

Para que una neurona pueda sintetizar a un neurotransmisor específico, deben estar presentes en ella tanto el grupo de enzimas biosintéticas, como los procesos bioquímicos específicos necesarios que intervienen entre la síntesis del neurotransmisor y su liberación en la sinapsis; como es el empacamiento del neurotransmisor en vesículas de almacenamiento o vesículas sinápticas. Como la mayoría de las vías biosintéticas, en la síntesis de los neurotransmisores existe un paso enzimático limitante y una enzima específica que regula la síntesis. Por lo general la enzima limitante de la síntesis de un determinado neurotransmisor, se encuentra contenida en la neurona que lo sintetiza (Schwartz J, 1981).

La dopamina y la noradrenalina son sintetizadas en una vía común (Diagrama 1) que consta de varios pasos enzimáticos. La primera enzima que interviene en esta vía es la tirosina-hidroxilasa, una oxidasa que convierte la tirosina en L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA). Esta enzima es el paso limitante para la síntesis de dopamina y noradrenalina y es característica de las células dopaminérgicas. La L-DOPA enseguida es descarboxilada por la enzima DOPA-des-carboxilasa para producir dopamina y  $\text{CO}_2$ . La dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, que convierte la dopamina a noradrenalina, es característica de las células noradrenérgicas. Los principales metabolitos de la dopamina son el DOPAC (ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético) y el HVA (ácido homovanílico) y los de la noradrenalina son el MHPG (3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol), la normetanefrina (NM) y el ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA). La enzima monoamino oxidasa (MAO) es la responsable

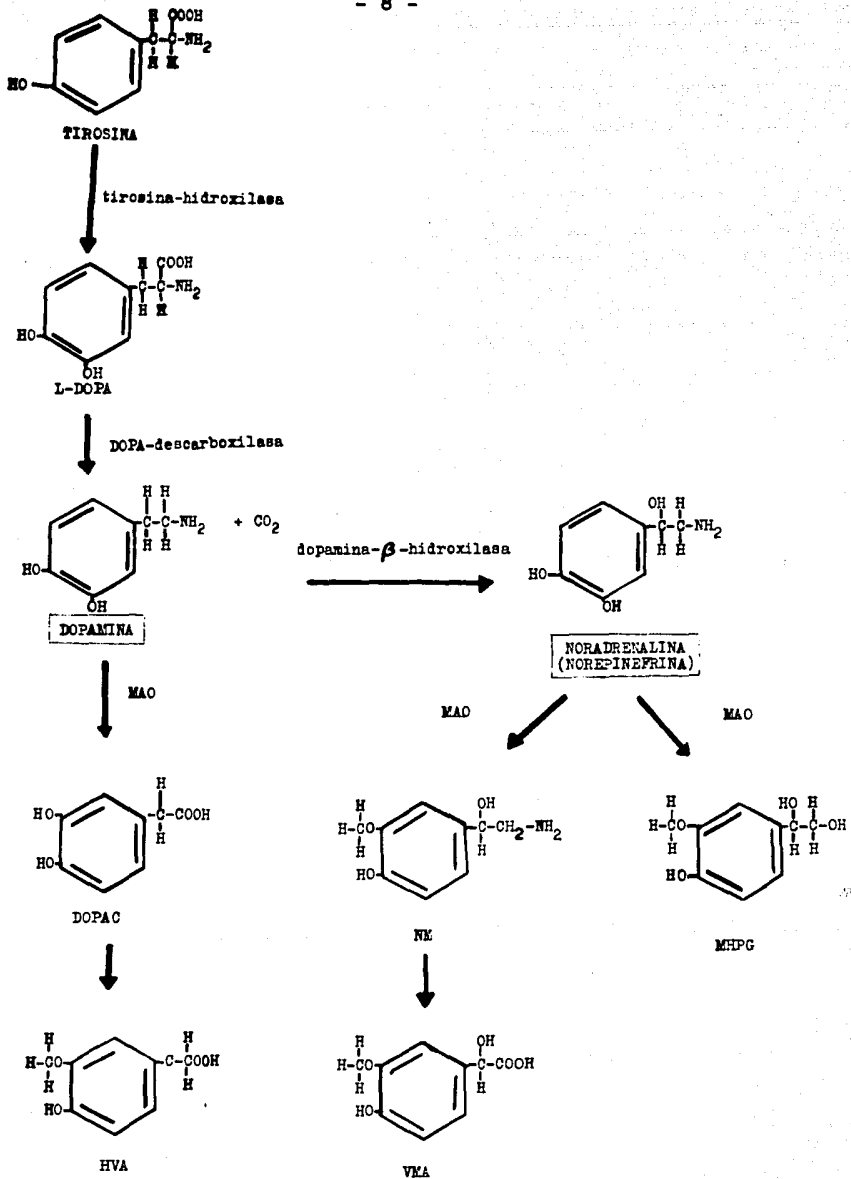


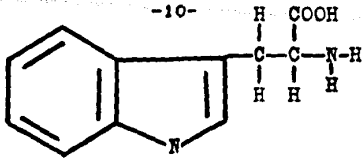
Diagrama 1. Metabolismo de las catecolaminas.

de la conversión de dopamina en DOPAC y de noradrenalina en MHPG o en NM. La pargilina es un representante de los inhibidores efectivos de dicha enzima (Cooper y col. 1982).

En el sistema nervioso central, los cuerpos celulares de las neuronas que contienen norepinefrina son prominentes en el locus coeruleus, un núcleo del tallo cerebral que tiene proyecciones hacia la corteza, el cerebelo y la médula espinal. Las células que contienen dopamina están localizadas en tres regiones: la sustancia negra compacta, cuyas células proyectan hacia el estriado; la sustancia negra reticulada que proyecta a la corteza límbica; y en el hipotálamo, donde se proyectan hacia el tallo de la hipófisis (Schwartz J, 1981).

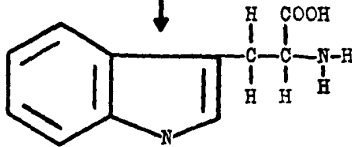
La síntesis de serotonina o 5-hidroxitriptamina (Diagrama 2) incluye a 2 enzimas: la triptofano hidroxilasa, una oxidasa similar a la tirosina hidroxilasa, que agrega un grupo hidroxilo al anillo indol del triptofano en la posición 5 y forma así el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y la 5-hidroxitriptofano-descarboxilasa, que enseguida forma la serotonina. El paso limitante es la triptofano hidroxilasa, la primera enzima en esta vía biosintética. El principal metabolito derivado de la serotonina es el ácido 5-hidroxi indolacético (5-HIAA) que se forma con intervención de la MAO. Los cuerpos celulares serotoninérgicos se encuentran en el núcleo del raquí del tallo cerebral, estas células envían fibras hacia el cerebro anterior y hacia la médula espinal (Cooper y col. 1982).

A diferencia de las aminas biogénicas, existe un grupo de aminoácidos que son liberados como neurotransmisores y que también son



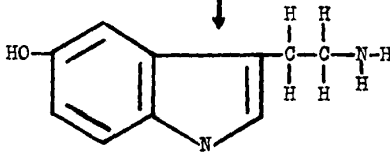
TRIPTOFANO

↓  
triptofano hidroxilasa



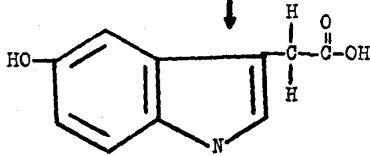
5-HTP

↓  
5-HTP-descarboxilasa



5-HT  
SEROTONINA

↓  
MAO +  
aldehído deshidrogenasa



5-HIAA

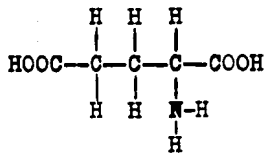
Diagrama 2. Metabolismo de la serotonina

constituyentes celulares universales. La glicina, el glutamato y el aspartato son 3 de los 20 aminoácidos comunes que están incorporados a las proteínas de todas las células. Por ejemplo, el ácido glutámico no sólo funge como neuroexcitador sino que en algunas zonas del sistema nervioso central de los vertebrados, además de ser un importante producto intermediario del metabolismo neuronal es el precursor directo del GABA (Costa y col. 1979, Tapia 1983), molécula que a su vez es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. La vía estriato nigral es una vía gabaérgica bien definida. Además, en el cuerpo estriado también existen interneuronas gabaérgicas. La enzima responsable de la conversión del ácido L-glutámico a GABA es la glutamato descarboxilasa (Diagrama 3). Esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma de las terminales nerviosas gabaérgicas. La GABA-transaminasa es la enzima que degrada al GABA y lo convierte en semialdehído succínico. Un inhibidor efectivo de dicha enzima es el ácido amino-oxiacético (Tapia 1983).

## II.B. DESORDENES AFECTIVOS.

### 1. Características generales.

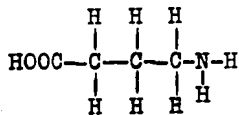
Los desórdenes afectivos son aquellas enfermedades mentales en las que ocurre una alteración del estado de ánimo acompañada de un síndrome depresivo o maniaco, que no se debe a ningún otro trastorno mental o físico (DSM-III-R 1988). Dentro de los desórdenes afectivos se encuentran las depresiones mayores, que pueden ser de tipo



ACIDO GLUTAMICO



GAD



ACIDO  $\gamma$ -AMINOBTIRICO (GABA)



GABA transaminasa

SEMIALDEHIDO SUCCINICO



ACIDO SUCCINICO



CICLO DE KREBS

Diagrama 3. Metabolismo del GABA



unipolar o depresión recurrente y de tipo bipolar o maniaco depresiva. Además, en los desórdenes afectivos se pueden presentar episodios psicóticos, en particular en la manía (Sachar 1981b).

Los síntomas generales de los desórdenes unipolares son: humor disfórico agudo, pérdida generalizada de intereses y pérdida de la capacidad para experimentar placer.

Los criterios que se utilizan para diagnosticar este tipo de desorden son: sueño alterado (insomnio y despertares nocturnos), apetito disminuido, pérdida de energía, impulso sexual disminuido, agitación psicomotora, retardo en pensamientos y acciones, dificultad para concentrarse, e ideas de culpabilidad, de pesimismo y de suicidio. Además hay un aumento en la intensidad de los síntomas por las mañanas (Sachar 1981a).

La edad más común para que ocurra el primer episodio de un paciente deprimido es a los 40 años, se presenta más frecuentemente en las mujeres que en los hombres y la duración usual del episodio es de 4 a 12 meses. En la mayoría de los casos, y a diferencia de la depresión reactiva, no se han observado factores psicosociales o del medio que precipiten la aparición del cuadro, el cual, una vez que se ha establecido, es autónomo. Se calcula que aproximadamente 4% de la población mundial sufre de depresión. El riesgo de suicidio en los enfermos deprimidos es mayor cuando éstos comienzan a recuperarse.

Los pacientes que presentan desórdenes bipolares sufren episodios subsecuentes de manía y depresión. Las características clínicas de la depresión son iguales a las vistas en los desórdenes uni-

polares. La manía se caracteriza por la presencia de un humor elevado, expansivo e irritable, sobreactividad, verborrea, libido y energía incrementados, presión y fuga de ideas, grandiosidad, distractibilidad, necesidad de sueño disminuida, conductas temerarias y también pueden presentarse delirios que son parte de los síntomas psicóticos. Este tipo de desórdenes se presentan más comúnmente a los 30 años y en cualquier sexo. La mayoría de los episodios no tienen precipitantes psicosociales.

~~En estudios como los de Kety y col. (1975), se ha observado que, para la aparición de las depresiones mayores en general (tipo unipolar o bipolar), existe una fuerte predisposición genética. Estos autores encontraron en su estudio que la tasa de morbilidad de la depresión en los parientes de primer grado de pacientes con enfermedades depresivas, es mucho más alta que la observada en la población general.~~

*Así como se relaciona con la aparición de la enfermedad de Guffin y Katz (1959)*

## 2. Tratamientos somáticos para las depresiones mayores.

Existen dos tratamientos somáticos efectivos para las depresiones mayores: la terapia electroconvulsiva y las drogas antidepresivas.

La terapia electroconvulsiva produce alrededor del 90% de mejoría en pacientes con depresión mayor definida y refractaria a los fármacos: en un principio este tratamiento inducía crisis generalizadas, por lo que actualmente se administra bajo anestesia y con relajación muscular completa. Se cree que la eficacia de esta terapia

reside en que produce cambios en la sensibilidad de los receptores aminérgicos.

Las drogas antidepresivas utilizadas pueden ser del tipo de los inhibidores de la MAO, de los compuestos tricíclicos o bien precursores metabólicos de las aminas biogénicas. En términos generales, estas drogas producen mejoría de un 70% a un 85% según la dosis. En general, los pacientes comienzan a mejorar al cabo de 1 a 3 semanas de iniciado el tratamiento.

Las sales de litio son efectivas para la terminación de los episodios maniacos y también evitan o atenúan los episodios maniacos y depresivos recurrentes. De forma similar, las drogas antipsicóticas se utilizan para terminar los episodios maniacos, y al combinarse con compuestos tricíclicos, son útiles para tratar la depresión psicótica (Sachar 1981a).  
*el tratamiento*

### 3. Hipótesis de las Aminas Biogénicas.

La idea más aceptada acerca del sustrato neurológico de la depresión es una deficiencia funcional en la serotonina y/o en la norepinefrina del cerebro, y que los antidepresivos actúan al incrementar la disponibilidad de ambas aminas. La serotonina y la norepinefrina se almacenan en gránulos intracelulares y son liberadas excitóticamente por las terminales serotoninérgicas y noradrenérgicas hacia el espacio sináptico. Después de que el neurotransmisor interactúa con los receptores postsinápticos, estas aminas biogénicas son activamente retomadas por las terminales presinápticas.

La idea de que las aminas biogénicas están reducidas en la de-

presión partió de los experimentos realizados con la reserpina, un alcaloide de la Rawolfia que primero se utilizó como tratamiento de la hipertensión. Este alcaloide precipitaba los síndromes depresivos en un 15% de los pacientes hipertensos tratados. Posteriormente el grupo de Bernard Brodie (Pletscher y col. 1956), demostró que esta droga causa depleción de serotonina y norepinefrina de las vesículas de almacenamiento y, a su vez, las aminas biogénicas que son liberadas al citoplasma son degradadas por la enzima monoamino oxidasa.

Los inhibidores de la MAD ejercen su efecto terapéutico en la depresión al aumentar la disponibilidad de serotonina y de norepinefrina mediante la inhibición de la enzima que los degrada en el citoplasma.

Los antidepresivos tricíclicos bloquean la recaptura activa de la serotonina y norepinefrina por las terminales que las liberan, con lo cual prolongan el tiempo de acción de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica.

Se ha evidenciado que la administración de precursores de la serotonina y de la norepinefrina, tales como L-triptofano, 5-OH-triptofano o L-DOFA, y que la administración de agentes farmacológicos que aumentan la disponibilidad de estas aminas biogénicas disminuyen la depresión.

Además, recientemente ha surgido una variedad de antidepresivos atípicos que tienen estructuras y efectos bioquímicos muy diversos. Entre ellos hay sustancias de uno, dos o tres anillos, como la clovoxamina, la zimelidina o la clorimipramina; o bien de tres ani-

llos indólicos, como el iprindol (Richelson 1984).

Por otro lado, a pesar de que la inhibición de los sistemas de recaptura de alta afinidad de serotonina y de norepinefrina por los agentes tricíclicos es casi inmediata, la hipótesis de las aminas biogénicas no explica el retraso entre el inicio del tratamiento y el establecimiento de la respuesta clínica a este tipo de antidepresivos. Este retraso se ha tratado de explicar a través de los efectos que tienen los antidepresivos sobre otros procesos diferentes a la recaptura, en particular por medio de sus efectos sobre los receptores pre y postsinápticos. Así, por ejemplo, se han encontrado evidencias de que la terapia electroconvulsiva y las drogas antidepresivas en general, reducen la sensibilidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos postsinápticos y producen una regulación denominada hacia abajo o subsensibilidad, que consiste en que disminuye el número total de receptores. De forma similar, los antidepresivos también disminuyen la sensibilidad de ciertos receptores de serotonina ( $5-HT_2$ ). La administración a largo plazo de la mayoría de antidepresivos causa una disminución en el número de receptores presinápticos, esta disminución de los autorreceptores, que normalmente inhiben la liberación, podría incrementar la función sináptica. Es probable que el efecto predominante de los antidepresivos tricíclicos sea sobre los receptores presinápticos y que este efecto sea subyacente a su respuesta terapéutica.

Recientemente algunos autores han señalado que, en vista de que varios de los efectos clínicos y bioquímicos de los antidepresivos no son satisfactoriamente explicados por la hipótesis de las

aminas biogénicas, es necesario postular una hipótesis más integrativa que explique tales efectos y en la que se tomen en cuenta los sitios de acción específicos de cada fármaco y los cambios transinápticos que éstos puedan producir y que puedan afectar a otros sistemas de neuronas (Richelson 1984, Stahl 1984, Díaz 1988).

#### 4. Funciones neuroendócrinas alteradas en la depresión.

Los signos clínicos observados en la depresión sugieren que la modulación de la actividad neuroendócrina por el hipotálamo debe estar afectada. En especial porque los sistemas de neurotransmisores más fuertemente implicados en la depresión, serotoninérgicos y noradrenérgicos, también tienen un papel importante en la regulación neuroendócrina.

Uno de los disturbios neuroendócrinos mejor establecidos en la depresión severa es una hipersecreción de cortisol a partir de la corteza adrenal, que es secundario a una excesiva secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por la pituitaria. Aproximadamente la mitad de los pacientes deprimidos secretan cantidades excesivas de cortisol, sobre todo durante la tarde y la noche. Esta hipersecreción es en general resistente a la supresión por retroalimentación con el potente corticosteroide sintético dexametasona, el cual deprime a la ACTH.

Otra anomalía endócrina característica en la depresión es una respuesta entorpecida de la hormona de crecimiento y a la hipoglicemia producida por una dosis estándar de insulina. La respuesta a la hormona de crecimiento también puede ser entorpecida por

bloqueadores y depletores de serotonina y norepinefrina. Así, una amplia variedad de estudios han sugerido anomalías neuroendócrinas en la depresión, que probablemente se derivan de una alteración subyacente en el sistema dopaminérgico o los sistemas monoaminérgicos que regulan esta función hipotalámico-pituitaria.

Aunque la supresión por dexametasona no es prueba diagnóstica, se ha usado como un ensayo para la depresión ya que al menos el 40% de los pacientes rigurosamente diagnosticados con depresión muestran anomalías en esta prueba. La prueba de supresión por dexametasona es usada a veces conjuntamente con un electroencefalograma durante el sueño para fines diagnósticos. Muchos pacientes deprimidos muestran anomalías en sus patrones de sueño (Sachar 1981a).

## II.C. ANTAGONISTAS ORGANICOS DEL CALCIO.

El estudio de los mecanismos de acción subyacentes a los efectos de fármacos, drogas o toxinas de origen natural sobre diferentes manifestaciones del funcionamiento del sistema nervioso ha probado ser una buena alternativa para avanzar en el conocimiento de la comunicación sináptica. Así, los fármacos estructuralmente heterogéneos colectivamente conocidos como "antagonistas orgánicos de los canales de  $Ca^{2+}$ " que se empezaron a estudiar y a utilizar como agentes cardiovasculares, han cobrado interés en otros campos de estudio. Esto se debe, por una parte, a que el  $Ca^{2+}$  participa en la regulación de varias funciones celulares, entre ellas la secreción de hormonas y la liberación de neurotransmisores, y por otra parte,

a que algunos antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  son potencialmente útiles en la profilaxis de ciertos desórdenes afectivos.

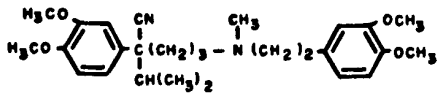
Los "antagonistas orgánicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ", incluyen dos grupos: el de las "fenilalquilaminas antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ ", integrado por el verapamil, el D-600 (metoxiverapamil) y el diltiazem, y el grupo de las "dihidropiridinas antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ " entre las que se encuentran la nitrendipina, nifedipina y nimodipina (Bolger y col. 1982, Yamamura y col. 1982) (Diagrama 4).

En los estudios que comparan los efectos del  $\text{Li}^+$  con los efectos del verapamil sobre pacientes maniacos se demuestra que ambos tratamientos resultan igualmente benéficos en la profilaxis de la mania (Dubovsky y Franks 1983, Giannini y col. 1984, Dubovsky y col. 1987, Barton y Gitlin 1987, Hoschl y Kozeny 1989). En este contexto, resulta interesante que los neurolépticos del tipo de las difenilbutilpiperidinas (DPBF) que incluyen al pimozide, fluspirileno, penfluridol y clopimozide inhiban la unión de  $^3\text{H}$ -nitrendipina a membranas de corteza cerebral de rata, y que el metoxiverapamil (D-600) revierta la inhibición de la unión de  $^3\text{H}$ -nitrendipina inducida por esos neurolépticos (Gould y col. 1983). Como estos hallazgos podrían sugerir que las DPBF se unen a los mismos sitios que el verapamil, Gould y col. (1983) proponen que los efectos terapéuticos de ese tipo de neurolépticos deben estar relacionados con acciones antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente a este trabajo, en varias publicaciones psiquiátricas se maneja la hipótesis de que el  $\text{Li}^+$ , el verapamil y los neurolépticos del tipo de las DPBF ejercen sus efectos terapéuticos mediante sus acciones como antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  (Dubovsky y

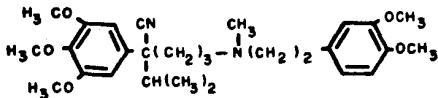


# ANTAGONISTAS ORGANICOS DEL CALCIO

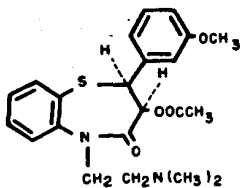
## FENILALQUILAMINAS



VERAPAMIL

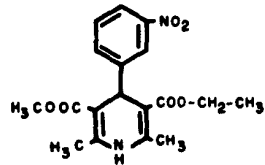


METOXIVERAPAMIL (D-600)

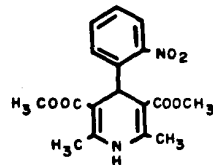


DILTIAZEM

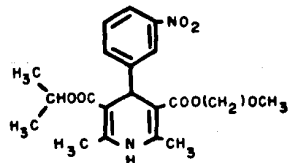
## DIHIDROPIRIDINAS



NITRENDIPINA



NIFEDIPINA



NIMODIPINA

Diagrama 4. Estructura química de los dos grupos de "antagonistas orgánicos del calcio".

Franks 1983, Giannini y col. 1984, Gould y col. 1983, Meltzer 1986)

La importancia terapéutica de los llamados "antagonistas orgánicos del  $Ca^{2+}$ " aunada al antecedente de que algunos de ellos se unen con alta afinidad a las terminales nerviosas aisladas de cerebro de mamífero (Carvalho y col. 1986a, 1986b), nos llevó a caracterizar los efectos del verapamil, sobre la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas. En particular del GABA, por su amplia distribución en el cerebro, y de la dopamina, ya que hay evidencias indirectas que sugieren que algunos componentes del síndrome maniaco deben estar relacionados con una alteración en esta monoamina cerebral (Post y col. 1980).

### III. OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes antes descritos, realizamos la caracterización del efecto del verapamil sobre la liberación de GABA y de dopamina, tomando en cuenta los siguientes objetivos:

- 1) Explorar si el efecto del verapamil sobre la liberación de estos neurotransmisores involucra a los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje.
- 2) Explorar si el efecto del verapamil sobre la liberación de estos neurotransmisores involucra a los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje, ya que el verapamil inhibe la liberación de GABA estimulada por veratrina en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo (Norris y col. 1983).
- 3) Explorar si el verapamil afecta la recaptura de dopamina, ya que

los efectos terapéuticos de muchos antidepresivos se atribuyen a una inhibición de la recaptura de las aminas biogénicas por las terminales nerviosas.

- 4) Explorar si el efecto del verapamil sobre la liberación de estos neurotransmisores está relacionado con su posible internalización a la terminal nerviosa, ya que el verapamil es liposoluble.
- 5) Explorar si el verapamil afecta un evento común al proceso de la liberación de los neurotransmisores.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 1. Obtención de la preparación sinaptosomal

La materia prima para obtener la preparación sinaptosomal se elige de acuerdo al transmisor cuya liberación se pretende estudiar. En este trabajo se estudió la liberación de 2 transmisores marcados radioactivamente:  $^3\text{H}$ -GABA y  $^3\text{H}$ -dopamina. Como el GABA está ampliamente distribuido en el cerebro de los mamíferos, se utilizó el cerebro completo (sin cerebelo) de 4 ratones machos cepa CD1 para la purificación de las terminales presinápticas o sinaptosomas. En el caso de la dopamina, a diferencia del GABA, es necesario diseccionar una estructura cerebral rica en terminales nerviosas que contengan a ese transmisor, para posteriormente estudiar su liberación. En vista de que en el cuerpo estriado se concentra la mayor parte de la dopamina cerebral, esta estructura se utilizó como materia prima para aislar los sinaptosomas. Como el estriado del ratón es muy pequeño,

los sinaptosomas que se emplearon para los estudios de liberación de dopamina, se purificaron de los estriados de 15 ratas Wistar macho, que pesan aproximadamente lo mismo que 4 cerebros de ratón.

Para aislar las terminales nerviosas tanto de cerebro de ratón como de estriado de rata, se siguió el método de Hajós (1975) ligeramente modificado. Para purificar los sinaptosomas de cerebro de ratón, se decapitan los ratones y se extraen sus cerebros. Para purificar los sinaptosomas de estriado de rata se decapitan las ratas y se les disecan los estriados. Una vez obtenidos los cerebros de ratón o los estriados de rata, éstos se homogenizan en sacarosa 0.32 M (1:9, peso/volumen). El homogenado se centrifuga a  $1,500 \times g$  durante 10 minutos y el precipitado se desecha. El sobrenadante que resulta de esta primera centrifugación, se centrifuga a  $9,000 \times g$  durante 20 minutos. El precipitado que se obtiene de esta segunda centrifugación constituye la fracción sinaptosomal cruda conocida como  $P_2$ . La fracción  $P_2$  así obtenida, se resuspende en sacarosa 0.32 M y se coloca sobre 20 ml de sacarosa 0.8 M para centrifugarse a  $9,000 \times g$  durante 25 minutos. Este gradiente discontinuo se resuelve en: (I) una banda blanca en la interfase de la sacarosa 0.32 a 0.8 M, (II) partículas dispersas en la solución de sacarosa 0.8 M y (III) un precipitado. La banda II, que contiene a los sinaptosomas purificados, se recupera y se diluye lentamente en 3 volúmenes de sacarosa 0.32 M. Los sinaptosomas diluidos se concentran al centrifugar a  $20,000 \times g$  durante 20 minutos. El precipitado que se obtiene contiene a los sinaptosomas purificados y se resuspende en dextrosa 0.32 M para ser empleado en los experimentos de liberación de transmisores. Todo el

procedimiento se realiza a 4°C.

## 2. Sistema de Perfusión

Para estudiar la liberación de los neurotransmisores a partir de las terminales nerviosas aisladas o sinaptosomas, se utilizó un sistema de perfusión continua. Este sistema está constituido por varias cámaras Millipore Swinnex de 25 mm, dispuestas en paralelo que cuentan con una base multiperforada. Sobre esta base se colocaron filtros de 0.65  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, con el objeto de retener a los sinaptosomas que miden en promedio 1  $\mu\text{m}$ . Las cámaras Swinnex están modificadas en su parte superior de tal manera que cuentan con un reservorio de plástico unido directamente a ellas. En estos reservorios fueron vertidos los diferentes medios de perfusión que bañaban a la preparación y determinaron las diferentes condiciones experimentales. Por su parte inferior cada una de las cámaras está conectada a una tubería de "tygon" o de "silastic" de 0.32 mm de diámetro, que pasa a través de un "cassette" apoyado sobre los rodillos de la bomba peristáltica (Manostat), que regula el flujo del líquido a través del sistema. La velocidad de flujo que se empleó, por haber dado buenos resultados en trabajos anteriores, fue de 0.5 ml/minuto. Los tubos que salen por el extremo opuesto de cada "cassette", terminan directamente en los recipientes recolectores. El transmisor radioactivo liberado y que es arrastrado por el Ringer de perfusión, se colectó cada minuto.

Este sistema de varias cámaras de perfusión dispuestas en paralelo, tiene la ventaja de que permite estudiar cómo se modifica la

liberación de los transmisores de alicuotas de la misma preparación sinaptosomal, cuando éstas son bañadas con medios de perfusión de diferente composición, por ejemplo, que contengan al verapamil, a los tratamientos que despolarizan la membrana o que aumentan la permeabilidad a algún ión, que contengan a los neurotransmisores no marcados o bien a los bloqueadores de su recaptura, etc.

### 3. Medios de Perfusión

La liberación basal de los transmisores, se observó empleando un Ringer Krebs bicarbonato pH 7.4, gaseado con una mezcla de  $\text{CO}_2:\text{O}_2$  (5%:95%) a 37°C. Este Ringer tenía la siguiente composición (en mM): NaCl 127,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18, KCl 3.73,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgSO}_4$  1.18,  $\text{NaHCO}_3$  20, glucosa 11.2. Con el propósito de evitar la degradación del GABA o la dopamina liberados, se añadió el inhibidor de la GABA-transaminasa, ácido amino oxiacético (0.1 mM) o el inhibidor de la monoaminoxidasa, pargilina (0.1 mM), respectivamente.

Este Ringer de perfusión básico fué modificado, con la presencia de verapamil y/o los tratamientos estimuladores de la liberación de transmisores ( $\text{K}^+$  alto, VTR, MN, A-23187, etc).

### 4. Captación del transmisor marcado radioactivamente

Las terminales presinápticas cuentan con la propiedad de "recapturar" a los neurotransmisores que han sido liberados al espacio sináptico y llevarlos hasta su interior por medio de un sistema de transporte activo de alta afinidad, dependiente de sodio y temperatura. Esta propiedad, que es preservada en los sinaptosomas, repre-

senta la ventaja de que cuando la preparación sinaptosomal es incubada en un medio que contiene a un determinado neurotransmisor que ha sido marcado radioactivamente, éste es captado por la preparación y se hace posible seguir su liberación o su misma captación en diferentes condiciones experimentales. Además, como los sitios de captura de alta afinidad para un determinado neurotransmisor parecen estar localizados en las neuronas que normalmente sintetizan, almacenan y liberan a ese neurotransmisor, esta ubicación específica de sitios de captura de alta afinidad dota a las terminales nerviosas con la propiedad de poder captar selectivamente al neurotransmisor que fisiológicamente liberan (Fonnum y col. 1981, Wilson y col. 1975). Evidentemente, esto representa otra ventaja de la preparación sinaptosomal, ya que a partir de una población heterogénea de sinaptosomas de cerebro completo, sólo aquéllos que cuentan con los sitios de captura de alta afinidad para el neurotransmisor marcado radioactivamente, que se suministra a una baja concentración para activar los sistemas de remoción de alta afinidad, serán capaces de captarlo y liberarlo cuando sean sometidos a las condiciones que propician su captación o liberación (Levi y col. 1978, Bradford 1975). Una vez introducido el transmisor marcado a las terminales, es posible estudiar su liberación bajo diferentes condiciones experimentales. Así, aprovechando el mecanismo de inactivación del transmisor por recaptura, se "cargaron" los sinaptosomas de cerebro de ratón o de estriado de rata con  $^3\text{H}$ -GABA o con  $^3\text{H}$ -dopamina respectivamente, para después estudiar la liberación de esos neurotransmisores mediante el seguimiento de la marca radioactiva.

Para cargar los sinaptosomas con el neurotransmisor radioactivo se procedió como sigue: se tomaron alícuotas de la suspensión de sinaptosomas en dextrosa 0.32 M y se preincubaron en el medio de captación (Ringer estándar) durante 10 minutos a 37°C. La composición del Ringer de captación fue como sigue (en mM): NaCl 127, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, KCl 3.73, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 1.18, NaHCO<sub>3</sub> 20. Esta solución contenía ácido aminooxiacético 0.1 mM para los experimentos de liberación de GABA; o 0.1 mM de pargilina y 0.1 mg/ml de ácido ascórbico como antioxidante para los experimentos de liberación de dopamina. Al término de la preincubación, se añadió la cantidad necesaria de una mezcla de GABA marcado y GABA frío (0.83 µCi, 0.5 µM) para los experimentos de liberación de GABA; o una mezcla de dopamina marcada y dopamina fría (2 µCi, 0.25 µM) para los experimentos de liberación de dopamina. En estas condiciones se incubó la preparación durante otros 10 minutos más a la misma temperatura con el objeto de que los sistemas de alta afinidad dependientes de Na<sup>+</sup> y temperatura, que están localizados en los sinaptosomas, captaran al neurotransmisor respectivo marcado radioactivamente. Una vez captado el neurotransmisor se procedió a estudiar su liberación bajo diferentes condiciones experimentales.

##### 5. Liberación del Neurotransmisor

Para estudiar la liberación de <sup>3</sup>H-GABA y de <sup>3</sup>H-dopamina se siguió el método de perfusión continua descrito previamente en Tapia y Sitges (1982). Así, al finalizar la incubación, se depositaron alícuotas de aproximadamente 250 µg de proteína sinaptosomal cargadas



con el neurotransmisor radioactivo sobre los filtros microporosos de 0.65  $\mu\text{m}$ . Para eliminar la radioactividad que no había sido incorporada a la preparación, se procedió a realizar un lavado al hacer pasar la solución de Ringer que fue empleada para la perfusión inicial a un flujo rápido (1 ml/minuto) durante 10 o 12 min, con ayuda de la bomba peristáltica. Después de este tiempo de lavado, se procedió a coleccionar cada minuto el perfusado proveniente de cada cámara, durante 6 minutos. Al cabo de este tiempo el medio de perfusión fué reemplazado por el mismo medio de perfusión (control) o por éste en presencia de la variable molecular de prueba. La perfusión después del cambio se continuó durante cuando menos 8 minutos más.

Una vez concluida la perfusión de la preparación con los diferentes medios y para la detección del transmisor radioactivo liberado, se añadieron 5 ml del líquido de centelleo, tritosol (Fricke 1975) a cada una de las fracciones recolectadas. La radioactividad contenida en las fracciones recolectadas cada minuto, así como la contenida en los sinaptosomas retenidos en cada uno de los filtros, fue cuantificada en un contador Beckman de centelleo líquido.

Como el sistema de perfusión cuenta con varias cámaras dispuestas en paralelo, los efectos de los diferentes tratamientos que estimulan la liberación de transmisores al despolarizar la membrana sinaptosomal o bien al incrementar la permeabilidad a algún ión en ausencia y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, así como los efectos del verapamil, de los neurotransmisores no marcados o bien de los bloqueadores de su recaptura sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA o de  $^3\text{H}$ -dopamina, se pueden comparar en alícuotas de una misma preparación sinaptosomal.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida por despolarización con $K^+$ alto en ausencia y presencia de $Ca^{2+}$ externo

De acuerdo con la hipótesis del  $Ca^{2+}$ , cuando las terminales son despolarizadas, los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje se activan y dan acceso al  $Ca^{2+}$  extracelular, el cual de acuerdo a su gradiente electroquímico, aumenta transitoriamente la concentración intraterminal de  $Ca^{2+}$  que precede a la liberación del neurotransmisor. Así, si el verapamil inhibiera la liberación de los neurotransmisores mediante sus efectos antagónicos sobre los canales de  $Ca^{2+}$ , esperaríamos que inhibiera la liberación dependiente de  $Ca^{2+}$  externo estimulada por despolarización con  $K^+$  alto. La figura 1 muestra que la liberación de GABA inducida por  $K^+$  alto presenta un componente independiente y un componente dependiente de  $Ca^{2+}$  externo (Sitges 1989b). El verapamil (20  $\mu M$ ) inhibe ambos componentes de la liberación de GABA inducida por  $K^+$  alto. Como el verapamil no inhibió selectivamente la liberación dependiente de  $Ca^{2+}$  inducida por  $K^+$  alto, sino que también inhibió la respuesta que el  $K^+$  alto induce en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, es difícil suponer que los efectos del verapamil sobre la liberación de GABA estén relacionados con un bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje.

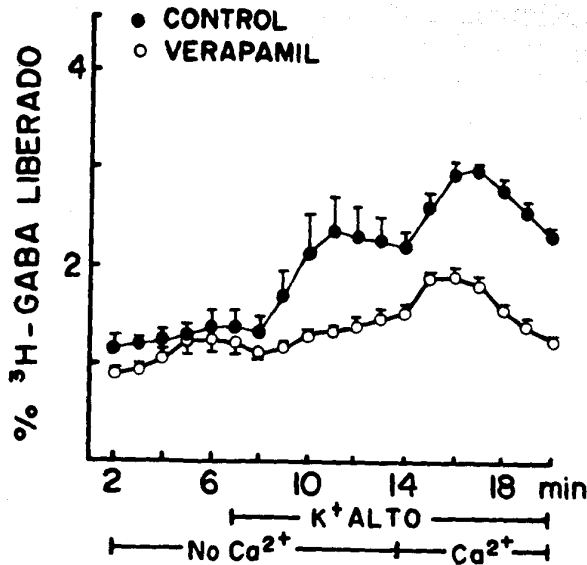


Fig 1. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida por despolarización con K<sup>+</sup> alto en ausencia y en presencia de Ca<sup>2+</sup> externo. Los sinaptosomas purificados a partir de cerebro completo de ratón fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con <sup>3</sup>H-GABA (concentración final 0.83  $\mu$ Ci; 0.5  $\mu$ M) y perfundidos con un medio con o sin Ca<sup>2+</sup>, como se indica en las barras horizontales, en ausencia (●) o en presencia (○) de verapamil 20  $\mu$ M. A partir del minuto 7, los sinaptosomas fueron expuestos a un medio con una concentración alta de K<sup>+</sup> (37.3 mM) sin Ca<sup>2+</sup>. Del minuto 14 al 19, el Ca<sup>2+</sup> estaba presente en el medio de perfusión con K<sup>+</sup> alto. Los datos son la media  $\pm$  los errores estándar de 3 experimentos independientes. Las diferencias entre la respuesta independiente de Ca<sup>2+</sup> inducida por K<sup>+</sup> alto en ausencia y en presencia de verapamil fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Las diferencias entre la liberación de <sup>3</sup>H-GABA dependiente de Ca<sup>2+</sup> inducida por K<sup>+</sup> alto en presencia y en ausencia de verapamil fueron significativas ( $p < 0.0005$ ). El porcentaje de <sup>3</sup>H-GABA liberado, para esta y las siguientes figuras, se calculó como porcentaje liberado por minuto de la radioactividad total.

Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida con veratrina en ausencia y presencia de  $Ca^{2+}$  externo

Ciertos alcaloides esteroidales neurotóxicos de origen natural como la veratrina, también nos permiten despolarizar a las terminales presinápticas y estimular la liberación de los neurotransmisores. En sinaptosomas, la veratrina aumenta la permeabilidad al  $Na^+$  (Krueger y Blaustein 1980, Sitges y col. 1987) y tiene la ventaja de que estimula la liberación de transmisores en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo (Adam-Vizi y Ligeti 1984, Sitges y col. 1987), lo cual nos permite eliminar la participación de los mecanismos que inducen la liberación de transmisores tras la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje. La figura 2 muestra que el verapamil inhibe la liberación de  $^3H$ -GABA estimulada con veratrina tanto en presencia como en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo. Estos datos podrían sugerir que la interacción del verapamil con la membrana sinaptosomal, modifica el comportamiento de los canales de  $Na^+$  a los que se une la veratrina o modifica algún acontecimiento molecular desencadenado por la veratrina, pero difícilmente podrían sugerir un efecto antagonista sobre los canales de  $Ca^{2+}$ , ya que en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo se elimina la liberación inducida por la entrada de este ión a través de los canales de  $Ca^{2+}$ . En este contexto es interesante mencionar que en células aisladas de la "parte intermedia" del cerebro de la rata, el verapamil, el D-600 y la nifedipina, reducen la amplitud de las espigas de  $Na^+$  y tienen poco efecto so-

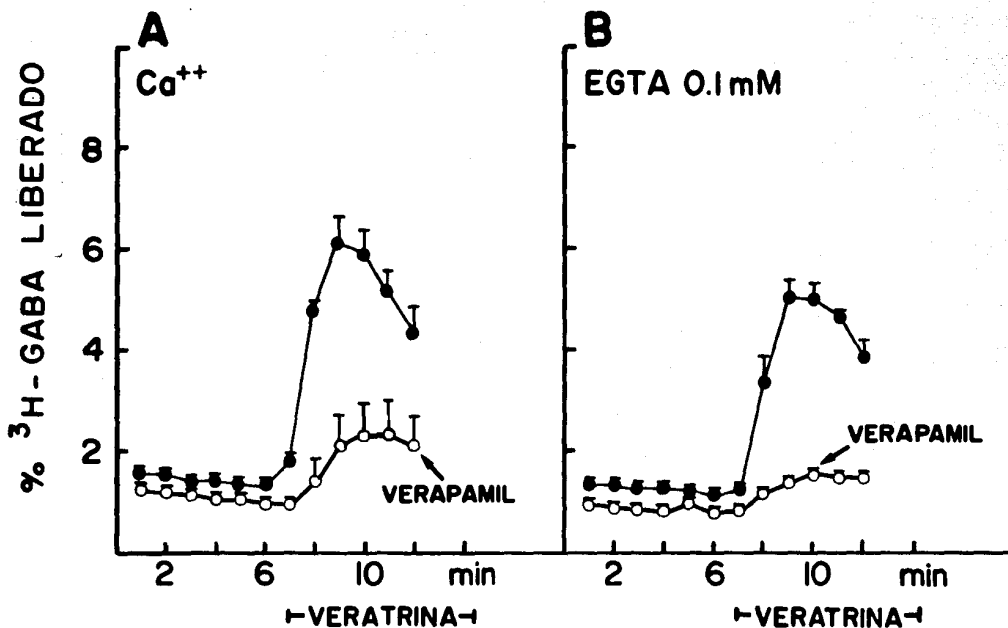


Fig 2. Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida con veratrina en ausencia y en presencia de  $Ca^{2+}$  externo. Los sinaptosomas purificados a partir de cerebro de ratón fueron incubados a  $37^{\circ}C$  por 10 minutos con  $^3H$ -GABA y perfundidos en presencia de  $Ca^{2+}$  (● en A), en ausencia de  $Ca^{2+}$  (● en B); en presencia de  $Ca^{2+}$  y verapamil  $20 \mu M$  (○ en A) o en ausencia de  $Ca^{2+}$  y presencia de verapamil  $20 \mu M$  (○ en B). Del minuto 7 al 12 el medio de perfusión contenía veratrina en una concentración de  $20 \mu g/ml$ , como lo indica la barra horizontal. Los datos son la media  $\pm$  los errores estándar de 3 experimentos independientes.

bre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje (Douglas y Taraskevich 1982).

Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , A-23187

Ya que los datos anteriores sugieren que el verapamil no actúa a través de un bloqueo directo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y si tomamos en cuenta que el verapamil es liposoluble, sus efectos sobre la liberación de GABA podrían estar relacionados con una inhibición de los movimientos internos del  $\text{Ca}^{2+}$  o de su unión a algún sitio intraterminal. Con la intención de explorar esta hipótesis, decidimos estudiar el efecto del verapamil sobre la liberación de GABA estimulada con A-23187. Este ionóforo, forma un complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  externo y permite su paso a través de la membrana plasmática. Así, el A-23187 aumenta artificialmente la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  pero no involucra a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En consecuencia, si el verapamil inhibiera la liberación antagonizando los acontecimientos que desencadena el  $\text{Ca}^{2+}$  tras su internalización, esperaríamos que el verapamil inhibiera la liberación del transmisor inducida con A-23187. La figura 3 muestra que la liberación de GABA inducida por A-23187 ( $5 \mu\text{M}$ ), que es totalmente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, no es inhibida en presencia de verapamil. Este resultado sugiere que los efectos del verapamil sobre la liberación de GABA antes observados (Fig 1 y 2) no están relacionados con un antagonismo por verapamil del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

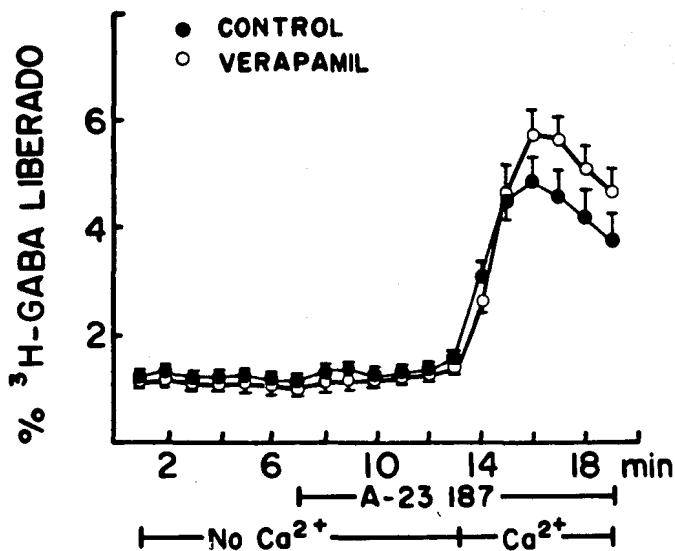


Fig 3. Efecto del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , A-23187. Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón fueron cargados con  $^3\text{H}$ -GABA y perfundidos con un Ringer con o sin  $\text{Ca}^{2+}$ , como se indica en las barras horizontales, y en ausencia (●) o en presencia de verapamil 20  $\mu\text{M}$  (○). El A-23187 (5  $\mu\text{M}$ ) estaba presente en el medio de perfusión a partir del minuto 7. Los datos son la media  $\pm$  los errores estándar de 3 experimentos independientes. Las diferencias entre la respuesta inducida por el A-23187 en ausencia (●) y en presencia de verapamil 20  $\mu\text{M}$  (○) no fueron significativas.

Efecto del verapamil sobre la liberación de GABA independiente de  $Ca^{2+}$  inducida con el ionóforo de  $Na^+$ , monensina

Con el propósito de seguir explorando la posibilidad de que las acciones del verapamil sobre la liberación de GABA estuvieran relacionadas con efectos intraterminales, tras su internalización a la terminal presináptica, también se estudió el efecto del verapamil sobre la liberación de GABA estimulada con el ionóforo de  $Na^+$  monensina. La figura 4 muestra que el verapamil no modifica la liberación de GABA independiente de  $Ca^{2+}$  externo estimulada con monensina. Aunque se ha demostrado que tanto la monensina como la veratrina incrementan la permeabilidad al  $Na^+$  en sinaptosomas (Sitges y col. 1987), estimulan la liberación de GABA en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo y ambas requieren de la presencia de  $Na^+$  externo (Sitges 1989a) el verapamil sólo inhibe la liberación inducida por veratrina (Fig 2) mientras que no altera la inducida por monensina (Fig 4). A diferencia de la veratrina, la monensina no estimula la liberación de GABA, mediante su interacción con los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje de las terminales nerviosas, pues es un ionóforo de  $Na^+$  y por lo tanto lo internaliza en forma de complejo. Además, la liberación de GABA inducida por monensina no se bloquea con tetrodotoxina (Sitges 1989a). La comparación del efecto del verapamil sobre la liberación de GABA inducida por veratrina y por monensina, nos permite sugerir que el efecto inhibitorio del verapamil sobre la respuesta a veratrina, no está relacionado con una acción intraterminal desencadenada posteriormente a la entrada de  $Na^+$ , siempre y cuando, el  $Na^+$  trans-



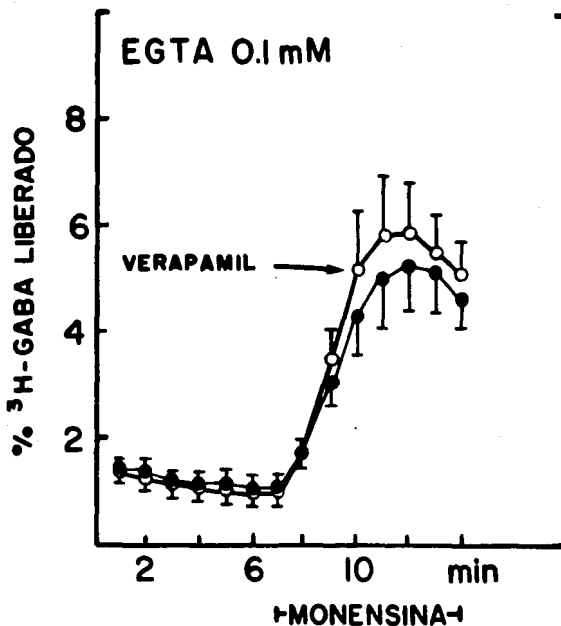


Fig 4. Efecto del verapamil sobre la liberación de <sup>3</sup>H-GABA independiente de Ca<sup>2+</sup> estimulada con el ionóforo de Na<sup>+</sup> monensina. Los sinaptosomas puros de cerebro de ratón previamente incubados con GABA radioactivo, se perfundieron con un Ringer libre de Ca<sup>2+</sup> en ausencia (●) y en presencia (○) de verapamil 20 μM. A partir del minuto 7, el Ringer de perfusión también contenía monensina 10 μM. Los valores son la media ± los errores estándar de 7 experimentos independientes.

portado por la veratrina y la monensina hacia el citoplasma sea internalizado y distribuido en la misma proporción.

Una interacción inespecífica del verapamil con los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, también podría explicar el efecto inhibitorio del verapamil sobre la liberación de GABA inducida con veratrina. Sin embargo, el verapamil también inhibe la respuesta a  $\text{K}^+$  alto, que no está mediada por los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, ya que la liberación de GABA inducida por  $\text{K}^+$  alto no se altera con tetrodotoxina (datos no mostrados). No obstante estos resultados hacen difícil proponer una acción inespecífica del verapamil sobre los canales de  $\text{Na}^+$ , como explicación a sus efectos sobre la liberación de transmisores, las evidencias hasta aquí presentadas, hacen más difícil proponer que el verapamil afecta la liberación de GABA mediante un bloqueo directo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.

Efecto del verapamil sobre la radioactividad total (\*) de dopamina

Con objeto de ampliar la caracterización del efecto del verapamil sobre la liberación de otros neurotransmisores, decidimos estudiar el efecto de este antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la liberación de dopamina estimulada con veratrina, ya que Levi y col. (1980), encontraron que la veratrina aumenta la liberación de neurotransmisores

radioactividad total ( $^3\text{H}$ -GABA total o  $^3\text{H}$ -dopamina total) es la radioactividad retenida por los sinaptosomas incubados con el transmisor tritiado después del periodo de lavado.

aminoácidos como el GABA, en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, pero requiere de la presencia de  $Ca^{2+}$  externo para estimular la liberación de dopamina. Sin embargo, encontramos que antes de estimular la liberación de  $^3H$ -dopamina con veratrina, la presencia del verapamil (20  $\mu M$ ) en el medio de lavado ya había disminuido 50% la cantidad de  $^3H$ -dopamina contenida en los sinaptosomas. Contrariamente, el  $^3H$ -GABA contenido en los sinaptosomas expuestos al verapamil durante el período de lavado, nunca había resultado significativamente diferente al  $^3H$ -GABA contenido en los sinaptosomas control. Estos datos se ilustran en la figura 5, que muestra que la radioactividad total contenida en los sinaptosomas control y en los expuestos al verapamil no es significativamente diferente en el caso de los sinaptosomas cargados con  $^3H$ -GABA, mientras que la radioactividad total de  $^3H$ -dopamina disminuyó aproximadamente un 50% en los sinaptosomas expuestos al verapamil.

Como los efectos terapéuticos de muchos antidepresivos se atribuyen a la inhibición de la recaptura de las aminas biogénicas por las terminales nerviosas, comparamos la  $^3H$ -dopamina total de los sinaptosomas lavados con el bloqueador específico de la recaptura de dopamina, bupropion, con la  $^3H$ -dopamina total de los sinaptosomas lavados con verapamil (utilizamos una concentración final de bupropion 0.1 mM porque aunque es el único inhibidor específico de la recaptura de dopamina, es poco potente (Richelson y Pfennig 1984). En la figura 6 se muestra que el bupropion disminuye la  $^3H$ -dopamina total en un 26%, y el verapamil en un 55%.

□ CONTROL  
■ VERAPAMIL

- 40 -

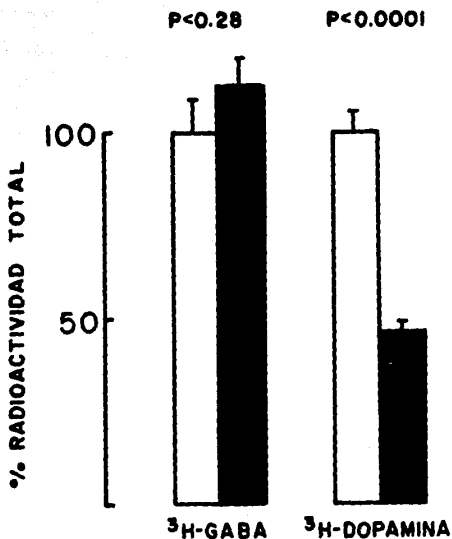


Fig 5. Efecto del verapamil sobre la liberación de dopamina. Los sinaptosomas purificados a partir de cerebro completo de ratón, o de cuerpo estriado de rata, fueron incubados durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia de  $^3\text{H-GABA}$  ( $0.83 \mu\text{Ci}; 0.5 \mu\text{M}$ ) o de  $^3\text{H-dopamina}$  ( $2 \mu\text{Ci}; 2 \mu\text{M}$ ), respectivamente. Las barras blancas representan la radioactividad total de los sinaptosomas control que se expresa como 100%, y las barras negras representan la radioactividad total, expresada como porcentaje del control, de los sinaptosomas expuestos a verapamil  $20 \mu\text{M}$ . Los sinaptosomas incubados con  $^3\text{H-GABA}$  o con  $^3\text{H-dopamina}$  respectivamente, se perfundieron en ausencia (control) o en presencia de verapamil durante el período de lavado. La diferencia entre la radioactividad total de los sinaptosomas incubados con  $^3\text{H-GABA}$  y perfundidos en ausencia y presencia de verapamil no fue significativa ( $p < 0.28$ ). En cambio, la diferencia entre la radioactividad total de los sinaptosomas incubados con  $^3\text{H-dopamina}$  y perfundidos en ausencia o en presencia de verapamil sí fue significativa ( $p < 0.0001$ ). Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de 10 determinaciones independientes para  $^3\text{H-GABA}$  y 5 determinaciones para  $^3\text{H-dopamina}$ .

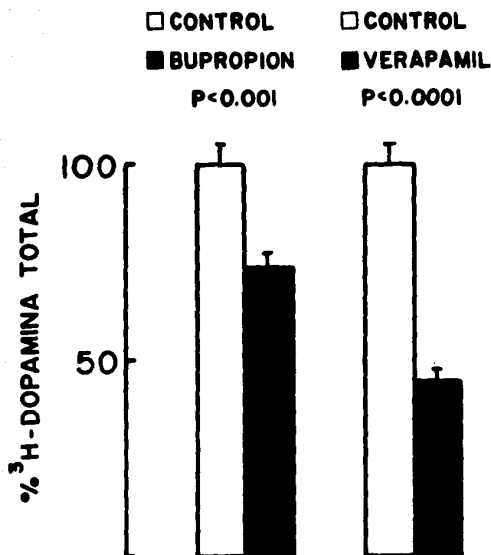


Fig 6. Efecto del verapamil y del bupropion sobre la <sup>3</sup>H-dopamina total durante el periodo de lavado. Los sinaptosomas puros del estriado de rata fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con <sup>3</sup>H-dopamina y perfundidos en ausencia (control) o en presencia de bupropion 100 µM o de verapamil 20 µM, durante el periodo de lavado, como se indica en la figura 5. La diferencia entre la <sup>3</sup>H-dopamina total de los sinaptosomas perfundidos en ausencia y en presencia de bupropion fue significativa (p < 0.001) y la diferencia entre la <sup>3</sup>H-dopamina total de los sinaptosomas perfundidos en ausencia y en presencia de verapamil también fue significativa. Los resultados son la media ± los errores estándar de por lo menos 5 determinaciones independientes.

También comparamos el  $^3\text{H}$ -GABA total de los sinaptosomas lavados con el bloqueador específico de la recaptura de GABA, el 2,4 diaminobutirato (DABA) con el  $^3\text{H}$ -GABA total de los sinaptosomas lavados con verapamil. La figura 7 muestra que la presencia de DABA en el lavado, disminuyó en un 26% al  $^3\text{H}$ -GABA total y que la presencia de verapamil no lo modificó significativamente.

Estos resultados podrían sugerir que el verapamil es un inhibidor eficaz de la recaptura de dopamina, pero también podrían deberse a un efecto estimulatorio de la liberación de dopamina en respuesta al verapamil.

Efecto del verapamil sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA y de  $^3\text{H}$ -dopamina de sinaptosomas de estriado

Los resultados de los efectos del verapamil sobre la liberación de GABA antes presentados se obtuvieron en sinaptosomas de cerebro completo de ratón. Sin embargo en los estudios en los que se midió la radioactividad total de  $^3\text{H}$ -dopamina en presencia de verapamil y de bupropion (Figs 5 y 6) se utilizaron sinaptosomas de estriado de rata. Como el verapamil no modificó ni la radioactividad total ni la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA en los sinaptosomas de cerebro completo de ratón, decidimos estudiar el efecto del verapamil sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA y de  $^3\text{H}$ -dopamina, de alícuotas de la misma preparación sinaptosomal, ya que el estriado también contiene terminales gabaérgicas, que permiten estudiar la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA en sinaptosomas purificados a partir de esta estructura. La figura 8 muestra

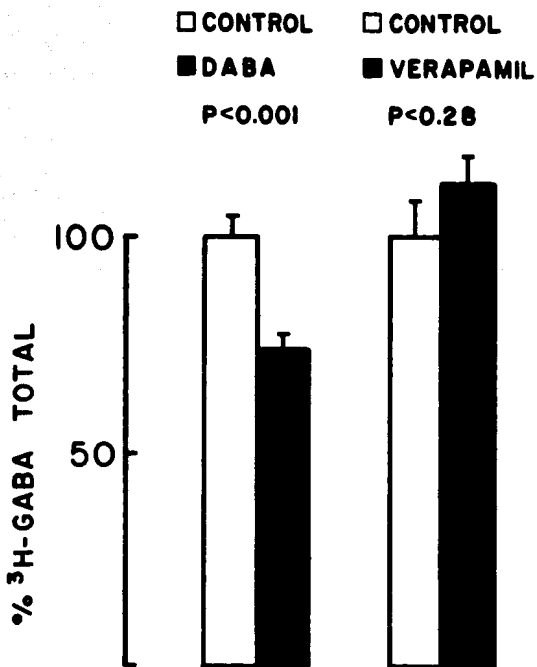


Fig 7. Efecto del DABA y del verapamil sobre el  $^3\text{H}$ -GABA total durante el periodo de lavado. Los sinaptosomas purificados a partir de cerebro de ratón fueron incubados con  $^3\text{H}$ -GABA y perfundidos en ausencia (control) o en presencia de DABA 100  $\mu\text{M}$  o de verapamil 20  $\mu\text{M}$ , durante el periodo de lavado. La diferencia entre el  $^3\text{H}$ -GABA total de los sinaptosomas perfundidos en ausencia y en presencia de DABA fue significativa ( $p < 0.001$ ), mientras que la diferencia entre el  $^3\text{H}$ -GABA total de los sinaptosomas perfundidos en ausencia o en presencia de verapamil no fue significativa ( $p < 0.28$ ). Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de por lo menos 9 determinaciones independientes.

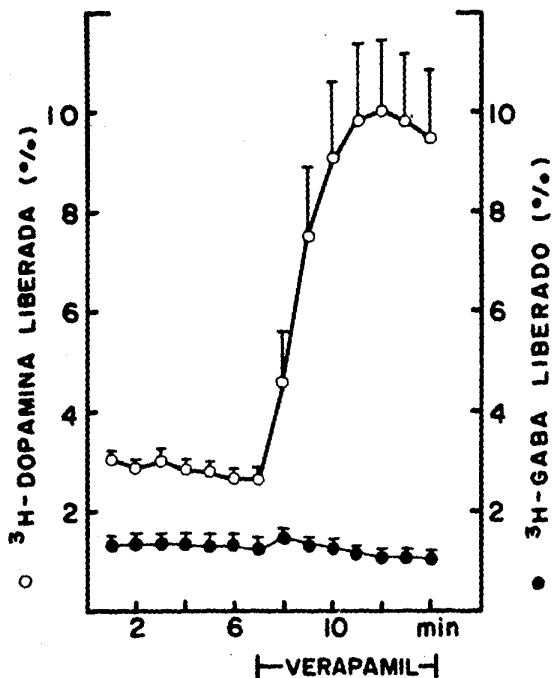


Fig 8. Efecto del verapamil sobre la liberación basal de <sup>3</sup>H-GABA y de <sup>3</sup>H-dopamina de sinaptosomas del estriado. Los sinaptosomas de estriado de rata fueron incubados durante 10 minutos a 37°C, en presencia de <sup>3</sup>H-GABA o de <sup>3</sup>H-dopamina respectivamente, y perfundidos con un Ringer de composición normal. Después de 7 minutos de una liberación basal estable, los sinaptosomas cargados con dopamina (O) o con GABA (●) fueron expuestos a un Ringer normal que contenía verapamil a una concentración de 20 µM. Los resultados son la media ± los errores estándar de 4 experimentos independientes.



que, en sinaptosomas purificados de estriado de rata, el verapamil no afecta la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA mientras que aumenta considerablemente la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina.

Efecto del DABA y del bupropion sobre la liberación basal de GABA y de dopamina

Como el bloqueador selectivo de la recaptura de GABA, el DABA, aumenta la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA de sinaptosomas de cerebro de ratón y el bloqueador selectivo de la recaptura de dopamina, el bupropion, aumenta la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina de sinaptosomas de estriado de rata (Fig 9), el hallazgo de que el verapamil aumenta la liberación basal de dopamina, podría también sugerir que el verapamil estuviera inhibiendo la recaptura de esta monoamina cerebral. En consecuencia era necesario encontrar una estrategia para distinguir entre los efectos mediados por estimulación de la liberación del neurotransmisor y los mediados por inhibición de su recaptura.

Homointercambio de aminoácidos transmisores

El fenómeno de homointercambio descrito exclusivamente para aminoácidos transmisores, consiste en estimular la liberación del neurotransmisor radioactivo previamente captado por la preparación, con un exceso del mismo transmisor no radioactivo. Este fenómeno se dice que está mediado por el acarreador que recaptura al aminoácido transmisor ya que se bloquea en presencia de inhibidores selectivos

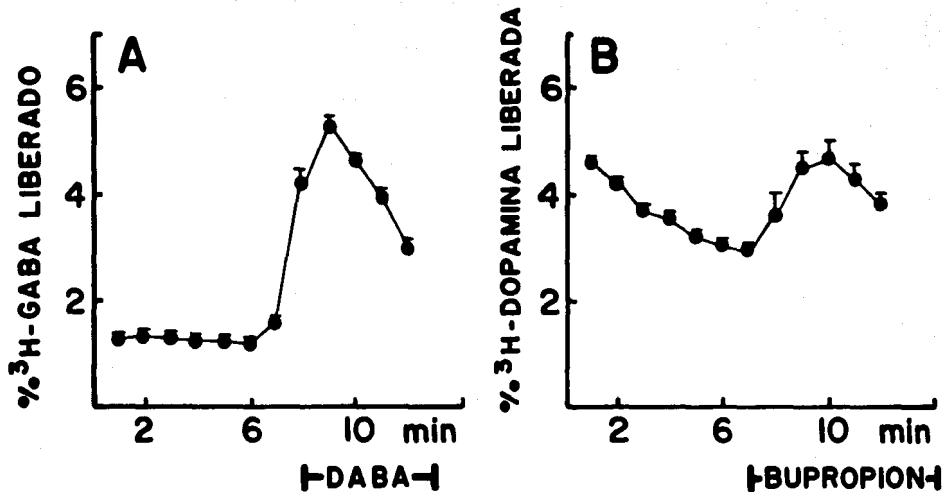


Fig 9. Efecto del DABA y del bupropion sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA y de  $^3\text{H}$ -dopamina. Los sinaptosomas purificados a partir de cerebro de ratón o del estriado de rata fueron incubados durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de  $^3\text{H}$ -GABA o de  $^3\text{H}$ -dopamina respectivamente, y perfundidos con un Ringer normal. A partir del minuto 7, el Ringer contenía además DABA  $100\ \mu\text{M}$  (en A) o bupropion  $100\ \mu\text{M}$  (en B). Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de 3 determinaciones independientes en A y de 6 determinaciones en B.

de su recaptura (Levi y col. 1976, Levi y Raiteri 1978). La figura 10 muestra el incremento en la liberación del  $^3\text{H}$ -GABA previamente captado por los sinaptosomas de cerebro de ratón, cuando éstos son expuestos a un exceso de GABA frío ( $10\ \mu\text{M}$ ). En la figura 10, también se ilustra que la presencia del bloqueador selectivo de la recaptura de GABA, el DABA, impide la estimulación de la liberación inducida por homointercambio.

#### Homointercambio de dopamina

Como la liberación de GABA no mediada por homointercambio, es decir, la estimulada con  $\text{K}^+$  alto o con veratridina, no es inhibida en presencia de DABA (Levi y col. 1976), el homointercambio podría representar una buena estrategia para explorar si un aumento en la liberación de un neurotransmisor está o no mediado por una inhibición de su recaptura. Aunque el fenómeno de homointercambio no ha sido estudiado en el caso de las aminas biogénicas neurotransmisoras, es evidente que éstas son captadas por las terminales nerviosas (Richelson y Pfenning 1984).

Con el propósito de encontrar una manera de distinguir si el efecto del verapamil sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina, estaba relacionado con una inhibición de su recaptura o con una estimulación de su liberación, empezamos por probar si el fenómeno de homointercambio también se manifestaba con esta amina biogénica. Sorpresivamente, la presencia de dopamina fría  $10\ \mu\text{M}$ , estimuló notable-

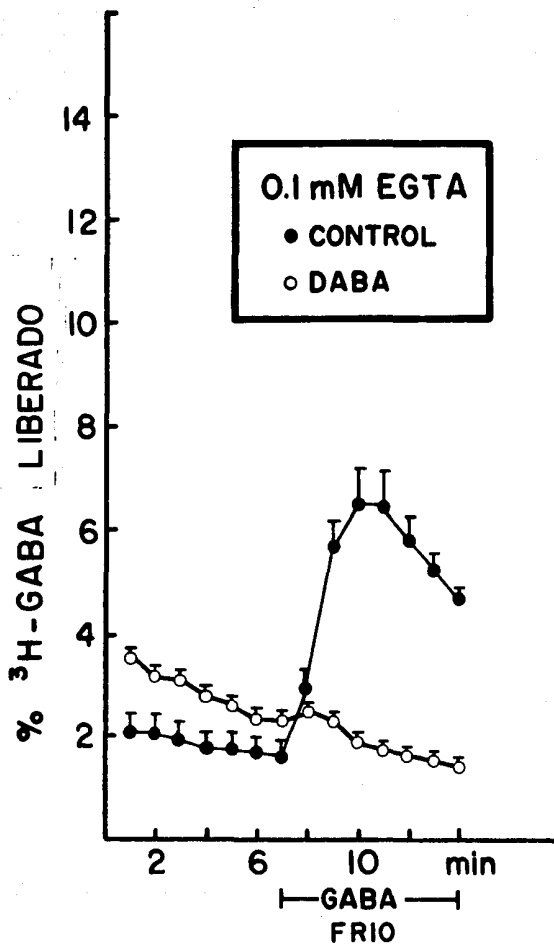


Fig 10. Efecto del DABA sobre la liberación de <sup>3</sup>H-GABA estimulada por homointercambio con GABA frio. Los sinaptosomas de cerebro de ratón fueron incubados con <sup>3</sup>H-GABA y perfundidos con un Ringer libre de Ca<sup>2+</sup>, que contenía EGTA 100 μM, en ausencia (●) o en presencia (○) de DABA 100 μM. Del minuto 7 al 14, el Ringer de perfusión también contenía GABA frio 10 μM. Los resultados son la media ± los errores estándar de 4 experimentos independientes.

mente la salida de la dopamina radioactiva previamente captada, por la preparación (Fig 11).

En sinaptosomas de cobayo Sihra y Nicholls (1987), encontraron que cuando los sinaptosomas son incubados con el transmisor radioactivo por periodos largos, mayores a 60 minutos, la liberación de  $^{14}\text{C}$ -GABA estimulada con  $\text{K}^+$  alto aumenta su dependencia por el  $\text{Ca}^{2+}$  externo. En sinaptosomas incubados por periodos cortos, de 5 minutos, dichos autores encontraron que la liberación de  $^{14}\text{C}$ -GABA estimulada con  $\text{K}^+$  alto era independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Con base en estos resultados concluyen que el  $^{14}\text{C}$ -GABA liberado de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , proviene de la poza vesiculada y el que no requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, proviene de una poza citosólica, que a tiempos cortos no llega a equilibrarse con la poza vesiculada. También proponen que la liberación independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a despolarizaciones, prolongadas ocurre por una reversión del acarreador de GABA. Como la dopamina es un neurotransmisor que se encuentra en vesículas, decidimos estudiar si la incubación prolongada de los sinaptosomas del estriado de rata con dopamina tritiada, modificaba la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina estimulada por dopamina fría  $10\ \mu\text{M}$ . La figura 12 muestra que la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina inducida por dopamina fría es ligeramente menor en los sinaptosomas incubados durante 60 minutos que en los incubados durante 10 minutos.

Como el inhibidor de la recaptura de GABA, el DABA, inhibe el homointercambio de GABA (Fig 10), decidimos estudiar si el bloqueador de la recaptura de dopamina, bupropion, inhibía la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina inducida por dopamina fría de sinaptosomas incubados du-

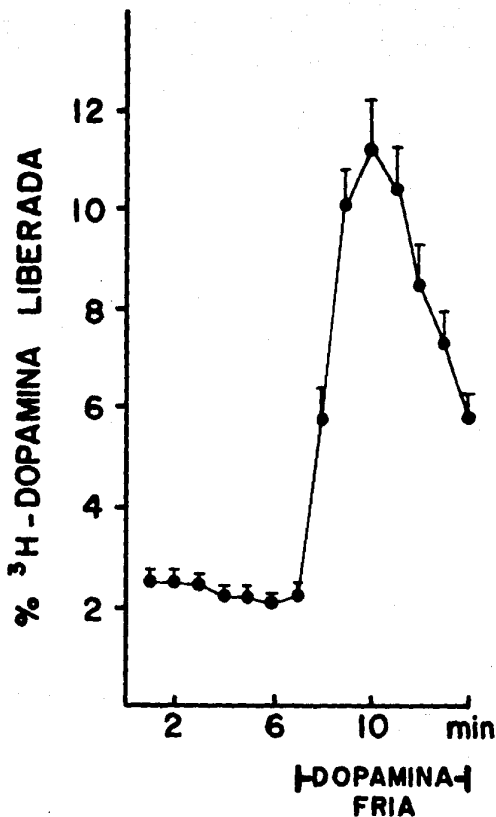


Fig 11. Homointercambio de dopamina. Los sinaptosomas purificados a partir del estriado de rata fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con <sup>3</sup>H-dopamina y perfundidos con un Ringer normal. A partir del minuto 7, el Ringer de perfusión también contenía dopamina fría 10 µM. Los resultados son la media ± los errores estándar de 5 experi-

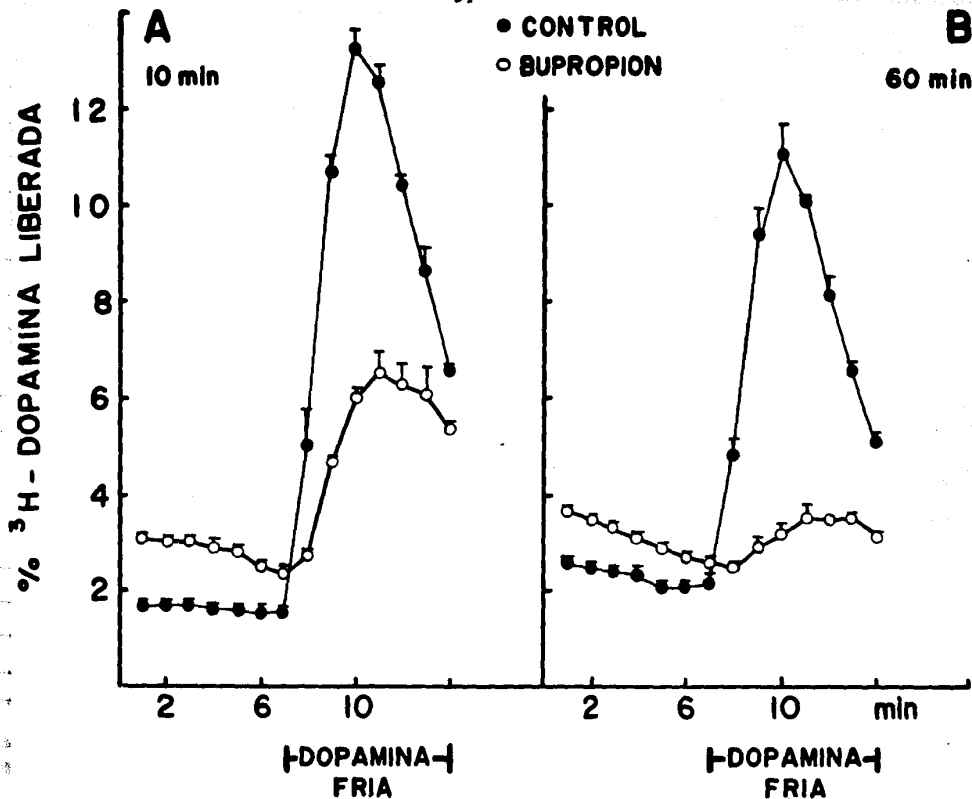


Fig 12. Efecto del bupropion sobre la liberación de <sup>3</sup>H-dopamina estimulada por homointercambio con dopamina fría. Los sinaptosomas del estriado de rata fueron incubados con <sup>3</sup>H-dopamina a 37°C durante 10 minutos (A) o durante 60 minutos (B) y perfundidos con un Ringer normal en ausencia (●) o en presencia (○) de bupropion 100 μM. Del minuto 7 al 14 el Ringer de perfusión también contenía dopamina fría 10 μM. Las diferencias entre la <sup>3</sup>H-dopamina liberada por homointercambio con dopamina fría en los 2 tiempos de incubación fueron significativas (p < 0.05 en los minutos del 11 al 14); de la misma forma, las diferencias entre la inhibición con bupropion de la respuesta de <sup>3</sup>H-dopamina estimulada por homointercambio en los 2 tiempos de incubación fueron significativas (p < 0.05 en los minutos del 9 al 13). Los resultados son la media ± los errores estándar de 2 determinaciones independientes.

rante 10 y 60 minutos. La figura 12 muestra que el bupropion es igualmente efectivo para inhibir el homointercambio de dopamina en los sinaptosomas incubados durante 10 y 60 minutos.

Así como el inhibidor de la recaptura de GABA, el DABA, inhibe el homointercambio de GABA, el bloqueador de la recaptura de dopamina, bupropion, inhibió el homointercambio de dopamina. Se ha propuesto que el fenómeno de homointercambio está mediado por el acarreador que fisiológicamente inactiva al neurotransmisor al recapturarlo de la hendidura sináptica. Si esto es así, esperaríamos que aquellos fármacos que actúan bloqueando selectivamente la recaptura de un neurotransmisor, inhibieran su homointercambio.

El verapamil no inhibe el homointercambio de dopamina

Para probar si el verapamil estimulaba la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina a través de un bloqueo de su recaptura, como lo hace el bupropion, estudiamos el efecto del bupropion y del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina estimulada por homointercambio con dopamina fría. Estimulamos primero la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina con bupropion o con verapamil y sobre esta liberación probamos la estimulación con dopamina fría. De esta forma tratamos de disminuir la pérdida de radioactividad causada por el bupropion y el verapamil cuando son añadidos desde el lavado. La figura 13 muestra que el bupropion inhibe la liberación inducida por homointercambio con  $10\ \mu\text{M}$  de dopamina fría. No obstante, este inhibidor selectivo de la recaptura de dopamina, incrementa por sí mismo la radioactividad liberada



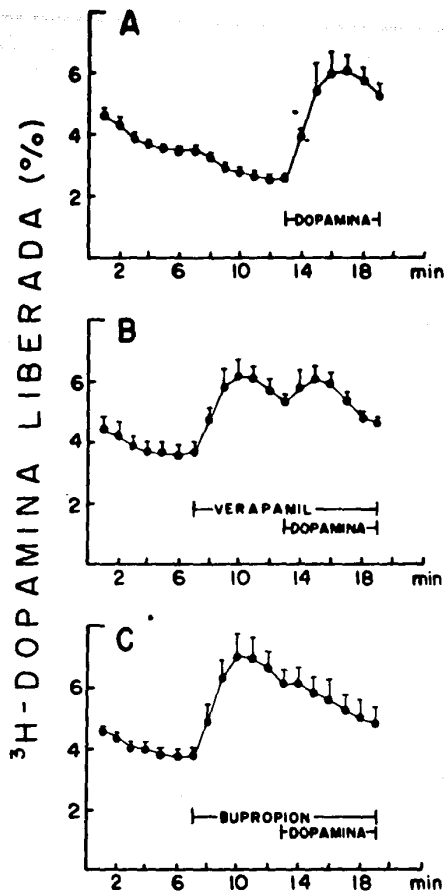


Fig 13. Efecto del verapamil y del bupropion sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina estimulada por homointercambio con dopamina fría. Los sinaptosomas del estriado de rata fueron incubados con  $^3\text{H}$ -dopamina durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y perfundidos con un Ringer normal. A partir del minuto 7 el Ringer normal (A, control) fue sustituido por un Ringer normal que contenía bupropion  $300 \mu\text{M}$  o por un Ringer normal que contenía verapamil  $20 \mu\text{M}$  (C). Del minuto 13 al 19 cada medio también contenía dopamina fría  $10 \mu\text{M}$ . Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de 3 experimentos independientes por duplicado.

(Fig 13B). En contraste, la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina inducida por homointercambio con dopamina fría, se sobrepone al incremento en la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina en respuesta al verapamil (Fig 13C). Estos datos sugieren que, a diferencia del bupropion, el verapamil no estimula la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina mediante la inhibición de la recaptura del transmisor.

Efecto del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina estimulada con veratrina

Con el fin de seguir caracterizando el efecto del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina y en vista de que el verapamil afectó de forma diferente la liberación basal de  $^3\text{H}$ -GABA y de  $^3\text{H}$ -dopamina (Fig 8), decidimos probar el efecto de este antagonista de calcio sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina y de  $^3\text{H}$ -GABA, estimuladas con veratrina en sinaptosomas de estriado de rata, ya que el verapamil inhibió la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA estimulada con veratrina en sinaptosomas de cerebro de ratón, cuando se añadió desde el lavado. En la figura 14 se muestra el efecto opuesto del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina y de  $^3\text{H}$ -GABA estimulada con veratrina en sinaptosomas del estriado de rata. Aunque el verapamil añadido desde el lavado es un poco más efectivo para inhibir la liberación de GABA (comparar Fig 2A con Fig 14B), el verapamil añadido simultáneamente con la veratrina también inhibe significativamente la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA, mientras que estimula considerablemente la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina en respuesta a veratrina.

● CONTROL

○ VERAPAMIL

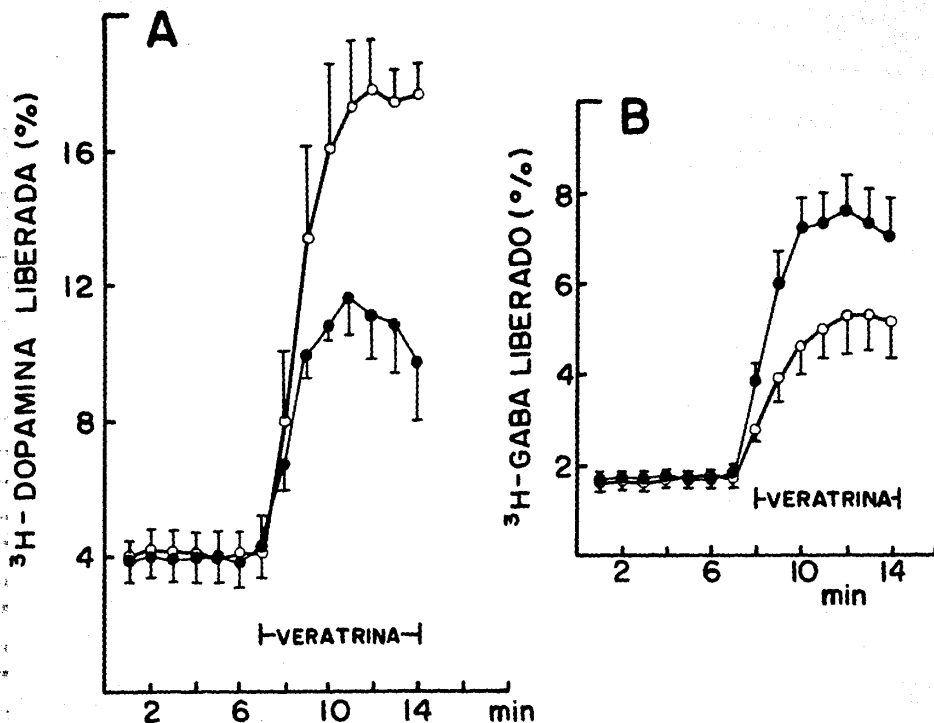


Fig 14. Efecto del verapamil sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina y de  $^3\text{H}$ -GABA estimuladas con veratrina. Los sinaptosomas del estriado de rata fueron incubados durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con  $^3\text{H}$ -dopamina (A) o con  $^3\text{H}$ -GABA (B) y perfundidos con un Ringer normal. A partir del minuto 7, el Ringer también contenía veratrina  $20 \mu\text{g/ml}$  (●) o bien la misma dosis de veratrina más verapamil  $20 \mu\text{M}$  (○). Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de 4 experimentos independientes en A y de 3 experimentos independientes por duplicado en B.

Como se ha evidenciado en los resultados de las figuras 5, 8 y 14, el verapamil tiene efectos opuestos sobre la liberación basal y estimulada de  $^3\text{H}$ -GABA y de  $^3\text{H}$ -dopamina. Estos efectos opuestos podrían explicarse si el verapamil estuviera afectando la liberación de ambos neurotransmisores a través de mecanismos diferentes. Con el propósito de estudiar esta posibilidad, realizamos una curva de inhibición de la liberación de GABA en respuesta a la estimulación con veratrina, por concentraciones crecientes de verapamil, y una curva del efecto de concentraciones crecientes de verapamil sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina.

Inhibición por verapamil de la liberación de GABA estimulada con veratrina

En la figura 15 se muestra la curva de inhibición por verapamil de la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA en respuesta a veratrina. En esta curva encontramos que la concentración de verapamil que causa el 50% de inhibición de la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA inducida con veratrina es 25  $\mu\text{M}$ , este valor es similar al valor  $\text{IC}_{50}$  (22 $\mu\text{M}$ ) reportado por Carvalho y col. (1986b), para la liberación de GABA inducida por potasio alto en sinaptosomas.

## INHIBICION POR VERAPAMIL DE LA RESPUESTA A VERATRINA

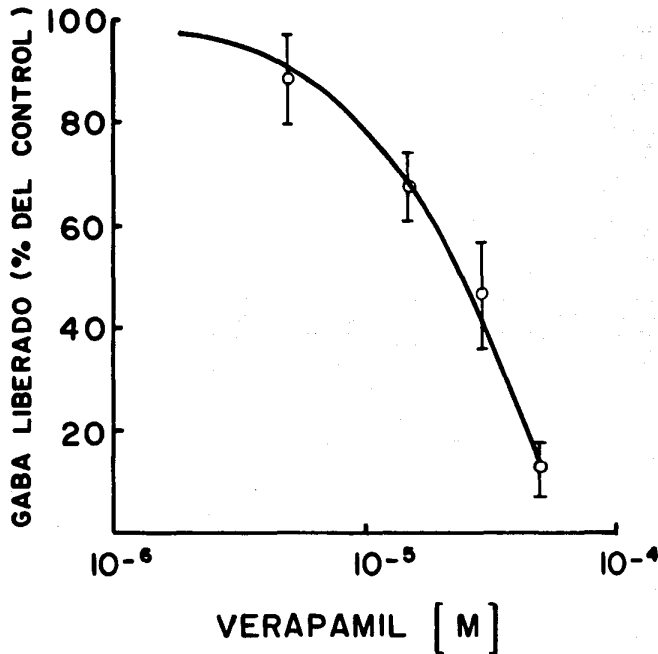


Fig 15. Curva de inhibición por verapamil de la respuesta de <sup>3</sup>H-GABA a veratrina. Los sinaptosomas purificados de cerebro completo de ratón fueron incubados durante 10 minutos a 37°C con <sup>3</sup>H-GABA y perfundidos con un Ringer normal que contenía verapamil en dosis de 5, 15, 30 y 50  $\mu$ M respectivamente. Durante los últimos 8 minutos de perfusión, el Ringer contenía además veratridina 20  $\mu$ M. Los puntos en la curva representan el porcentaje de <sup>3</sup>H-GABA liberado con cada concentración de verapamil, menos su liberación basal. El valor IC<sub>50</sub> encontrado para esta curva fue de 25  $\mu$ M. Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de 4 experimentos independientes.

El verapamil estimula la liberación basal de dopamina de manera dependiente de la dosis

En la figura 16 se muestra la curva dosis-respuesta del efecto del verapamil sobre la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina. En esta curva encontramos que la concentración de verapamil que estimula en un 50% la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina es de 4.5  $\mu\text{M}$ , este valor es diferente a la dosis efectiva media (25  $\mu\text{M}$ ) encontrada para la inhibición por verapamil de la liberación de GABA estimulada con veratrina, lo cual sugiere que el verapamil afecta la liberación de GABA y de dopamina a través de mecanismos diferentes, además, los efectos opuestos del verapamil sobre la liberación basal y estimulada de dopamina y de GABA, sugieren diferencias en los mecanismos subyacentes a la liberación de las aminas biogénicas y de los aminoácidos transmisores.

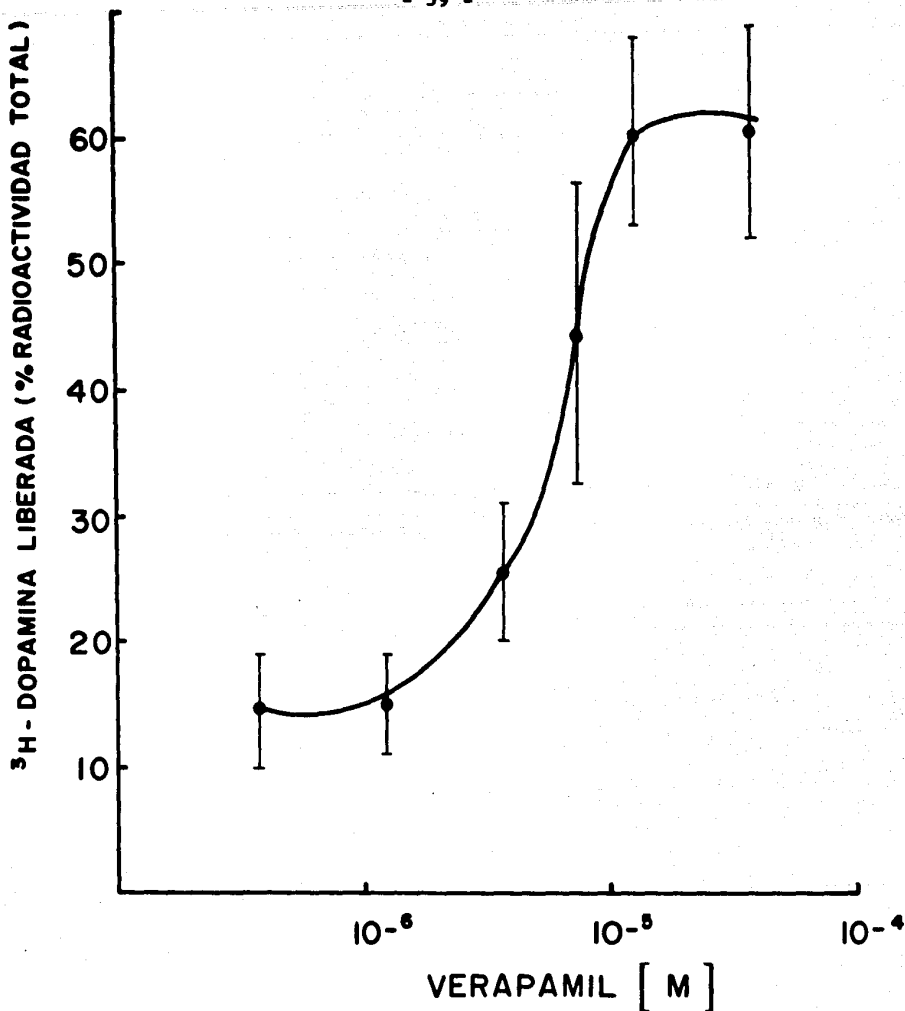


Fig 16. Curva dosis-respuesta del efecto del verapamil sobre la liberación basal de <sup>3</sup>H-dopamina. Los sinaptosomas del estriado de rata fueron incubados durante 10 minutos a 37°C con <sup>3</sup>H-dopamina y perfundidos con un Ringer normal. Durante los últimos 8 minutos de perfusión, el Ringer contenía verapamil a dosis de 0.375, 1.25, 3.75, 7.5, 12.5 y 37.5 μM respectivamente. Los puntos en la curva representan el porcentaje de <sup>3</sup>H-dopamina liberada con cada concentración de verapamil, menos su liberación basal. El valor EC<sub>50</sub> encontrado para esta curva fue de 4.5 μM. Los resultados son la media ± los errores estándar de 3 experimentos independientes.

## VI. CONCLUSIONES.

Los resultados de los efectos del verapamil sobre la liberación de transmisores en sinaptosomas presentados en este estudio, no se ajustan a los esperados de un bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje. La inhibición por verapamil de la liberación de GABA independiente de calcio que induce la veratrina, podría sugerir que la interacción del verapamil con la membrana sinaptosomal, modifica el comportamiento de los canales de  $\text{Na}^+$  a los que se une la veratrina o modifica algún evento molecular desencadenado por la veratrina pero, como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo se elimina la liberación inducida por la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , difícilmente podría sugerir un bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.

También es difícil proponer que el efecto inhibitorio del verapamil sobre la liberación de GABA inducida con veratrina, esté mediado por una interacción inespecífica del verapamil sobre los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, debido a que el verapamil también inhibe la liberación de GABA en respuesta a  $\text{K}^+$  alto, la cual no está mediada por los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje, ya que no es sensible a tetrodotoxina.

Otro argumento en contra de que el efecto del verapamil sobre la liberación estimulada de GABA se deba al bloqueo de los canales de calcio sensibles a voltaje, es que el verapamil, además de inhi-



bir la liberación de  $^3\text{H-GABA}$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{K}^+$  alto, también inhibe la respuesta que el  $\text{K}^+$  alto induce en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo.

Aunque la dosis efectiva media de verapamil necesaria para inhibir la liberación de GABA estimulada por  $\text{K}^+$  alto, que reportan Carvalho y col. (1986b) es de 22  $\mu\text{M}$ , valor muy similar al encontrado por nosotros para inhibir la liberación de GABA estimulada por veratridina (25  $\mu\text{M}$ ), las concentraciones de verapamil que bloquean la captura de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en sinaptosomas (Norris y col. 1983), están en el rango nanomolar. Como a las concentraciones nanomolares el verapamil no modifica la liberación de GABA estimulada por despolarización con  $\text{K}^+$  alto o con veratridina, esto tampoco sugiere que los efectos del verapamil sobre la liberación de GABA estén mediados por un bloqueo de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Aunque no podemos descartar que el verapamil, que es liposoluble, ejerza sus efectos sobre la liberación de GABA mediante una inhibición de los movimientos internos del  $\text{Ca}^{2+}$  o de su unión en algún sitio intraterminal, el hallazgo de que el verapamil no inhiba la liberación de GABA inducida por el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A-23187, hace difícil proponer que los efectos inhibitorios del verapamil sobre la liberación de GABA, estén relacionados con una acción antagonica del verapamil sobre la unión del calcio a sitios intraterminales que intervengan en el proceso de la liberación de los neurotransmisores. Asimismo, el hallazgo de que el verapamil inhiba la liberación de GABA inducida por veratrina, pero no inhiba la liberación inducida por monensina, nos permite sugerir que su efecto

inhibitorio sobre la respuesta a veratrina, no está relacionado con una acción intraterminal desencadenada posteriormente a la entrada de  $\text{Na}^+$ ; siempre y cuando el  $\text{Na}^+$  transportado por la veratrina y la monensina hacia el citoplasma se internalice y distribuya en la misma forma.

La estimulación de la liberación basal de dopamina que induce el verapamil y su efecto inhibitorio sobre la liberación estimulada de GABA, no parecen estar mediados por el mismo mecanismo de acción, ya que la concentración de verapamil que causa el 50% de inhibición de la liberación de  $^3\text{H}$ -GABA inducida con veratridina ( $25 \mu\text{M}$ ), es diferente a la dosis efectiva media ( $4.5 \mu\text{M}$ ), encontrada para la estimulación de la liberación basal de  $^3\text{H}$ -dopamina por verapamil. Además, el verapamil no parece afectar un mecanismo común del proceso de la liberación de los neurotransmisores, como sería el mediado por el bloqueo de los canales de calcio sensibles a voltaje. En otras palabras, no podemos suponer que la dopamina liberada en respuesta al verapamil inhiba directamente la liberación de GABA estimulada con veratridina, ya que a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  el verapamil ejerce su máxima respuesta sobre la liberación basal de dopamina y a esta concentración sólo inhibe ligeramente la liberación estimulada de GABA. Tampoco podemos suponer que la inhibición con verapamil de la liberación estimulada de GABA está propiciando el aumento de la liberación basal de dopamina, ya que a concentraciones de verapamil que no son suficientes para modificar la liberación ni basal ni estimulada de GABA, el verapamil aumenta marcadamente la liberación de dopamina. Por otro lado, no podemos descar-

tar que las diferencias entre los efectos del verapamil sobre la liberación de GABA y de dopamina que aquí se presentan, se deban a diferencias en los mecanismos subyacentes a la liberación de las aminas biogénicas y de los aminoácidos neurotransmisores.

Aunque el verapamil disminuye la cantidad de  $^3\text{H}$ -dopamina total de forma similar a como la disminuye el bloqueador de la recaptura de dopamina, bupropion, y ambos compuestos estimulan la liberación basal de dopamina, no parece que estos efectos del verapamil se deban a la inhibición de la recaptura de dicha monoamina, ya que el incremento en la liberación de  $^3\text{H}$ -dopamina inducido con dopamina fría es inhibido con bupropion, y no es sensible al verapamil.

Las concentraciones de verapamil que se han encontrado en el líquido cefaloraquídeo de pacientes maniacos son del orden nanomolar (Doran y col. 1985). No obstante, dado que el verapamil es liposoluble, estas concentraciones no necesariamente reflejan la concentración de verapamil que se alcanza en la fracción membranal del sistema nervioso. Aunque no podemos proponer que los efectos del verapamil sobre la liberación de neurotransmisores encontrados en este trabajo sean responsables de su eficacia como antimaniaco, estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que una alteración dopamínica debe estar asociada con algunos componentes del síndrome maniaco (Post y col. 1980). Además Raiteri y col. (1978), siguiendo un procedimiento muy similar al nuestro, encontraron que el haloperidol, un neuroléptico tradicional, estimula la liberación basal de dopamina en sinaptosomas de estriado de rata, a concentraciones micromolares.

Aunque los resultados de este trabajo, amplian la caracterización de los efectos del verapamil sobre la liberación de los neurotransmisores, el mecanismo de acción del verapamil que subyace a tales efectos (y a sus efectos terapéuticos) aún no ha sido esclarecido, por lo que actualmente estamos desarrollando en el laboratorio otros estudios dirigidos a explorar los mecanismos de acción subyacentes a estos efectos del verapamil.

#### VII. REFERENCIAS.

- Adam-Vizi V y Ligeti E (1984) Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. *J. Physiol.* 353: 505-521.
- Barton B M y Gitlin M J (1987) Verapamil in treatment-resistant mania: an open trial. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7(2): 101-103.
- Bolger G T, Gengo P J, Luchowski E M, Siegel H, Triggle D J y Janis R A (1982) High affinity binding of a calcium channel antagonist to smooth and cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1604-1609.
- Bradford H F (1969) Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex. *J. Neurochem.* 16: 675-684.

Bradford H (1975) Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release. En: Handbook of Psychopharmacology. (eds. Iversen L, Iversen S y Snyder S) Vol. I. Plenum Press, New York. pp 191-252.

Bullock T, Orkand R y Grinell A (1977) Introduction to nervous systems. W.H. Freeman, San Fco. pp 9-96.

Carvalho C A M, Coutinho D P, y Carvalho A P (1986a) Effects of  $Ca^{2+}$  channel blockers on  $Ca^{2+}$  translocation across synaptosomal membranes. J. Neurochem. 47(6): 1774-1784.

Carvalho C M, Santos S V y Carvalho A P (1986b)  $\sigma$ -aminobutyric acid release from synaptosomes as influenced by  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  channel blockers European J. Pharmacol. 131: 1-12.

Cooper J R, Bloom F E y Roth R H (1982) Catecolaminas I: Aspectos generales. En: Las bases bioquímicas de la neurofarmacología. 2a. ed. El Manual Moderno. México, D.F. pp 89-140.

Costa E, Guidotti A, Moroni F y Peralta E (1979) Glutamic acid as a transmitter precursor and as a transmitter. En: Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology. (ed. L J Filer, Jr.). Raven Press, New York. pp 151-161.

Díaz J L (1988) Cómo actúan los fármacos antidepresivos? Salud Mental. 11(1): 63-75.

Doran A R, Narang P K, Meigs M Y, Wolkowitz O W, Roy A, Breier A, Pickar D (1985) Verapamil concentrations in cerebrospinal fluid after oral administration. New Eng. J. Med. 312: 1261-1262.

Douglas W W y Taraskevich P S (1982) Slowing effects of dopamine and calcium-channel blockers on frequency of sodium spikes in rat pars intermedia cells. J. Physiol. 326: 201-211.

Drapeau P y Blaustein M P (1983) Initial release of  $^3\text{H}$ -dopamine from rat striatal synaptosomes: correlation with calcium entry. J. Neurosci. 3: 703-713.

DSM-III-R. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. (1988). American Psychiatric Association eds. Masson. México. pp 255-278.

Dubovsky S L y Franks R D (1983) Intracellular calcium ions in affective disorders: A review and an hypothesis. Biol. Psychiat. 18: 781-797,

Dubovsky S L, Franks R D, Allen S (1987) Verapamil: a new antimanic drug with potential interactions with lithium. J. Clin. Psychiatry 48(9): 371-372.

Dunkley P R, Rostas J A P, Heath J W y Powis D A (1987) The preparation and use of synaptosomes for studying secretion of catecholamines. En: In vitro methods for studying secretion. (eds. Poisner y Trifaro). Elsevier Science Publishers. pp 315-334.

Fonnum F, Malte-Sorensen D, Kvale I, Soreide A, Skrede K y Walaas I. (1981) Glutameric neurons: Localization and release of the transmitter. En: Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission (eds. Tapia R y Cotman C) Plenum Press. New York. pp. 59-70.

Fricke U (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. Analyt. Biochem. 53: 555-558.

Giannini A J, Houser W L, Loiselle R H, Giannini M C y Price W A (1984) Antimanic effects of verapamil. Am. J. Psychiat. 141: 1602-1603.

Gould R J, Murphy K M M, Reynolds I J y Snyder S H (1983) Antischizophrenic drugs of the diphenylbutylpiperidine type act as calcium channel antagonists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5122-5125.

Gray E y Whittaker V (1962) The isolation of nerve endings from brain: An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. J. Anat. 96: 79-87.

Hajós F (1975) An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 136: 387-392.

Hoschl C y Kozeny J (1989) Verapamil in affective disorders: a controlled, double-blind study. Biol. Psychiatry. 25: 128-140.

*gen for*  
Kety S S, Rosenthal D, Wender P H, Schulsinger F y Jacobsen B (1975) Mental illness in the biological and adoptive families of adopted individuals who have become schizophrenic: a preliminary report based on psychiatric interviews. En: R R Fieve, D Rosenthal y H Brill (eds.) Genetic Research in Psychiatry. Baltimore: Johns Hopkins University Press, pp 147-165. X

Krueger B K y Blaustein M P (1980) Sodium channels in presynaptic nerve terminals. J. Gen. Physiol. 76: 287-313.

Levi G, Poce U y Raiteri M (1976) Uptake and exchange of GABA and glutamate in isolated nerve endings. En: Transport phenomena in the nervous system. (G Levi, L Battistin and A Lajtha, eds.) pp 273-289. Plenum Press, New York.

Levi G, Banay-Schwartz M, Raiteri M (1978) Uptake, exchange and release of GABA in isolated nerve endings. En: Amino acids as chemical transmitters (F Fonnum, ed.) Plenum Press, New York pp. 327-350.



Levi G y Raiteri M (1978) Modulation of  $\sigma$ -aminobutyric acid transport in nerve endings: Role of extracellular  $\sigma$ -aminobutyric acid and of cationic fluxes. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 2981-2985.

Levi G, Gallo V y Raiteri M (1980). A reevaluation of veratridine as a tool for studying the depolarization-induced release of neurotransmitters from nerve endings. Neurochem. Res. 5: 281-295.

McGraw C F, Nachshen D A y Blaustein M P (1981) Calcium movement and regulation in presynaptic nerve terminals. In: Calcium and Cell Function, W Y Cheung, ed., Vol.2 pp 81-110, Academic Press, Inc., New York.

*Mc Guffin*

Meltzer H L (1986) Lithium mechanisms in bipolar illness and altered intracellular calcium functions. Biol. Psychiatry, 21: 492-510.

Nachshen D A (1985) Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. J. Physiol. 363: 87-101.

Nachshen D A y Drapeau P (1988) The regulation of cytosolic pH in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. J. Gen. Physiol. 91: 289-303.

*repetir hojas:  
14, 15  
68, 69*

- Norris P J, Dhaliwal D K, Druce D F y Bradford H F (1983) The suppression of stimulus-evoked release of amino acid neurotransmitters from synaptosomes by verapamil. *J. Neurochem.* 40: 514-521.
- Pappas G y Waxman S I (1972) Synaptic fine structure-morphological correlates of chemical and electrotonic transmission. *En: Structure and function of synapses.* (eds. G Pappas y D Purpura). Raven Press, New York. pp 1-43.
- Pletscher A, Shore P A y Brodie B B (1956) Serotonin as a mediator of reserpine action in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 116: 84-89.
- Post R M, Jimerson D C, Bunney Jr. W E, Goodwin F K (1980) Dopamine and mania: behavioral and biochemical effects of the dopamine receptor blocker pimozide. *Psychopharmacol.* 67: 297-305.
- Raiteri M, Cervoni AM, Del Carmine R (1978) Do presynaptic auto-receptors control dopamine release? *Nature.* 274(17): 706-708.
- Richards C D y McIlwain H (1967) Electrical response in brain slices. *Nature.* 215: 704-707.
- Richelson E (1984) The newer antidepressants: structures, pharmacokinetics, pharmacodynamics and proposed mechanisms of action. *Psychopharmacol. Bull.* 20(2): 213-223.

Richelson E y Pfenning M (1984) Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *European J. Pharmacol.* 104: 277-286.

Sachar E J (1981a) Disorders of Feeling: Affective Diseases. En: Principles of neural science. (Kandel E R y Schwartz J H eds.) Elsevier North-Holland. New York, U.S.A. pp 717-725.

Sachar E J (1981b) Disorders of Thought: The Schizophrenic Syndromes. En: Principles of neural science. (Kandel E R y Schwartz J H eds.) Elsevier North-Holland. New York, U.S.A. pp 704-716.

Sihra T S y Nicholls D G (1987) 4-aminobutyrate can be released exocytotically from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49(1): 261-267.

Sitges M, Possani L D y Bayon A (1987) Characterization of the actions of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* on transmitter release from mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 48: 1745-1752.

Sitges M (1989a) Characterization of the effect of monensin on  $\sigma$ -amino-n-butyric acid release from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 53(2): 442-447.

Sitges M (1989b) Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on  $\sigma$ -amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. J. Neurochem. 53(2): 436-441.

Stahl S M (1984) Regulation of neurotransmitter receptors by desipramine and other antidepressant drugs: the neurotransmitter receptor hypothesis of antidepressant action. J. Clin. Psychiatry 45(10): 37-44.

Schwartz J H (1981). Chemical basis of synaptic transmission. En: Principles of Neural Science (Kandel E R y Schwartz J H eds.) Elsevier North-Holland. New York, U.S.A. pp 106-111.

Tapia R y Sitges M (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. Brain Res. 250: 291-299.

Tapia R (1983)  $\sigma$ -aminobutyric acid: metabolism and biochemistry of synaptic transmission. En: Handbook of Neurochemistry. 2nd. ed. (ed. A Lajtha). vol. 3. Plenum Press. New York. pp 423-456.

Wilson J, Wilkin G y Baláz R (1975) Biochemical dissection of the cerebellum—functional properties of the glomerulus particles. En: Metabolic Compartmentation and Neurotransmission (eds. Berl S, Clarke D y Schneider D) Plenum Press. New York. pp. 427-436.

Yamamura H I, Schoemaker H, Boles R G y Roeske W R (1982)

Diltiazem enhancement of (<sup>3</sup>H) Nitrendipine binding to calcium channel associated drug receptor sites in rat brain synaptosomes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 108: 640-646.