



11761  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DEL VERAPAMIL  
EN LA LIBERACION  
DE NEUROTRASMISORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA  
RAMA BIOQUIMICA

P R E S E N T A :

Mario Alejandro Reyes Lezama

México, D. F.

1997

TESIS CON  
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 esta 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.

## **RECONOCIMIENTOS**

**Mi más profundo agradecimiento a los Doctores. Ana María López Colomé, Adolfo García Sainz, Humberto Nicolini, Jaime Mas y Ricardo Tapia por los comentarios, críticas y sugerencias llevadas a cabo durante el desarrollo y la revisión de esta tesis.**

**Mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Sitges Berrondo por la  
paciencia, dedicación y empeño que demostró durante el desarrollo de esta tesis.  
Pero en particular por la amistad que me ha brindado.  
Gracias María.**

---

**Un agradecimiento especial a la Bióloga Luz María Chiu Velázquez por el gran apoyo técnico recibido en los experimentos de liberación de neurotransmisores.**

**De igual manera y no menos importante mi mas profundo agradecimiento a la QFB Araceli Guarneros López por su valiosa colaboración en los experimentos de cuantificación de catecolaminas por HPLC.**

---

**Esto es para ti Aurora, gracias por seguir siendo, pese a todo, mi amiga,  
complice, compañera y todo.**

---

**Seguiré mostrando mi carácter de irreverente, así que:  
Diez razones por las que Dios no puede ingresar al Sistema Nacional de  
Investigadores (SIN).**

- 1.- Solo tiene una publicación, si realmente consideramos que él la escribió.**
- 2.- No fue inicialmente escrita en ingles.**
- 3.- No fue publicada en una revista con refereo internacional.**
- 4.- Su único trabajo nunca ha sido citado como referencia en ninguna revista científica.**
- 5.- Que se sepa, no tiene ningún tipo de colaboración con ningún otro colega o grupo de trabajo.**
- 6.- Cuando un experimento no resulta como él espera lo elimina de los datos estadísticos.**
- 7.- Es muy difícil de localizar, sus horas de trabajo y lugares de reunión por lo general son en la cima de los montes.**
- 8.- No tiene correo electrónico, ni apartado postal donde enviar la correspondencia.**
- 9.- En el tiempo que lleva laborando no ha conseguido ningún donativo de CONACyT**
- 10.- Se rumora que sus primeros estudiantes fueron corridos de su laboratorio por cuestionarlo y tener la inquietud de saber más.**

## ÍNDICE

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
I.- ANTECEDENTES GENERALES.....	4
1.- Sinapsis química y liberación de neurotransmisores.....	4
2.- Neurotransmisores.....	7
2A.- Neurotransmisores Monoaminérgicos en padecimientos psiquiátricos.....	8
3.- Receptores.....	9
3A.- Receptores serotoninérgicos.....	9
3B.- Receptores dopaminérgicos.....	10
3C.- Receptores noradrenérgicos.....	11
4.- El Verapamil como antagonista orgánico de los canales de Ca <sup>2+</sup> en trastornos psiquiátricos.....	11
5.- Desordenes afectivos.....	13
5A.- Características generales.....	13
5B.- Hipótesis monoaminérgica de los desordenes afectivos.....	14
5C.- Tratamiento para los desordenes afectivos.....	15
6.- Preparación sinaptosomal como modelo de estudio de la liberación de neurotransmisores.....	16
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
1.- Obtención de la preparación sinaptosomal.....	23
2.- Sistema de perfusión.....	23
3.- Medios de perfusión.....	23
4.- Captura del neurotransmisor radioactivo.....	24
5.- Liberación del neurotransmisor radioactivo.....	24
6.- Cuantificación de DA, 5-HT y sus metabolitos por HPLC.....	25
7.- Experimentos de unión de radioligando-receptor.....	26
IV.- RESULTADOS.....	28
1.- Efecto del VPM sobre la unión de [ <sup>3</sup> H]-5-HT, [ <sup>3</sup> H]-NA y [ <sup>3</sup> H]-DA estimulada con K <sup>+</sup> alto.....	28
2.- Dependencia de Ca <sup>2+</sup> de la liberación de [ <sup>3</sup> H]-5-HT y [ <sup>3</sup> H]-NA estimulada por K <sup>+</sup> alto.....	29
3.- Efecto del VPM sobre la liberación basal de [ <sup>3</sup> H]-5-HT, [ <sup>3</sup> H]-NA y [ <sup>3</sup> H]-DA.....	29



4.- El efecto del VPM sobre la liberación basal de [ <sup>3</sup> H]-DA y [ <sup>3</sup> H]-5-HT es dependiente de dosis.....	29
5.- Efecto del VPM sobre la liberación de DA endógena de sinaptosomas de estriado de rata.....	31
6.- Efecto del VPM sobre la liberación de 5-HT endógena de sinaptosomas de estriado de rata.....	32
7.- El VPM no inhibe el homorrecaambio de DA.....	33
8.- Efecto del verapamil sobre la unión específica de [ <sup>3</sup> H]-espiroperidol y [ <sup>3</sup> H]-SCH-23390 a membranas de sinaptosomas de estriado.....	36
9.- Efecto del VPM en la unión específica de [ <sup>3</sup> H]-5-HT en membranas de sinaptosomas de hipocampo.....	36
10.- Effects of verapamil on the Release of Different Neurotransmitters	
V.- DISCUSIÓN.....	38
VI.- CONCLUSIONES.....	44
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	45

## Organización de la Tesis

El trabajo de esta tesis está dirigido a estudiar el efecto del verapamil (VPM) sobre la liberación, tanto basal como estimulada, de los neurotransmisores serotonina y noradrenalina, comparando estos efectos con los previamente reportados para dopamina. El VPM es un compuesto conceptualizado como antagonista orgánico de los canales de  $Ca^{2+}$  y también es un fármaco utilizado en problemas cardíacos que además ha probado ser efectivo en la terapia de ciertos trastornos psiquiátricos. Se estudió el efecto de este fármaco sobre la liberación de los neurotransmisores antes mencionados, por ser éstos la base de la hipótesis monoaminérgica de los desórdenes afectivos.

Inicialmente, en Antecedentes Generales, describo brevemente las características de la sinapsis química así como la liberación de neurotransmisores. Continúo, en la parte de Receptores, haciendo una breve descripción de los dos tipos de receptores, ionotrópicos y metabotrópicos, y enfatizando la clasificación de los receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos y noradrenérgicos. A continuación, describo al VPM, como antagonista orgánico de los canales de  $Ca^{2+}$  y discuto datos previos obtenidos en el laboratorio, sobre liberación de neurotransmisores, que nos llevaron a estudiar los efectos, no relacionados con el bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$ , de este fármaco. Dado que el VPM ha sido utilizado en la profilaxis de ciertos desórdenes afectivos, hago una descripción de éstos, así como de algunas de las terapias empleadas en el tratamiento de estos padecimientos mentales. Para finalizar con la parte de Antecedentes Generales, dado que este trabajo se centró en los mecanismos de liberación de neurotransmisores *in vitro*, discuto sobre las ventajas de utilizar la preparación sinaptosomal para este tipo de estudios.

En la sección de Planteamiento de Problema, una pequeña justificación precede a cada uno de los objetivos llevados a cabo en este trabajo.

La sección intitulada Resultados contiene, anexado al final, el trabajo publicado a partir de los datos obtenidos en esta tesis: *Effects of Verapamil on the Release of Different Neurotransmitters*. A pesar de que este artículo contiene la metodología empleada en el

---

desarrollo de esta tesis, en la sección de Material y Métodos, hago una descripción en extenso de los mismos. Las figuras y tablas mencionadas en esta sección se encuentran localizadas en el artículo antes mencionado.

En Discusión, propongo los posibles mecanismos de acción del VPM, sobre la liberación de los neurotransmisores estudiados en esta tesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A°.-** Angstrom
- AC.-** Adenilato Ciclasa
- AMPc.-** Adenosin Mono Fosfato Cíclico
- ATP.-** Adenosin Tri Fosfato
- ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.-** Bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dependiente de ATP
- D(1, 2, 3, 4, y 5).-** Receptor Dopaminérgico (1,2,3,4 y 5)
- DA.-** Dopamina
- DABA.-** Ácido Diamino Butírico
- De<sub>50</sub>.-** 50 % de la Dosis Efectiva
- DOPAC.-** Ácido Dihidroxi-fenil Acético
- DSM-IV.-** Manual Diagnóstico y Estadístico de Desordenes Mentales IV
- EGTA.-** Ácido etileno-glicólicoaminotetra acético
- EDTA.-** Ácido etileno-diaminotetra acético
- GABA.-** Ácido Gama Amino Butírico
- 5-HIAA.-** Ácido 5, hidroxindolacético
- HPLC.-** Cromatografía líquida de alta resolución
- 5-HT.-** Serotonina
- 5-HT(1, 2, 3, y 4).-** Receptor Serotoninérgico (1,2,3 y 4)
- i. p.-** Intra peritoneal
- IP<sub>3</sub>.-** Inositol tri fosfato
- Ki .-** Constante de inhibición
- MAO.-** Enzima monoamino oxidasa
- mV.-** Milivoltios
- NA.-** Noradrenalina
- PLC.-** Fosfolipasa C
- PKC.-** Proteína Cinasa C
- SNC.-** Sistema Nervioso Central
- Tris.-** Tris Hidroximetil Aminometano

## I.- ANTECEDENTES GENERALES

### 1.- Sinapsis química y liberación de neurotransmisores

La unidad funcional del sistema nervioso central (SNC), capaz de recibir, procesar y transmitir información obtenida del medio ambiente es la neurona. En el cerebro, el flujo de información entre las neuronas se lleva a cabo a través de regiones específicas de estas células conocidas con el nombre de sinapsis. Las sinapsis se han clasificado de acuerdo al tipo de señal utilizado en la comunicación celular. De esta forma, tenemos sinapsis tanto eléctricas como químicas siendo estas últimas las más abundantes en el SNC. La sinapsis química se puede dividir en tres regiones: presinapsis, postsinapsis y espacio sináptico. La región presináptica morfológicamente se caracteriza por la presencia de mitocondrias y vesículas sinápticas, las cuales contiene al mensajero químico o neurotransmisor, así como un engrosamiento de la membrana plasmática. La postsinapsis es la región de la neurona que recibe el mensaje transmitido. La postsinapsis también presenta un engrosamiento de la membrana plasmática en donde se localizan los receptores postsinápticos. Esta región es conocida con el nombre de zona activa, por llevarse a cabo en esta los fenómenos de transmisión. El espacio sináptico es la distancia entre las regiones pre y postsináptica, su tamaño es de aproximadamente 100 a 400 Å.

La comunicación sináptica se debe a la capacidad de la neurona para excitarse y conducir esta excitación, esta propiedad depende de las características de la membrana celular. En la neurona, en estado de reposo, se mantiene una diferencia de concentración entre el medio interno y externo de la membrana para los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La distribución de estos iones a través de la membrana produce una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular de entre 60 a 70 mv. Esta diferencia de potencial es conocida con el nombre de potencial de reposo o potencial de membrana. La diferencia de potencial depende de la permeabilidad selectiva de la membrana para los diferentes iones y

al transporte activo de los mismos. De esta forma, en el exterior predominan los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , mientras que en el interior de la célula lo es el  $\text{K}^+$ , así como iones cargados negativamente que provienen fundamentalmente de las proteínas intracelulares. El  $\text{K}^+$  siguiendo el gradiente de concentración tendería a salir de la neurona, sin embargo a esta difusión pasiva se opone un gradiente eléctrico, representado por las cargas negativas en el interior de la membrana. Sin embargo, debido a que el  $\text{K}^+$  es 10 veces más permeable a la membrana sináptica que el  $\text{Na}^+$ , el gradiente de concentración del  $\text{K}^+$  predomina sobre el gradiente eléctrico. Para mantener una concentración constante de  $\text{K}^+$  en el interior de la neurona, la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transporta activamente al ion  $\text{K}^+$  nuevamente al interior celular. En el caso de  $\text{Na}^+$ , cuya concentración es mayor en el medio extracelular, el gradiente de concentración al interior celular al igual que su gradiente eléctrico van en la misma dirección, hacia el interior de la célula, ya que las cargas negativas en el interior de la neurona atraen las cargas positivas del  $\text{Na}^+$ . La concentración de  $\text{Na}^+$  es menor en el interior de la neurona debido a la baja permeabilidad de la membrana plasmática a este ion y a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que simultáneamente introduce  $\text{K}^+$  del medio externo y remueve  $\text{Na}^+$  del interior celular. Esta bomba al actuar en contra del gradiente de concentración utiliza para su funcionamiento la energía proveniente del ATP (Kandel y Siegelbaum, 1995).

En la neurona, al recibir un estímulo, ocurren una serie de cambios en el potencial de reposo de la membrana que constituyen la base de los fenómenos que caracterizan al impulso nervioso. Inicialmente se produce un incremento en la permeabilidad de la membrana al ion  $\text{Na}^+$ . Esta entrada masiva de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula, a través de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje presentes en la membrana plasmática, provoca una reducción en el potencial de membrana, haciéndose cada vez más positivo el interior celular, yendo de -70 a + 30 mv. Esta inversión de potencial se conoce como despolarización de la membrana. La apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje durante la despolarización es seguida, con un retraso de milisegundos, de la apertura de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje. La apertura de estos canales produce la salida masiva de este ion, lo que aumenta

la negatividad interior de la célula, restableciendo de esta forma el potencial de membrana. Esta serie de eventos, al propagarse a través de la neurona se conocen con el nombre de potencial de acción. La despolarización transitoria producida durante el potencial de acción, activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que son sensibles a voltaje, presentes en la terminal presináptica, aumentando así la permeabilidad de la membrana hacia este ion. El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal sináptica se encuentra asociado con los procesos de liberación del neurotransmisor (Miledi, 1973)

Los mecanismos a través de los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce sus efectos sobre la liberación del neurotransmisor no se conocen con certeza hasta la fecha, aunque se ha propuesto un sistema de fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, facilitando de esta forma la liberación del neurotransmisor por medio de un proceso de exocitosis.

Si bien, la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se considera como un hecho generalizado en la liberación de neurotransmisores, en la literatura existen evidencias de la liberación de neurotransmisores de forma  $\text{Ca}^{2+}$  -independiente, por ejemplo: En experimentos de perfusión continua en sinaptosomas cargados con  $[\text{3H}]\text{-GABA}$ , la presencia de GABA frío en el medio de perfusión estimula la liberación del neurotransmisor radioactivo. Esta liberación inducida por GABA conocida con el nombre de homorrecambio, depende de la presencia de  $\text{Na}^+$  externo y es independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Levi y Raiteri 1974; Levi y Raiteri, 1978; Sitges y col., 1993).

Para el caso de DA también existen evidencias de que la DA fría es capaz de liberar la radioactiva precaptada de forma  $\text{Ca}^{2+}$  -independiente (Parker y Cubeddu 1988; Sitges y col., 1994). Sin embargo existen reportes en la literatura de sustancias similares a los neurotransmisores que también estimulan la liberación de neurotransmisores. Tal es el caso del DABA, molécula que estimula la liberación de GABA presumiblemente a través de intercambiarse con el GABA endógeno, mecanismo conocido con el nombre de heterorrecambio (Levi y col., 1976; Levi y col., 1978; Sitges y col., 1993). De la misma manera, para DA se sabe que sustancias como la cocaína ó el bupropion, conocidos como

bloqueadores de la captura de DA estimulan también su liberación (Hyttel, 1978, Sulzer y col., 1993; Sitges y col., 1994).

## **2.- Neurotransmisores.**

Los neurotransmisores se pueden dividir en dos tipos: excitadores e inhibidores de acuerdo a su acción en la terminal postsináptica. Los primeros funcionan despolarizando la membrana de la célula postsináptica mientras que los neurotransmisores inhibidores la hiperpolarizan, y de esta manera dificultan el que los estímulos simultáneos o subsecuentes generen un potencial de acción en el axón de la neurona. Los neurotransmisores identificados en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos incluyen al ácido y amino butírico (GABA), la glicina, el ácido glutámico, la acetilcolina, algunas monomanias como la dopamina (DA), la 5-hidroxi triptamina (5-HT) y noradrenalina (NA).

Los neurotransmisores aminoácidos incluyen al ácido glutámico, transmisor excitador, y al GABA que es el transmisor inhibitor por excelencia del SNC. La glicina también es un neurotransmisor aminoácido inhibitor particular de la médula espinal. La acetilcolina se considera tanto excitador como inhibitor, de acuerdo al sitio de acción de este neurotransmisor.

La acción de un neurotransmisor liberado al espacio sináptico se termina básicamente por 2 mecanismos: (1) cuando el neurotransmisor es degradado por la acción de enzimas específicas, (2) por la recaptura de alta afinidad del neurotransmisor liberado por las células gliales o por la misma terminal sináptica, mediante transportadores específicos para cada uno de los neurotransmisores liberados



## **2A.- Neurotransmisores Monoaminérgicos en Padecimientos Psiquiátricos.**

Las monomanías neurotransmisoras incluyen a la NA, DA y 5-HT, todas generalmente inhibitoras en el SNC, aunque en algunos casos actúan como transmisores excitadores sobre algunas neuronas.

La 5-HT ha sido implicada en una gran serie de padecimientos, que incluyen a algunos de tipo psiquiátrico. Entre los síntomas relacionados con cambios fisiológicos en los niveles de 5-HT se encuentran los siguientes: ansiedad, depresión, agresión, dolor, migraña y emesis (The Lancet 1989). Los niveles de 5-HT y su metabolito el ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA) fueron determinados en pacientes con trastornos depresivos. En estos pacientes los niveles de ambos compuestos (5-HT y 5HIAA) se encontraron disminuidos con respecto a los pacientes control, particularmente en aquellos pacientes que habían intentado el suicidio (Aschberg y col., 1976; 1995; Mann y col., 1986).

Los pacientes con problemas de depresión experimentan mejoría tras el tratamiento con inhibidores selectivos del sistema de captura de alta afinidad para 5-HT tales como la bupropion ó fluoxetina, cuyos nombres comerciales son la buspirona y el prozac (Aschber y col., 1995). La explicación de esta mejoría se ha adjudicado al incremento más prolongado de la concentración de 5-HT en el espacio sináptico por inhibición del proceso de recaptura del neurotransmisor (Schwerinzer y col., 1986; Aschber y col., 1995).

En cuanto a la DA, se sabe que la L-Dopa, precursor de la síntesis de DA, puede inducir hipomanía en pacientes con desórdenes bipolares o enfermedad de Parkinson. Por el contrario se ha demostrado que algunos antagonistas del receptor dopaminérgico, como el haloperidol, pueden ser empleados como antipsicóticos y como antidepresivos (Malenka y col., 1989).

Los antidepresivos tricíclicos como la imipramina, al bloquear la recaptura de 5-HT y NA, prolongan el tiempo de acción de estos neurotransmisores en el espacio sináptico (Richardson y Pfenning, 1984)

### **3.- Receptores**

Una vez liberado el neurotransmisor, este atraviesa el espacio sináptico e interacciona con una molécula específica de naturaleza proteica localizada en la membrana postsináptica llamado receptor. Los receptores son principalmente de dos tipos: los receptores ionotrópicos que físicamente son canales y su activación a través de la interacción con el neurotransmisor modifica directamente la permeabilidad a algún ion determinado. Los receptores metabotrópicos que están acoplados a una proteína G que a su vez está asociada a un sistema de transducción, por ejemplo adenilato ciclasa, enzima que convierte ATP en AMP<sub>c</sub>, siendo esta última molécula el mensajero interneuronal capaz de activar proteínas cinasas encargadas de una gran variedad de respuestas celulares. Se ha demostrado la presencia de receptores metabotrópicos en la membrana presináptica que reciben el nombre de autorreceptores (Langer, 1981, Grace y col., 1997): En particular las terminales dopaminérgicas presentan auto receptores del tipo D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>, encargados tanto de la síntesis como de la regulación de la liberación de DA (Gober y col., 1995).

#### **3A.- Receptores Serotoninérgicos.**

En 1979 Peroutka y Snyder dividieron a los receptores serotoninérgicos en dos grupos, de acuerdo a la afinidad de estos receptores por diferentes ligandos radioactivos. De esta forma tenemos que los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> presentan mayor afinidad por la [<sup>3</sup>H]-5-HT y los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> por el [<sup>3</sup>H]-espiroperidol. En la actualidad, se han subdividido al grupo de los receptores serotoninérgicos en cuatro diferentes grupos, de esta forma tenemos a los receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>. El grupo de receptores 5-HT<sub>1</sub> ha su vez ha sido dividido, de acuerdo con sus propiedades farmacológicas, dando como resultado las familias de receptores que incluyen a los receptores: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> (Cornfield y Nelson 1991). Con la aplicación de las técnicas de biología molecular a este campo ha sido posible clonar a los receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>. Todos los receptores serotoninérgicos, con excepción

de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, se encuentran acoplados a una proteína G que a su vez está asociada a uno de los dos sistemas de transducción acoplados a estos receptores. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>4</sub> a través de una proteína G se encuentran asociados a la enzima adenilato ciclasa (AC), mientras que los receptores 5-HT<sub>1C</sub> y 5-HT<sub>2</sub> a la enzima fosfolipasa C (PLC). Los receptores 5-HT<sub>3</sub> son propiamente canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, (Herndon y Glennon, 1993). Se ha propuesto la presencia de autorreceptores serotoninérgicos del tipo 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> cuya acción en el sistema nervioso aun no se encuentra bien establecida (Verge y col., 1986; Sprouse y Aghajanian, 1988, Cornfield y Nelson 1991).

### **3B.- Receptores dopaminérgicos.**

Inicialmente se consideraron dos subtipos de receptores dopaminérgicos, que se clasificaron como D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Al igual que para los receptores serotoninérgicos, con el empleo de técnicas de biología molecular ha sido posible la identificación de cinco diferentes subtipos de receptores a la DA conocidos con los nombres de: D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub>. Sin embargo en un afán de simplificar la clasificación de todos estos receptores se han subdividido nuevamente en dos grandes familias: la familia de los receptores emparentados con el receptor D<sub>1</sub>, que incluye a los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> y la familia de los receptores emparentados con el receptor D<sub>2</sub>, constituida por los tres tipos restantes de receptores (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>). Esta clasificación se ha hecho con base en la similitud de la secuencia de aminoácidos de cada uno de los receptores así como la localización de los intrones y exones de cada uno de estos genes (Schwartz y col., 1992). Los receptores dopaminérgicos se encuentran acoplados a una proteína G, la cual está asociada a su vez a mecanismos de transducción, como ha sido mencionado en párrafos anteriores. Hasta ahora los únicos tipos de receptores dopaminérgicos que se han reportado como presinápticos son: el receptor D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>. Su función en la presinapsis es tanto la autorregulación de la liberación

(Langer, 1981, Grace y col., 1997), así como de la síntesis de DA (Gobert y col., 1995, Cho y col., 1997). Grace y col., 1997

### **3C.- Receptores Noradrenérgicos.**

Los adrenerorreceptores han sido divididos en dos categorías: receptores adrenérgicos alfa y receptores adrenérgicos beta, que a su vez han sido subdivididos en alfa<sub>1a</sub>, alfa<sub>1b</sub>, alfa<sub>1c</sub>, alfa<sub>2a</sub>, alfa<sub>2b</sub>, alfa<sub>2c</sub>, beta<sub>1</sub>, beta<sub>2</sub>, de acuerdo a la potencia de diferentes agonistas y antagonistas adrenérgicos (Gerber y col., 1985; Hadcock y Malbon, 1993). Se ha podido demostrar la presencia de autorreceptores adrenérgicos en terminales nerviosas, encargados de la regulación de la liberación de este neurotransmisor. Estos autorreceptores han sido identificados como alfa<sub>1</sub> que regulan negativamente la liberación de NA (Langer, 1981; Hadcock y Malbon, 1993).

En modelos animales sometidos a tratamientos con antidepresivos por más de dos semanas, se ha podido observar una disminución en los niveles de AMP<sub>c</sub> dependiente de la acción de NA. En estos experimentos también se pudo cuantificar una disminución en la densidad, así como un cambio en la afinidad de los receptores beta-adrenérgicos (Charney y col., 1981). En humanos con estados profundos de depresión, que desencadenaron en el suicidio, estudios *post mortem* revelaron que en la corteza frontal se presentaba un incremento en el número de receptores adrenérgicos, del tipo alfa<sub>1</sub>, con respecto a los sujetos control (Mann y col., 1986). Estos resultados experimentales ponen de manifiesto la relación entre los trastornos depresivos y los sistemas adrenérgicos.

### **4.- El Verapamil como Antagonista Orgánico de los Canales de Ca<sup>2+</sup> en Trastornos Psiquiátricos.**

Los antagonistas orgánicos de los canales de Ca<sup>2+</sup> son un grupo heterogéneo de compuestos que se empezaron a estudiar y a utilizar como fármaco en enfermedades cardiovasculares como son arritmias (Heywood J.T., 1995) y en enfermedades de las

arterias coronarias (Brogeden y col., 1996). Dentro de este grupo se incluyen a las dihidropiridinas, como la nitrendipina, a las fenilalquilaminas como el VPM y a compuestos tales como el diltiazem (Yamamura y col., 1982). El estudio de estos compuestos cobró interés en otras áreas de la investigación debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, entre los cuales se encuentran la secreción de hormonas y la liberación de neurotransmisores.

Resulta interesante que algunos antagonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  han demostrado ser potencialmente útiles en la profilaxis de ciertos desordenes afectivos. Dentro de estos antagonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el VPM ha sido el más estudiado en la Psiquiatría. (Dubovsky y Francks 1983; Giannini y col., 1984; Caillard, 1985; Dubovsky y col., 1986; Barton y Gitlin, 1987; Pollack y col., 1987; Dubovsky y col., 1987; Höschl y Kozeny, 1989; Höschl, 1991; Garza-Treviño y col., 1992; Balon y Ramesh, 1996) Hasta la fecha son escasos los reportes de otros antagonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en trastornos de la conducta (Dubovsky y Frenks, 1983; Polack y col., 1987; Balon y Ramesh, 1996).

Como los neurolépticos del tipo de las difenilbutilpiperidinas, que incluyen al pimozide, fluspirileno, penfluridol y clopimozide, inhiben la unión de [ $^3\text{H}$ ]-nitrendipina, posiblemente uniéndose a los mismos sitios que el VPM, se ha sugerido que sus posibles efectos terapéuticos deben estar relacionados con su interacción sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gould y col., 1983).

Por otro lado, el efecto terapéutico del VPM en la manía (cuyas características serán explicadas en párrafos posteriores) es comparable al de los tratamientos tradicionales con neurolépticos (i.e. haloperidol) y sales de litio (Höschl y Kozeny 1989). Una característica de algunas drogas psicoactivas es la latencia en la aparición de los efectos terapéuticos. En este sentido, el VPM al igual que el haloperidol, requiere ser administrado al menos por tres semanas antes de que se observe alguna mejoría en los pacientes (Höschl y Kozeny 1989).

El VPM ha sido conceptualizado como un antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, datos obtenidos en nuestro laboratorio hacen difícil seguir considerando al VPM

exclusivamente como bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que en sinaptosomas de cerebro completo de ratón inhibe tanto al componente  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de la liberación de  $[\text{^3H}]$ -GABA inducido por despolarización con alto  $\text{K}^+$  (Sitges y col., 1993), como la liberación del componente  $\text{Na}^+$  dependiente de  $[\text{^3H}]$ -GABA inducido por veratridina en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Sitges, 1989). Además, en sinaptosomas de estriado de rata, el VPM incrementa la liberación basal de  $[\text{^3H}]$ -DA aun en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Sitges y col., 1990).

## **5.- DESORDENES AFECTIVOS**

### **5A.- Características generales.**

La neuroquímica de los desórdenes psiquiátricos, pese a sus limitaciones, se ha convertido en un campo muy fructífero. El desarrollo de hipótesis sobre las posibles causas de los desórdenes mentales ha permitido la interacción entre la investigación psiquiátrica y la investigación básica.

Dentro de los padecimientos psiquiátricos más comunes se encuentran los desórdenes afectivos (Malenka, col., 1989; DSM-IV, 1995). Los desórdenes afectivos se refieren a un grupo de enfermedades psiquiátricas caracterizadas por cambios en el estado de ánimo que pueden alterar los procesos cognoscitivos, de juicio y de relaciones interpersonales. Dentro de los desórdenes afectivos se encuentran las depresiones mayores, que pueden ser de tipo unipolar o depresión recurrente y de tipo bipolar o maniaco depresiva. Los síntomas generales de los desórdenes unipolares son: humor disfórico agudo, pérdida generalizada de interés y la pérdida de la capacidad para experimentar placer. Los criterios que se utilizan para diagnosticar este tipo de desórdenes afectivos son: sueño alterado (insomnio y/o despertares nocturnos), apetito disminuido, pérdida de energía, impulso sexual disminuido, agitación psicomotora, retardo en pensamientos y acciones, dificultad para concentrarse, ideas de culpabilidad, pensamientos de suicidio (DSM-IV, 1995). Se presenta un aumento en la intensidad de los síntomas por la mañana, la duración

de estos episodios puede ser de entre 4 y 12 meses. La edad más frecuente para la aparición de los primeros episodios característicos de la depresión es alrededor de los 40 años. La frecuencia de la aparición de esta enfermedad es mayor en mujeres que en hombres. Los pacientes que presentan desórdenes bipolares sufren episodios subsecuentes de manía y depresión. La manía se caracteriza por la presencia de humor elevado expansivo e irritabilidad, sobreactividad, verborrea, libido y energía incrementados, estrés, fugas de ideas, grandiosidad, distractibilidad, necesidad de sueño disminuida, conductas temerarias y delirios, estos últimos síntomas también son parte de los síntomas psicóticos. Este tipo de desórdenes se presentan más comúnmente a los 30 años, en cualquier sexo (Malenka y col., 1989; DSM-IV, 1995).

### **5B.- Hipótesis monoaminérgicas de los desórdenes afectivos.**

La idea más aceptada acerca del substrato neurológico de los desórdenes afectivos es una deficiencia funcional en los niveles de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) (Miller y col., 1996). Por consiguiente los fármacos antidepresivos actuarían restituyendo el desbalance en estos neurotransmisores. La hipótesis catecolaminérgica de los trastornos afectivos propone que los estados depresivos se deben a una disminución funcional de los niveles de catecolaminas, mientras que los desórdenes maníacos probablemente se deben a un exceso en los niveles de catecolaminas en regiones particulares del cerebro (Miller y col., 1996). Estas hipótesis se basan en la correlación de las respuestas psicológicas sobre los cambios metabólicos que ejercen la gran variedad de agentes psicotrópicos en las diferentes regiones del cerebro (Malenka, col., 1989; Miller y col., 1996).

El alcaloide natural reserpina ha sido empleado desde hace varios siglos en la India como tratamiento en enfermedades mentales. A principios de los años 50 la reserpina fue empleada para tratar hipertensión así como en el tratamiento de la esquizofrenia. Experimentalmente se observó que animales tratados con reserpina desarrollaban síntomas

parecidos a la depresión como son sedación y disminución en la actividad motora. Posteriormente se descubrió que la reserpina causaba un vaciamiento de las pozas sinápticas de NA, 5-HT y DA. En comparación con la reserpina, la iproniazida, un compuesto sintetizado en los años 50, empleado como tratamiento contra la tuberculosis, causaba euforia e hiperactividad motora en algunos pacientes. Datos posteriores demostraron que este fármaco incrementa la concentración de NA, 5-HT y DA a través de la inhibición de la enzima monoamino-oxidasa (MAO). Pronto se descubrió que la iproniazida, como otros inhibidores de la enzima MAO, también podía ser empleada como antidepresivo (Kandel y Kupfermann, 1995).

### **5C.- Tratamientos para los desórdenes afectivos**

Existen numerosos tratamientos efectivos para los desórdenes afectivos, entre los que se encuentran: la terapia electroconvulsiva, las drogas antidepresivas y las sales de Li<sup>+</sup>. En pacientes con depresión mayor cuyo tratamiento farmacológico no ha sido exitoso la terapia electroconvulsiva produce alrededor del 90 % de mejoría. La terapia electroconvulsiva, pese a que ha sido empleada desde la década de los años 40, a la fecha se desconoce con exactitud su mecanismo de acción. La hipótesis sobre el funcionamiento de esta terapia, se basa en el posible aumento en el umbral de respuesta de las neuronas como resultado de las continuas descargas eléctricas a lo largo de este tratamiento (Yudofsky, 1982; Weiner y Krystal, 1994). Otro tratamiento empleado en la terapia de los desórdenes afectivos son las sales de Li<sup>+</sup>, las cuales son efectivas para evitar o atenuar las crisis maníacas y maniaco-depresivas recurrentes. Las sales de Li<sup>+</sup> fueron empleadas por primera vez en pacientes en 1949. Del mecanismo de acción de las sales de Li<sup>+</sup> se sabe que pueden competir con el Ca<sup>2+</sup> en los sitios de las enzimas Ca<sup>2+</sup> regulables como las que se enlistan en la Tabla I (Meltzer, 1986, Malenka y col 1989; Kandel y Kupfermann, 1995). Como se puede observar en esta tabla el Li<sup>+</sup> es un inhibidor de la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Sin embargo, en los tratamientos crónicos con Li<sup>+</sup> o con antidepresivos se observa la



translocación de la PKA del citoplasma al núcleo celular así como de un incremento en los niveles de la proteína DARPP-32 (Guitart y Nestler, 1992). El incremento de estas fosfoproteínas, podría estar relacionado con el aumento en los niveles del RNAm, en especial de los que codifican para la enzima tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de DA observado en tratamientos crónicos con Li<sup>+</sup> o con antidepresivos (Jope y Williams, 1994).

-----  
**TABLA I REGULACIÓN ENZIMÁTICA POR EL Li<sup>+</sup>**  
 -----

SISTEMA	EFFECTO DE Ca <sup>2+</sup>	EFFECTO DE Li <sup>+</sup>	CONCENTRACIÓN DE Li <sup>+</sup>
Adenilato ciclasa	activador	inhibidor	1 mM
Glucógeno sintetasa	inhibidor	activador	1 mM
Triptofano hidroxilasa	activador	inhibidor	1 μM
Inositol-1-fosfatasa	inhibidor competitivo	inhibidor no competitivo	0.8 mM

-----  
 Tomado de Meltzer (1986).

### 6.- Preparación sinaptosomal como modelo de estudio de la liberación de neurotransmisores *in vitro*

Gracias a la 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 estructuras continuas de forma regular conocidas como sinaptosomas.

Cuando se homogeneiza el cerebro completo o alguna estructura cerebral en particular previamente disecada, las membranas de las terminales nerviosas se rompen en las

zonas de mayor adelgazamiento y menor resistencia. De esta forma es posible obtener terminales nerviosas aisladas a partir de homogenados parciales del cerebro completo o de alguna estructura cerebral de interés (Gray y Whitaker 1962), ya que las terminales nerviosas se separan de su axón, conservando en su interior el citoesqueleto, los organelos y toda la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento y liberación de los neurotransmisores (Bradford 1975). Las terminales presinápticas, en su mayoría, cuentan con la propiedad de recapturar a los neurotransmisores que han sido liberados al espacio sináptico y llevarlos a su interior por medio de un sistema de transporte activo de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  y de temperatura. Este sistema le confiere a la terminal sináptica la propiedad de incorporar selectivamente al neurotransmisor que fisiológicamente libera.

Esta propiedad que se preserva en los sinaptosomas representa una gran ventaja, ya que cuando la preparación sinaptosomal es incubada en un medio que contiene a un determinado neurotransmisor marcado radioactivamente, este es incorporado por la preparación y de esta forma se hace posible seguir la liberación de neurotransmisor radioactivo o incluso estudiar su misma captación en diferentes condiciones experimentales (Fonnum y col., 1981). Evidentemente esto representa otra ventaja de la preparación sinaptosomal ya que en una población heterogénea de sinaptosomas, sólo aquellos que cuenten con los sistemas de captura de alta afinidad para ese neurotransmisor serán capaces de captarlo y liberarlo cuando sean sometidos a las condiciones que propicien su captura o su liberación bajo diferentes condiciones experimentales (Levi y col., 1978; Bradford, 1975). Por estas características se puede decir que la preparación sinaptosomal permite analizar los aspectos neuroquímicos del componente presináptico de los procesos de liberación de los neurotransmisores.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existe una gran variedad de reportes clínicos en los que se demuestra que el VPM ejerce un efecto profiláctico en el tratamiento de pacientes con desórdenes afectivos, en particular la manía (Dubovsky y Francks, 1983; Giannini y col., 1984; Caillard, 1985; Dubovsky y col., 1986; Barton y Gitlin, 1987; Pollack y col., 1987; Dubovsky y col., 1987; Höschl, 1991; Garza-Treviño y col., 1992).

El efecto antimaniaco producido por el VPM es comparable con los tratamientos tradicionales como son el haloperidol (antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos del tipo  $D_2$ ) y el haloperidol más  $Li^+$  (Höschl y Kozeny 1989).

Dado que por un lado la hipótesis monoaminérgica de los desórdenes afectivos involucra a las diferentes monomanías y que por otro lado se ha mostrado que el [ $^3H$ ]-desmetoxiverapamil se une preferencialmente a la capa molecular del hipocampo y al giro dentado (Ferry y col., 1982), ambas regiones ricas en terminales sinápticas (Murphy y col., 1982), resultaba interesante explorar los efectos del VPM sobre la liberación tanto basal como estimulada de las aminas biogénicas 5-HT y NE de sinaptosomas de hipocampo, para compararlos con los efectos del VPM sobre la liberación de DA previamente caracterizados en sinaptosomas de estriado de rata (Sitges y col., 1990).

En estudios previos del laboratorio encontramos que en sinaptosomas de cerebro de ratón el VPM inhibe el aumento de  $Ca^{2+}$  intrasinaptosomal (monitoreado con Fura-2) que induce la despolarización con  $K^+$  alto, así como la liberación  $Ca^{2+}$  dependiente de GABA inducida por  $K^+$  alto (Sitges y col., 1993). Asimismo, en células cardíacas y de músculo liso vascular, el VPM bloquea la corriente lenta de  $Ca^{2+}$  (Freckentein, 1977). Aunque estos hallazgos son acordes con un efecto antagonista de los canales de  $Ca^{2+}$ , resultaba intrigante que en sinaptosomas de estriado de rata el VPM facilitara la liberación basal de DA de manera  $Ca^{2+}$  independiente e insensible al bloqueador de los canales de  $Na^+$  sensibles a

tetrodotoxina (Sitges, 1990), de la misma manera que lo hace el haloperidol (Raiteri y col., 1978; datos no publicados obtenidos en el laboratorio).

De estudios previos hemos aprendido que el VPM no modifica de la misma manera la liberación basal y estimulada por despolarización de [<sup>3</sup>H]-GABA y [<sup>3</sup>H]-DA de sinaptosomas cargados previamente con el neurotransmisor respectivo. Por un lado el VPM incrementa "per se" la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-DA (Sitges y col., 1990) y por el otro lado inhibe la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA inducida por despolarización (Sitges y col., 1990; Sitges y col., 1993).

En virtud de lo anterior, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1.- Dado que desconocíamos si el VPM podía estimular la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-5-HT o de [<sup>3</sup>H]-NA de sinaptosomas de hipocampo cargados previamente con el neurotransmisor respectivo, decidimos explorar directamente el efecto del VPM sobre la liberación de estos neurotransmisores estimulada por despolarización, ya que este tipo de liberación es Ca<sup>2+</sup>-dependiente. En estos experimentos la preparación sinaptosomal fue expuesta simultáneamente al VPM y al agente despolarizante (alto K<sup>+</sup>). Para explorar el efecto del VPM utilizamos una concentración elevada (50 μM) del mismo sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT y [<sup>3</sup>H]-NA inducidas por despolarización, ya que en estudios previos (Sitges y col., 1990) encontramos que cuando el VPM es adicionado simultáneamente con el agente despolarizante se requiere una concentración mayor de este fármaco para apreciar la inhibición sobre la liberación estimulada del neurotransmisor [<sup>3</sup>H]-GABA inducida por despolarización (Sitges y col., 1990; Sitges y col., 1993), que cuando se expone a la preparación al VPM durante 20 min. antes de la despolarización (Sitges, 1989). A partir de los datos obtenidos en esta primera serie experimental, probamos el efecto del VPM sobre la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-5-HT y de [<sup>3</sup>H]-NA, para ser comparando con el efecto de VPM sobre la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-DA, previamente reportados (Sitges y col., 1990).

En estudios previos se había demostrado que el VPM desplazaba la unión específica del antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub>, [<sup>3</sup>H]-espiroperidol en membranas totales de estriado de

rata (De Vries y Beart, 1985; Ikegami y col., 1992). Por otro lado hay evidencias de que el receptor dopaminérgico  $D_1$  en el sistema nervioso modula la actividad del receptor dopaminérgico  $D_2$  en la síntesis de DA (Walters y col., 1987; Clark y White 1987). Aunque el espiroperidol es un ligando selectivo para el receptor dopaminérgico  $D_2$ , existe la evidencia de que este compuesto también se une con menor afinidad al receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub> (Peroutka y Snyder 1979).

2.- Lo antes mencionado nos llevó a explorar la posible unión de VPM a los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$ , así como a los receptores serotoninérgicos en membranas de sinaptosomas obtenidas tanto de estriado como de hipocampo de rata.

La liberación de DA puede ser inducida a través del mecanismo conocido como heterorrecambio, en el cual sustancias como las anfetaminas, cocaína ó el bupropion, bloqueadores de la captura de este neurotransmisor, estimulan su liberación (Hyttel, 1978; Sulzer y col., 1993; Sitges y col., 1994). El VPM facilitara la liberación basal de DA de manera  $Ca^{2+}$  independiente e insensible al bloqueador de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje en presencia de tetrodotoxina (Sitges, 1990).

3.- Para explorar si el VPM podía estimular la liberación de DA a través del mecanismo de heterorrecambio, investigamos el efecto del VPM sobre la liberación de DA, en ausencia así como en presencia del inhibidor del transporte de DA, bupropion.

El efecto del VPM en la liberación de monomaniyas endógenas así como de sus principales metabolitos de degradación también fue estudiado, ya que algunos receptores presinápticos han mostrado ser capaces de modular la síntesis de catecolaminas (Bagchi, 1990; Gobert y col., 1995, Grace y col., 1997). El método de perfusión continua permite detectar cambios en la liberación de neurotransmisores a tiempos más cortos, impide la recaptura del neurotransmisor liberado, eliminando la posible participación de los receptores presinápticos en los procesos de liberación.

4.- Para estudiar los efectos del VPM sobre la liberación de DA y 5-HT endógenas así como sus principales metabolitos de degradación, lo que nos permitiría inferir la posible

participación de este compuesto en los mecanismos de síntesis del neurotransmisor, empleamos sinaptosomas en suspensión, así como la detección por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a sistema de detección electroquímica de las monomanías.

## IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 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 el presente trabajo se estudió la liberación de 3 neurotransmisores como son: DA 5-HT y NA. Se disecaron estructuras cerebrales ricas en terminales nerviosas específicas para cada uno de los neurotransmisores estudiados. Para la obtención de terminales dopaminérgicas fue elegido el cuerpo estriado por contener la mayor cantidad de terminales nerviosas dopaminérgicas del cerebro. De la misma manera la región del hipocampo fue elegida para la obtención de terminales serotoninérgicas y noradrenérgicas por ser una de las regiones con mayor cantidad de terminales nerviosas para estos neurotransmisores(Ascher y col., 1995), además sabemos que el [<sup>3</sup>H]-desmetoxiverapamil, compuesto análogo del VPM, se une preferencialmente a la capa molecular y al giro dentado del hipocampo (Ferry y col., 1982),.

Para aislar las terminales nerviosas tanto de estriado como de hipocampo de rata se siguió el método de Hajós (1975) ligeramente modificado, siguiendo los pasos que brevemente se describen a continuación. Se decapitan las ratas macho, cepa Wistar con un peso de entre 200-250 g, se les extrae el cerebro y se disecan las estructuras de interés. Una vez obtenidos los estriados o hipocampos de las ratas. éstos se homogeneizan en sacarosa 0.32 M (1:9 peso volumen). El homogenado se centrifuga a 1 500 x g durante 10 min. y el precipitado se desecha. El sobrenadante que resulta de esta primera centrifugación se centrifuga a 9 000 x g durante 20 min. El precipitado que se obtiene de esta segunda centrifugación constituye la fracción sinaptosomal cruda conocida como fracción P<sub>2</sub>.

## **2.- Sistema de Perfusión**

Para estudiar la liberación de los neurotransmisores radioactivos 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 colocan filtros de nitrocelulosa de  $0.65 \mu\text{m}$  de tamaño de poro con el objeto de retener a los sinaptosomas que miden en promedio  $1 \mu\text{m}$ . Estas 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 se vierten los diferentes medios de perfusión que bañan a la preparación y determinan las diferentes condiciones experimentales. Cada una de las cámaras está conectada por su parte inferior a una tubería de "tygon" de  $0.32 \text{ mm}$ . 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. Los tubos que salen por el extremo opuesto de cada "cassette" terminan directamente en los reservorios recolectores. El transmisor radioactivo liberado arrastrado por el Ringer de perfusión se colectó cada minuto. La velocidad de flujo que se empleó en este trabajo fue de  $0.5 \text{ ml/min}$ .

El 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 alícuotas de la misma preparación sinaptosomal cuando estas son bañadas con medios de perfusión de diferente composición.

## **3.- Medios de Perfusión**

Para estudiar el efecto del VPM y de otros fármacos sobre la liberación tanto basal como estimulada por despolarización ( $\text{K}^+ 37.3 \text{ mM}$ ) de los neurotransmisores radiactivos, se empleó un Ringer Krebs bicarbonato con la siguiente composición (en mM): NaCl 127,



$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18,  $\text{KCl}$  3.73,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{MgSO}_4$  1.18,  $\text{NaHCO}_3$  20 y glucosa 11.2; pH 7.4 gaseado con una mezcla de  $\text{CO}_2:\text{O}_2$  (5%:95%), mantenido a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Para evitar la degradación de las aminas biogénicas (DA, 5-HT y NA) liberadas se añadió el inhibidor de la enzima MAO, pargilina (0.1 mM) y ácido ascórbico (0.1 mg/ml) como antioxidante. En los medios libres de  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{CaCl}_2$  se omitió del Ringer Krebs y se añadió el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . En los medios despolarizantes de alto  $\text{K}^+$ , 37 mM de  $\text{KCl}$  se reemplazó por una cantidad equimolar de  $\text{NaCl}$ . La composición del Ringer Krebs se modificó con la presencia del compuesto a probar.

#### **4.- Captura del neurotransmisor marcado radioactivamente**

Para cuantificar la liberación de los diferentes neurotransmisores estudiados en este trabajo, se procedió a incorporar al neurotransmisor radioactivo en los sinaptosomas de la siguiente manera: El precipitado resultante de la segunda centrifugación se resuspendió en 1 ml de glucosa 0.32 M y luego, se diluyó 1:10 con Ringer Krebs sin glucosa. De esta suspensión sinaptosomal se tomó una alícuota y se preincubó durante 10 min. a  $37^\circ\text{C}$ . Al terminar la preincubación se adicionó una alícuota de neurotransmisor radioactivo ( $[^3\text{H}]$ -DA,  $[^3\text{H}]$ -5-HT o  $[^3\text{H}]$ -NA) para tener una concentración final por ensayo de 0.4  $\mu\text{Ci/ml}$ . En estas condiciones se incubó la preparación a la misma temperatura durante otros 20 minutos con el objeto de que los sistemas de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  y temperatura que están localizados en las terminales nerviosas captaran al neurotransmisor respectivo marcado radioactivamente. Una vez captado el neurotransmisor radioactivo se procedió a estudiar su liberación bajo diferentes condiciones experimentales.

#### **5.- Liberación del neurotransmisor radioactivo**

Para estudiar la liberación de los diferentes neurotransmisores se siguió el método de perfusión continua descrito en Tapia y Sitges (1982). Así al finalizar el tiempo de incubación se depositaron sobre los filtros colocados sobre la base de las cámaras de

perfusión, alícuotas de 900  $\mu$ l (aproximadamente 1 mg de proteína sinaptosomal) de la suspensión sinaptosomal previamente cargada con el neurotransmisor radioactivo. Se procedió a eliminar la radioactividad que no fue incorporada a la preparación mediante un lavado con la ayuda de la bomba peristáltica haciendo pasar Ringer Krebs bicarbonato a un flujo rápido (1.3 ml/min.) durante 15 minutos. Después del lavado, la velocidad del flujo se disminuyó a 0.5 ml/min. y se continuó el lavado durante 4 min. más. Transcurrido ese tiempo se recolectaron las fracciones del perfusado cada min. durante 6 minutos. Al cabo de este tiempo, los medios de perfusión se reemplazaron ya sea por el mismo Ringer sin (control) o con verapamil, o por el medio despolarizante sin (control) o con verapamil. La perfusión se continuó durante 8 minutos más. 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 tanto de los perfusados como de los filtros, se cuantificó con la ayuda de un contador de centelleo líquido Beckman modelo 7800. La cantidad de neurotransmisor radioactivo liberado en cada una de las condiciones experimentales es expresada como el porciento de la radioactividad total. La radioactividad total es la suma de la radioactividad de cada una de las fracciones colectadas más la radioactividad de los sinaptosomas retenidos sobre el filtro al final del experimento.

#### **6.- Cuantificación de DA, 5-HT y sus metabolitos por HPLC.**

Para estudiar el efecto del VPM sobre la liberación de las monomías endógenas y sus metabolitos, se incubaron las suspensiones de sinaptosomas de estriado (0.25 mg/ml) o de hipocampo (0.6 mg/ml) en Ringer Krebs durante 10 min. a 37°C y se expusieron al vehículo (control) o al VPM (10  $\mu$ M) durante 5 min. más. Después de este periodo la preparación se centrifugó en una microcentrifuga IEC a máxima velocidad. Los sobrenadantes y precipitados resultantes se resuspendió en la solución de análisis (0.1 mM de ácido perclórico, 0.1 mM de ácido etilendiamino tetra acético y cisteína al 0.025 %). Esta mezcla impide la degradación de las monoaminas, sus metabolitos. La pastilla

sinaptosomal fue homogeneizada en 1 ml de la misma solución de ácido perclórico EDTA, cisteína para recuperar las monománias y sus metabolitos retenidos en los sinaptosomas. La cuantificación de DA y 5-IIT así como la de sus metabolitos de degradación se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta presión Waters. El sistema de HPLC que se empleo está constituido por: una bomba 510 acoplada a una columna microbondapak C18 conectada a un detector electroquímico modelo 460 con un electrodo de trabajo (carbono) fijado en un potencial de + 0.60 mV y por un electrodo de referencia (KCl 4 M) que registra a través del cambio en el potencial de oxido-reducción. Las señales de salida fueron visualizadas al ser graficadas en un integrador Millipore modelo 730. La fase móvil empleada para estos experimentos es la reportada por Muray y col., (1988) ligeramente modificada. Su composición es la siguiente: metanol al 5%, acetato de Na<sup>+</sup> 20 mM, ácido cítrico 12.5 mM, ácido etilendiamino tetra acético 0.1 mM y ácido 1-heptanosulfónico al 0.033 %. El flujo de la fase móvil a través de la columna se ajustó a 1 ml/min. Las muestras fueron inyectadas en un volumen de 100 µl mediante un inyector automático Waters 717 que las mantenía a 4°C. La columna fue mantenida a temperatura ambiente durante esta serie experimental.

#### **7.- Experimentos de unión de radioligando-receptor.**

Para explorar si el VPM ejercía sus efectos a través de un receptor dopaminérgico o serotoninérgico se realizaron experimentos de unión de radioligando-receptor en una preparación membranal obtenida a partir de la fracción sinaptosomal de estriado o hipocampo de rata. Para obtener la preparación membranal a partir de sinaptosomas de estriado o hipocampo de rata se siguió el método previamente descrito por Benett (1978) que a continuación describo brevemente: La fracción sinaptosomal P<sub>2</sub> se resuspendió en 20 volúmenes de un buffer Tris-HCl (composición en mM: NaCl 120, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, Tris-HCl 50 mM) pH 7.7. Esta suspensión se homogeneizó durante 30 seg. con la ayuda de un "Tissumizer" (Tekman) cuyo regulador de velocidad fue colocado en la posición 5. Este homogenado se centrifugó a 30 000 x g durante 20 min. Al finalizar la centrifugación,

la pastilla obtenida se sometió una vez más al proceso anteriormente descrito. La pastilla obtenida de esta última centrifugación se resuspendió en un volumen adecuado de buffer Tris- HCl para dar una concentración final de 500 µg de proteína por tubo. La determinación de la concentración de proteína se realizó por el método descrito por Lowry, col., (1951).

Los ensayos de radioligando-receptor se llevaron a cabo por duplicado incubando 1 ml de membranas de sinaptosomas suspendida en presencia de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol (concentración final 0.5 nM), [<sup>3</sup>H]-SCH- 23390 (0.6 nM final) o [<sup>3</sup>H]-5-HT (2 nM final) y VPM, haloperidol, SCH-23390 o 5-HT a concentraciones crecientes. Para definir la unión inespecífica de los ensayos de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol se usó butaclamol 10 µM, para los ensayos de [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 se usó SCH-23390 1 mM y para los ensayos de [<sup>3</sup>H]-5-HT, serotonina 1 mM. La incubación se inició con la adición de las membranas sinaptosomales de estriado o de hipocampo (200 µg de proteína), se llevó a cabo a 37°C durante 30 min. El ensayo se finalizó por filtración rápida (4 volúmenes de 3 ml de buffer Tris a 4°C) en filtros Whatman GF/B de fibra de vidrio. La elección de estos filtros se realizó en base a la nula unión inespecífica que presentan por los ligandos radioactivos utilizados en esta serie de experimentos. Los filtros secos se colocaron en viales y se adicionaron 5 ml de tritosol (Fricke 1975) para cuantificar la radioactividad contenida en las membranas retenidas por cada uno de los filtros. La constante de inhibición (K<sub>i</sub>) de los diferentes compuestos empleados en este estudio fue calculada con la ayuda del programa de computación EBDA (McPherson 1985).

### III.- RESULTADOS

#### 1.- Efecto del VPM sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT [<sup>3</sup>H]-NA , [<sup>3</sup>H]-DA estimulada con K<sup>+</sup> alto.

Para probar el efecto del VPM sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT y [<sup>3</sup>H]-NA estimulada por despolarización, los sinaptosomas de hipocampo de rata fueron sometidos a la acción de K<sup>+</sup> alto (37 mM) en presencia y en ausencia de VPM 50 μM. Los sinaptosomas no fueron previamente tratados con VPM antes de ser sometidos a la condición despolarizante ya que se desconocía si el VPM "per se" podía incrementar la liberación basal de cualquiera de estas dos monomanías como ha sido previamente reportado para el caso de [<sup>3</sup>H]-DA (Sitges, col., 1990). La concentración de VPM (50 μM) fue escogida con base en nuestra experiencia previa del efecto inhibitorio de este fármaco sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA estimulada por despolarización. Sabemos que cuando los sinaptosomas son expuestos 15 min. antes y durante la despolarización una concentración de 20 μM de VPM es suficiente para inhibir la liberación de GABA estimulada por despolarización. Sin embargo cuando el VPM es adicionado simultáneamente con la condición despolarizante se requieren concentraciones mayores de VPM (al menos 50 μM) para inhibir la liberación estimulada de GABA (Sitges, col., 1990; Sitges, col., 1993).

Las figuras de la número 1 a la número 5 se encuentran localizadas en el trabajo previamente publicado, anexo a esta sección.

La Fig. 1A muestra que cuando el VPM se encuentra presente en el medio despolarizante la liberación estimulada de [<sup>3</sup>H]-5-HT de sinaptosomas de hipocampo es inicialmente inhibida (min. 8-9) y posteriormente facilitada (min. 10-14). Mientras que la liberación de [<sup>3</sup>H]-NA estimulada por K<sup>+</sup> alto es inhibida en los sinaptosomas expuestos a VPM simultáneamente con la condición despolarizante (Fig. 1B).

En paralelo a la liberación de estas dos monomanías se comparó el efecto del VPM sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA de sinaptosomas de estriado de rata. Como previamente

## **2.- Dependencia de $\text{Ca}^{2+}$ de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT y [ $^3\text{H}$ ]-NA estimulada por $\text{K}^+$ alto.**

La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT, [ $^3\text{H}$ ]-NA de sinaptosomas de hipocampo de rata inducida por despolarización con  $\text{K}^+$  alto se muestra en la Fig. 2. La liberación de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT inducida por 37 mM de  $\text{K}^+$  es parcialmente inhibida en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo con respecto al control (Fig. 2A), mientras que la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-NA inducida por  $\text{K}^+$  alto es completamente dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2B).

## **3.- Efecto del VPM sobre la liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT, [ $^3\text{H}$ ]-NA y [ $^3\text{H}$ ]-DA**

La fig. 3A muestra como una concentración alta (50  $\mu\text{M}$ ) de VPM es capaz de inducir la liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT. Sin embargo, la misma concentración de VPM es incapaz de incrementar la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-NA de alicuotas la misma fracción sinaptosomal de hipocampo, cargadas con su respectivo neurotransmisor (fig. 3B).

La fig. 3C muestra como el VPM (10  $\mu\text{M}$ ) aumenta considerablemente la liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-DA.

## **4.- El efecto del VPM sobre la liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-DA y [ $^3\text{H}$ ]-5-HT es dependiente de dosis.**

La fig. 6A (tomada de Sitges et al. 1990) muestra que a concentraciones crecientes de VPM se produce un aumento progresivo de la liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-DA. En la Fig. 4B se muestra la curva dosis-respuesta calculada de la Fig. 6A (los valores graficados representan la respuesta al VPM acumulada en 7 min.). La  $\text{DE}_{50}$  calculada de estos resultados es de 5  $\mu\text{M}$ .

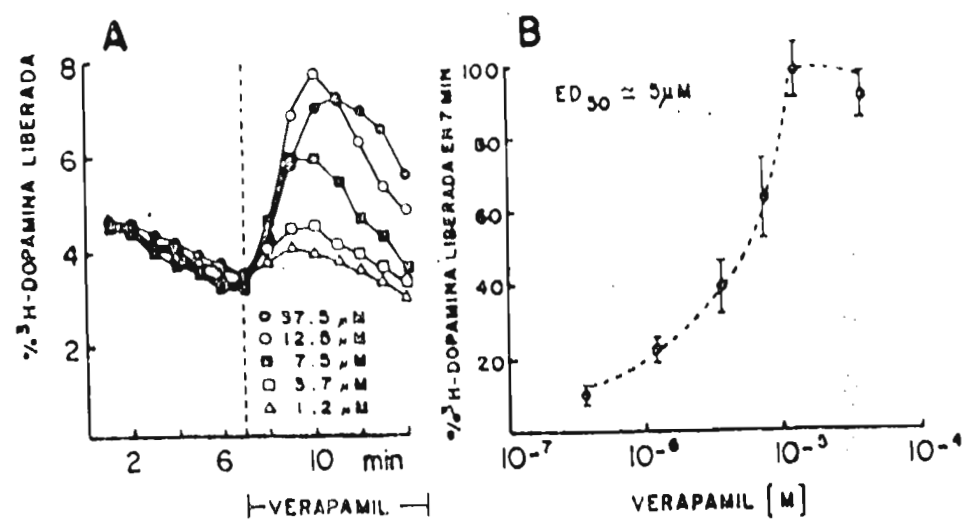


Fig. 6 Tomada de Sitges y col., 1990

La Fig. 3a muestra que el VPM también aumenta la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-5-HT de sinaptosomas de hipocampo de forma dosis dependiente, en un rango de concentración que va de 1.5 a 50 μM. El inserto de la Fig. 3a muestra los incrementos en la liberación de 5-HT inducidos por las concentraciones crecientes de VPM durante 7 min.: la concentración de VPM más baja (1.5 μM) libera  $3.8 \pm 1.2$  % de [<sup>3</sup>H]-5-HT en 7 min. Las concentraciones de 5, 15 y 50 μM de VPM incrementan la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT en:  $7 \pm 1.3$ ,  $13 \pm 1.8$  y  $24.9 \pm 3.6$  %, respectivamente durante 7 min.

A la concentración de 12.5 μM, el VPM ya induce la máxima respuesta sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA en sinaptosomas de estriado (Fig. 4B), mientras que el VPM a la concentración de 15 μM produce menos del 50 % de la máxima respuesta sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT de sinaptosomas de hipocampo (Fig. 3a).

#### **5.- Efecto del VPM sobre la liberación de DA endógena de sinaptosomas de estriado de rata.**

La liberación de DA endógena así como la de su principal metabolito de degradación, el DOPAC fue cuantificada en sinaptosomas de estriado en suspensión en presencia de VPM 10 μM durante 5 min. en condiciones no despolarizantes. La parte superior de la tabla I muestra que en el sobrenadante obtenido de los sinaptosomas tratados con VPM los niveles de DA se incrementan un 70% con respecto al valor control. Por el contrario la cantidad de DA retenida en los sinaptosomas expuestos a VPM disminuye en un 56% en comparación con el valor control. La cantidad total de DA (i.e. la cantidad de DA liberada al sobrenadante más la retenida en la fracción sinaptosomal) en los sinaptosomas control y en los tratados con VPM es similar (aproximadamente de 1000 pmoles/mg de proteína sinaptosomal).

La parte inferior de la tabla I muestra que aun en presencia de pargilina, el DOPAC, principal metabolito de degradación de DA es producido en cierto grado. También se puede observar que casi todo el DOPAC es detectado en el sobrenadante y solamente una pequeña



cantidad se encuentra presente en la fracción sinaptosomal. Sin embargo ni la cantidad de DOPAC liberada ni la retenida en la fracción sinaptosomal se modifican en presencia de VPM. Bajo las condiciones experimentales de este trabajo ningún otro metabolito de degradación de la DA fue detectado.

Los niveles de NA y sus metabolitos de degradación no pudieron ser cuantificados bajo estas condiciones experimentales ya que éstos eluían junto con el frente del solvente haciendo poco confiable su cuantificación.

#### **6.- Efecto del VPM sobre la liberación de 5-HT endógena de sinaptosomas de hipocampo.**

El efecto del VPM sobre la liberación de 5-HT endógena y de su principal metabolito de degradación, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA) se estudió en suspensiones de sinaptosomas de hipocampo. En la parte superior de la Tabla II se muestra que en los sinaptosomas de hipocampo expuestos al VPM a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 5 min., la liberación de 5-HT endógena se incrementa significativamente (40%). Para determinar si la liberación basal de 5-HT inducida por VPM tampoco era dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, como habíamos encontrado para la liberación de [3H]-DA de sinaptosomas de estriado (Sitges et al. 1990) también estudiamos el efecto del VPM sobre la liberación basal de 5-HT endógena de sinaptosomas de hipocampo en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. En la misma Tabla se muestra que el incremento de la liberación de 5-HT que produce el VPM sobre los valores control (sinaptosomas incubados en ausencia de VPM) es similar en los sinaptosomas expuestos al VPM en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y en los sinaptosomas expuestos al VPM en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $24 \pm 0.9$  y  $26 \pm 2.6$  pM de 5-HT/mg de proteína sinaptosomal, respectivamente). En la tabla II también se muestra que la cantidad de 5-HT retenida en los sinaptosomas tratados con VPM es menor en comparación al valor control, por lo que no se observan cambios en los niveles de 5-HT totales (i.e. 5-HT liberada en el sobrenadante más la retenida en la fracción sinaptosomal). En la parte inferior de la tabla II se puede observar

sinaptosomas tratados con VPM es menor en comparación al valor control, por lo que no se observan cambios en los niveles de 5-HT totales (i.e. 5-HT liberada en el sobrenadante más la retenida en la fracción sinaptosomal). En la parte inferior de la tabla II se puede observar que no obstante la presencia de pargilina, en el sobrenadante tanto de los sinaptosomas control como los expuestos a VPM se detectan cantidades similares de 5HIAA, el principal metabolito de degradación de 5-HT. La presencia de VPM no modifica sin embargo, los niveles de 5HIAA en el sobrenadante, que se mantienen iguales en los sinaptosomas control y en los tratados con VPM tanto en presencia como en ausencia de Ca. En la fracción sinaptosomal solamente se detecta una pequeña cantidad de este metabolito. Por consiguiente, al comparar los niveles totales de 5HIAA en presencia de VPM con respecto al control tampoco se observan cambios significativos en el patrón de distribución de este metabolito.

#### **7.- El VPM no inhibe el homorecambio de DA.**

Para probar si el VPM estimulaba la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-DA a través de un bloqueo de su recaptura como lo hace el bupropion (Sitges y Reyes 1995) comparamos el efecto del VPM y del bupropion sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA estimulada por homorecambio con DA fría. Estudiamos inicialmente la liberación basal de [<sup>3</sup>H]-DA en presencia de VPM o bupropion y sobre esta liberación probamos la estimulación con DA fría. De esta forma tratamos de disminuir la pérdida de radioactividad causada por el VPM o el bupropion cuando estos son añadidos desde el lavado. La figura 7a muestra como la dopamina fría estimula la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA. De esta forma, el bupropion inhibe la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA inducida por homorecambio con 3  $\mu$ M de DA fría (fig. 7c) No obstante, este inhibidor selectivo de la recaptura de DA, incrementa por si mismo la radioactividad liberada (Fig. 7c) por heterorrecambio (Sitges y col., 1995). En contraste, la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA inducida por homorecambio con DA fría se sobrepone al incremento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-DA en respuesta al VPM (Fig. 7b). Estos datos indican que a

mecanismo. Dados los antecedentes, así como los datos presentados hasta ahora en esta tesis, cabía la posibilidad de que los efectos paradójicos del VPM estuvieran relacionados con algún tipo de autorreceptor. Con este propósito realizamos los experimentos de desplazamiento que a continuación se presentan.

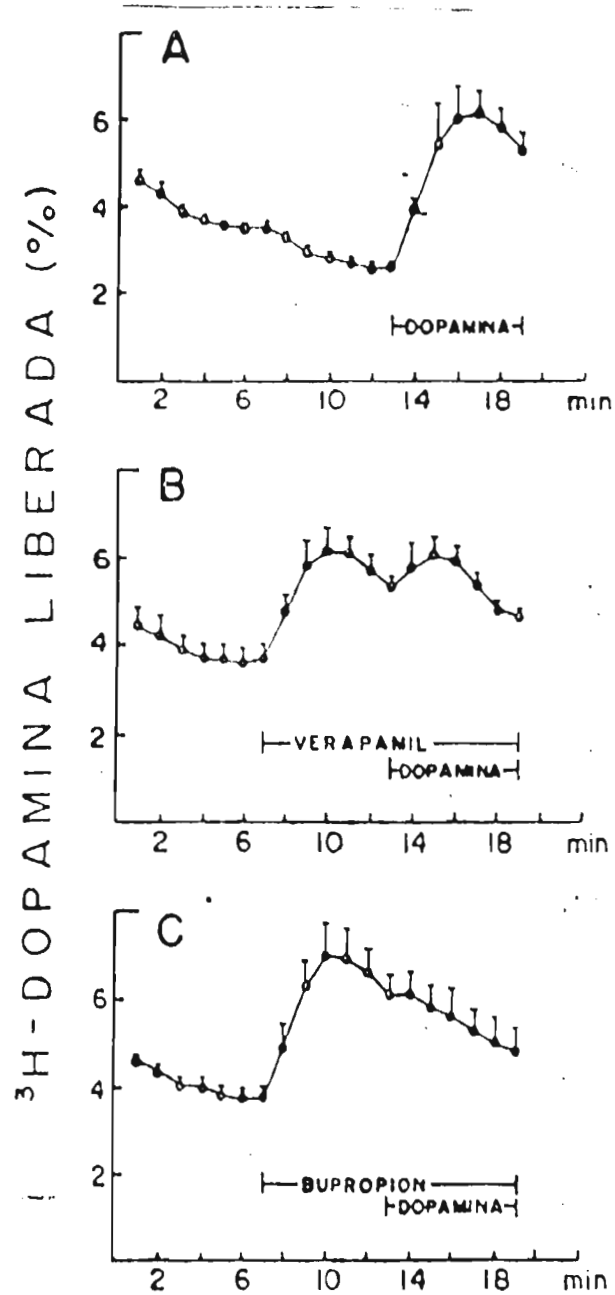


Fig. 7.- Efecto del VPM y del bupropion sobre la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  estimulada por homorecambio con DA fría. Sinaptosomas de estriado de rata fueron incubados con  $[^3\text{H}]\text{-DA}$  durante 60 min. a  $37^\circ\text{C}$  y perfundidos con Ringer normal. A partir del minuto 7 el Ringer normal fue sustituido por el mismo Ringer (A) o por un Ringer normal que además contenía bupropion  $300\ \mu\text{M}$  (B) o VPM  $20\ \mu\text{M}$  (C). Del minuto 13 al 19 cada medio de perfusión contenía también DA fría  $10\ \mu\text{M}$ . Los resultados son la media  $\pm$  los errores estándar de tres experimentos independientes por duplicado.

## **8.- Efecto del VPM sobre la unión específica de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol y [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 a membranas de sinaptosomas de estriado.**

En un intento por explorar las posibles interacciones del VPM con los receptores dopaminérgicos presinápticos decidimos estudiar el efecto del VPM sobre la unión específica del antagonista D2 [<sup>3</sup>H]-espiroperidol y del antagonista D1, [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 a membranas de sinaptosomas de estriado.

La Figura 4A muestra que el VPM desplaza la unión de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol a membranas de sinaptosomas de estriado con una  $K_i$  calculada de  $2.4 \times 10^{-6}$  M mientras que el VPM desplaza la unión de [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 con una  $K_i$  calculada de  $9 \times 10^{-6}$  M. El efecto del VPM sobre la unión específica de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol se comparó con el del antagonista típico D2, haloperidol (Fig. 4A). También se probó el efecto del antagonista selectivo de los receptores D<sub>1</sub>, SCH-23390 sobre la unión específica de [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 en membranas de sinaptosomas de estriado (Fig. 4B). El VPM es menos potente que ambos compuestos para desplazar la unión de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol y [<sup>3</sup>H]-SCH-23390, respectivamente. Encontramos que el haloperidol desplaza la unión específica de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol con una  $K_i$  de  $5 \times 10^{-8}$  M, similar a la previamente reportada para el haloperidol sobre la unión específica de [<sup>3</sup>H]-espiroperidol en membranas totales de estriado (Bunzo y col., 1988).

La  $K_i$  de SCH-23390 para desplazar la unión específica de [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 a membranas de sinaptosomas de estriado fue de  $2.4 \times 10^{-9}$  M que nosotros encontramos (Fig. 4B), es similar a la previamente reportada para células transfectadas con el gen clonado del receptor D<sub>1</sub> (Zhou y col., 1990, Sokoloff y col., 1992).

## **9.- Efecto del VPM en la unión específica de [<sup>3</sup>H]-5-HT en membranas de sinaptosomas de hipocampo.**

Como el espiroperidol además de unirse a los receptores dopaminérgicos también muestra afinidad por los receptores 5-HT<sub>2</sub> (Peroutka y Snyder, 1979) y se ha demostrado

que el [<sup>3</sup>H]-desmetoxiverapamil se une a la capa molecular del hipocampo, región rica en terminales serotoninérgicas (Ferry y col., 1984), también decidimos explorar el efecto del VPM sobre la unión específica de [<sup>3</sup>H]-5-HT a membranas de sinaptosomas de hipocampo. En la Figura 5 se muestra que el VPM es poco potente ( $K_i=3 \times 10^{-5}$  M) para desplazar la unión específica de [<sup>3</sup>H]-5-HT a membranas de sinaptosomas de hipocampo en comparación con la propia 5-HT ( $K_i=3 \times 10^{-8}$  M). La  $K_i$  calculada para la 5-HT en nuestros ensayos de unión es similar a la previamente reportada para la 5-HT para desplazar [<sup>3</sup>H]-5-HT en membranas totales de hipocampo de rata (Bennett, 1978).

## Effects of Verapamil on the Release of Different Neurotransmitters

M. Sitges and A. Reyes

Programa Universitario de Investigación en Salud, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (M.S.), and División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría, SSA (M.S., A.R.), México D.F., México

The effect of verapamil on resting and depolarization-induced monoamine release was investigated in rat hippocampal synaptosomes prelabeled with [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine (HT) or [<sup>3</sup>H]-norepinephrine (NE) and rat striatal synaptosomes prelabeled with [<sup>3</sup>H]-dopamine (DA). Verapamil (50 μM) completely abolishes high K<sup>+</sup>-induced [<sup>3</sup>H]-NE release, but paradoxically facilitates high K<sup>+</sup>-induced [<sup>3</sup>H]-5-HT and [<sup>3</sup>H]-DA release. All these high K<sup>+</sup>-evoked responses were Ca<sup>2+</sup> dependent. Verapamil does not modify [<sup>3</sup>H]-NE baseline release, but increases dose dependently [<sup>3</sup>H]-5-HT and [<sup>3</sup>H]-DA baseline release. Verapamil (10 μM, for 5 min) increases endogenous DA release (70%) and endogenous 5-HT release (40%) independently on the presence of external Ca<sup>2+</sup>. The total amount of these monoamines (released plus retained by the preparation) and their metabolites (DOPAC and 5-HIAA) was similar in control and verapamil-treated synaptosomes. Verapamil displaces [<sup>3</sup>H]-spiroperidol specific binding (K<sub>d</sub> of 2.4 × 10<sup>-6</sup> M) and [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding (K<sub>d</sub> of 9 × 10<sup>-6</sup> M) from striatal synaptosomal membranes, and [<sup>3</sup>H]-5-HT specific binding (K<sub>d</sub> of 3 × 10<sup>-5</sup> M) from hippocampal synaptosomal membranes. It is concluded that in addition to the Ca<sup>2+</sup> antagonistic properties of verapamil on the Ca<sup>2+</sup>-dependent, depolarization-induced release of some neurotransmitters [gamma aminobutyric acid (GABA and NE)], another mechanism probably mediated by presynaptic receptors underlies the effects of verapamil on DA and 5-HT release from discrete brain regions.

© 1995 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** striatal, hippocampal, synaptosomes, dopamine, 5-HT, norepinephrine

### INTRODUCTION

Verapamil is a phenylalkylamine that belongs to the group of drugs known in general as organic Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. In mouse brain synaptosomes verapamil prevents the K<sup>+</sup> depolarization-induced rise in

the internal Ca<sup>2+</sup> (Ca<sub>i</sub>) level (monitored with fura-2) and the release of the dissected Ca<sup>2+</sup>-dependent fraction of gamma aminobutyric acid (GABA) (Sitges et al., 1993). In heart and vascular smooth muscle cells verapamil blocks the slow inward Ca<sup>2+</sup> current (Freckenstein, 1977).

Verapamil is used as a therapeutic drug for certain cardiovascular diseases, and several clinical reports indicate a prophylactic effect of verapamil in mania (Dubovsky and Franks, 1983; Giannini et al., 1984; Caillard, 1985; Dubovsky et al., 1986; Barton and Gitlin, 1987; Dubovsky et al., 1987; Pollack et al., 1987; Hoschl, 1991; Garza-Treviño et al., 1992). The decline of the manic psychopathology induced by verapamil is fully comparable to the traditional treatments with haloperidol or haloperidol plus Li<sup>+</sup> (Hoschl and Kozeny, 1989).

Paradoxically, in addition to the Ca<sup>2+</sup> antagonist effect exerted by verapamil on the depolarization-evoked release of the amino acid neurotransmitter GABA (Sitges, 1989; Sitges et al., 1990, 1993), in striatal synaptosomes verapamil facilitates the depolarization-evoked release of dopamine (DA) and increases its baseline release in a Ca<sup>2+</sup>-independent, tetrodotoxin-insensitive manner (Sitges et al., 1990) similar to the DA D<sub>2</sub> receptor antagonist haloperidol, which in the low micromolar range increases the release of DA (Raiteri et al., 1978) in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner (unpublished results).

Since current hypotheses for explaining affective disorders such as mania involve various monoamines and on the other hand [<sup>3</sup>H]-desmethoxyverapamil has been shown to bind to the molecular layer of the hippocampus and dentate gyrus (Ferry et al., 1984), which are regions rich in synaptic nerve terminals (Murphy et al., 1982), we decided to explore the effects of verapamil on the

Received March 29, 1994; revised July 14, 1994; accepted July 18, 1994

Address reprint requests to Dr. María Sitges, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Antiguo Camino a Xochimilco 101, México 14370, D.F. México.

release of the biogenic amines, 5-hydroxytryptamine (5-HT) and norepinephrine (NE), in synaptosomes prepared from the rat hippocampus and to compare them with the effect of verapamil on DA release from striatal synaptosomes.

From our previous studies we learn that verapamil does not modify in the same manner the baseline and depolarization-evoked release of at least the neurotransmitters, [ $^3$ H]-GABA and [ $^3$ H]-DA from prelabeled synaptosomes. Verapamil, on one hand, increases per se the baseline release of [ $^3$ H]-DA (Sitges et al., 1990) and, on the other hand, inhibits the depolarization-evoked release of [ $^3$ H]-GABA (Sitges et al., 1990, 1993). Since we did not know whether verapamil will increase the baseline release of [ $^3$ H]-5-HT or [ $^3$ H]-NE from prelabeled hippocampal synaptosomes, for testing its effect on the depolarization-evoked release of these neurotransmitters, the preparation was simultaneously exposed to verapamil and to the depolarizing agent (high  $K^+$ ). A high concentration (50  $\mu$ M) of verapamil was used to test its effect on the release of [ $^3$ H]-5-HT and [ $^3$ H]-NE induced by depolarization, as we learned that when synaptosomes are exposed to verapamil 15 min before and during the depolarization, 20  $\mu$ M verapamil is enough to abolish the depolarization-evoked release of [ $^3$ H]-GABA from prelabeled synaptosomes, but when verapamil is added simultaneously with the depolarizing agent, a higher concentration is required to partially inhibit the stimulated release of [ $^3$ H]-GABA (Sitges et al., 1990, 1993).

Previous studies have shown that verapamil displaces the specific binding of the  $D_2$  antagonist [ $^3$ H]-spiroperidol to total striatal membranes (De Vries and Beart, 1985; Ikegami et al., 1992). There is evidence, however, that in addition to dopaminergic receptors, spiroperidol also binds to 5-HT $_2$  receptors (Peroutka and Snyder, 1979) and that  $D_1$  receptors in the nervous system modulate the activity of  $D_2$  receptors (Walters et al., 1987) and mediate some behavioral responses (Clark and White, 1987). Thus, the effect of verapamil on the specific binding of radiolabeled ligands for  $D_2$ ,  $D_1$ , and 5-HT receptors to synaptosomal membranes was explored.

The effect of verapamil on the release of the endogenous monoamines and their main metabolites from synaptosomal suspensions was also tested, as some pre-synaptic receptors have been shown to modulate catecholamine synthesis. The rapid continuous superfusion system used for testing the effect of verapamil on the release of the preloaded radioactive neurotransmitters has some advantages over release experiments performed in synaptosomal suspensions (i.e., permits detection of changes with a higher time resolution, prevents reuptake of the released transmitter, and eliminates possible pre-synaptic receptor-mediated effects on neurotransmitter

release). However, synaptosomal suspensions were used for the endogenous monoamine determinations with high performance liquid chromatographic (HPLC)/electrochemical detection, because of the lower sensitivity of this methodology when compared to radioactive determinations.

The results presented demonstrate that verapamil exerts diverse effects on the release of different neurotransmitters by at least two different mechanisms: one related with its  $Ca^{2+}$  antagonistic properties and the other involving presynaptic receptors.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Synaptosomes

Dissected hippocampi or striata of 6 male Wistar rats (250–300 g) were immediately placed in cold isotonic sucrose (1:10, w/v) and homogenized (7 strokes at 850 rpm, 0.15 mm pestle-vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at 1,500g for 10 min, and supernatants obtained from this centrifugation were centrifuged for another 20 min at 9,000g. The resulting pellets (containing striatal or hippocampal synaptosomes) were used to obtain synaptosomal membranes for binding assays (see below). For neurotransmitter release experiments pellets were resuspended in standard Ringer's medium (SRM; in mM: 127 NaCl, 3.37 KCl, 1.2  $KH_2PO_4$ , 1.8  $CaCl_2$ , 1.18  $MgSO_4$ , 5.6 mM dextrose, 20  $NaHCO_3$ , bubbled with a  $O_2/CO_2$  mixture to a 7.4 pH) containing pargyline (0.1 mM) to prevent monoamine metabolism and ascorbic acid (0.1 mg/ml) to prevent monoamine oxidation.

### Radioactive Neurotransmitter Release Experiments

In the experiments designed to follow the effect of verapamil on baseline and depolarization-evoked release of radiolabeled transmitter, hippocampal synaptosomes were incubated for 20 min at 37°C in the presence of 0.4  $\mu$ Ci/ml of [ $^3$ H]-5-HT or [ $^3$ H]-NE and striatal synaptosomes in the presence of [ $^3$ H]-DA (0.4  $\mu$ Ci/ml) in order to load them with the tritiated transmitters.

The continuous superfusion system used to follow [ $^3$ H]-neurotransmitter release has been previously described (Sitges et al., 1986). Briefly, after removing the radioactivity not incorporated into the preparation, synaptosomes loaded with the radioactive transmitter were superfused with SRM and perfusate fractions (0.5 ml) were collected at 1 min intervals. After obtaining baseline values the perfusion medium was rapidly substituted for the condition to be tested (i.e., high  $K^+$  with or without verapamil, high  $K^+$  with or without  $Ca^{2+}$ , or verapamil at various concentrations) and additional perfusate fractions were collected. In  $Ca^{2+}$ -free media  $CaCl_2$  was omitted from the SRM and 0.2 mM EGTA



was added. In high  $K^+$  depolarizing media, 37 mM KCl replaced an equimolar concentration of NaCl in the SRM. [ $^3H$ ]-monoamine release is expressed as the percentage of the total radioactivity incorporated in the superfused synaptosomes. Total radioactivity is the radioactivity released throughout the perfusion plus the radioactivity remaining within synaptosomes at the end of the experiment.

#### Endogenous Neurotransmitter Release Experiments

In order to test the effect of verapamil on the release of endogenous monoamines, striatal (0.25 mg/ml) or hippocampal (0.6 mg/ml) synaptosomes suspended in SRM were incubated for 10 min at 37°C and then exposed to vehicle (control) or 10  $\mu$ M verapamil for an additional 5 min. After this period the preparation was centrifuged in an IEC microcentrifuge at the highest speed. Aliquots (10–100  $\mu$ l) of the resulting supernatants and pellets resuspended in the analysis solution (0.1 mM PCA, 0.1 mM EDTA, and 0.025% L-cysteine, final concentration) were injected into a Waters HPLC system (Rochester, MN) for analysis. The HPLC system consists of a delivery pump (model 510), an automatic injector (WISP model 717), an analytical column ( $\mu$ Bondapak  $C_{18}$ , 300  $\times$  3.9 mm internal diameter, particle size 10  $\mu$ m) protected by a  $C_{18}$  corasil guard column (particle size 37–53  $\mu$ m) and an electrochemical detector (model 460) with glassy carbon used at a voltage setting of +0.6 V vs. a KCl (3 M) reference electrode. Chromatograms were plotted in an integrating recorder (model 730). The composition of the mobile phase used in these experiments was 0.02 M sodium acetate, 0.0125 M citric acid buffer, pH 3.92, containing 5% (v/v) methanol, 0.033% (w/v)  $C_7$ , and 0.1 mM EDTA. The column temperature was controlled at 25°C and the flow rate used was 1 ml/min. The monoamine concentrations in the experimental samples were calculated with the calibration curves obtained from the injection of increasing concentrations of standard solutions into the HPLC system.

#### Radioligand Binding Assay

Synaptosomal membranes were prepared by homogenizing the synaptosomal pellets obtained from the striatum or the hippocampus with a Tissumizer for 30 sec at 4°C in 40 volumes of buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.7). The homogenized solution was centrifuged at 30,000g for 20 min and the pellet was subjected to a second homogenization and centrifugation. The resulting pellet was resuspended in buffer C (in mM: 50 Tris-HCl, 120 NaCl, 5 KCl, 2  $CaCl_2$ , 1  $MgSO_4$ , 0.01 pargyline, with 0.1% ascorbic acid, pH 7.7). Radioligand binding assays were performed in duplicate by incubating a volume of 1 ml (buffer C) containing [ $^3H$ ]-spiroperidol (0.5

nM, final concentration), [ $^3H$ ]-SCH 23390 (0.6 nM, final), or [ $^3H$ ]-5-HT (2 nM, final) and verapamil, haloperidol, SCH-23390, or 5-HT at increasing concentrations. To define non-specific binding, butaclamol (10  $\mu$ M) was used in [ $^3H$ ]-spiroperidol assays; SCH-23390 (1 mM) in [ $^3H$ ]-SCH-23390 assays and 5-HT (1 mM) in [ $^3H$ ]-5-HT assays. Incubations were started by the addition of synaptosomal membranes from the striatum or the hippocampus (200  $\mu$ g protein), carried out at 37°C for 30 min and stopped by rapid vacuum filtration and addition of 4 volumes (3 ml) of ice-cold buffer C through Whatman GF/B (Clifton, NJ) glass fiber filters. The filters were counted by liquid scintillation spectrometry (Beckman LS7800, Palo Alto, CA) in 5 ml of an aqueous counting scintillation cocktail (formula: 5 g PPO, 0.1 g PCPOP in 1 toluene). Protein determinations were performed following the method of Lowry et al. (1951). Competition experiments were analyzed with the program EBDA (Macpherson, 1983).

#### Sources of Materials

DL-[7- $^3H$  (N)]-NE-HCl (specific activity 8.8 Ci/mmol), 5-[1,2- $^3H$  (N)]-HT creatinine sulfate (specific activity 29.8 Ci/mmol), 3,4-ring-2,5,6[ $^3H$ ]-DA-HCl (specific activity 40 Ci/mmol), [benzene ring- $^3H$ ]-spiroperidol (specific activity 24.9 Ci/mmol), and [N-methyl- $^3H$ ]-SCH-23390 (specific activity 72.8 Ci/mmol) were obtained from New England Nuclear (Boston, MA). 3-Hydroxy tyramine-HCl (DA), 5-HT creatinine sulfate (serotonin), NE-HCl, 1-heptanesulfonic acid (C7), and pargyline were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). R(+)-SCH-23390 HCl and (+)-butaclamol HCl were from RBI (Natick, MA). Verapamil was either from Sigma or from Knoll Laboratories (México D.F.). Haloperidol was a gift from Janssen Laboratories (México D.F.).

#### Statistics

Student's t-test was used for statistical evaluations. Differences between data were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Effect of Verapamil on High $K^+$ -Evoked Release of [ $^3H$ ]-5-HT and [ $^3H$ ]-NE

Figure 1a shows that when 50  $\mu$ M verapamil is present in the high  $K^+$  medium, the depolarization-evoked release of [ $^3H$ ]-5-HT from hippocampal synaptosomes is initially decreased (min 8–9) and then facilitated (min 10–14). Figure 1b shows that the high  $K^+$ -evoked release of [ $^3H$ ]-NE is practically abolished in the synaptosomes exposed to verapamil simultaneously with the depolarizing medium. Figure 1c shows that the

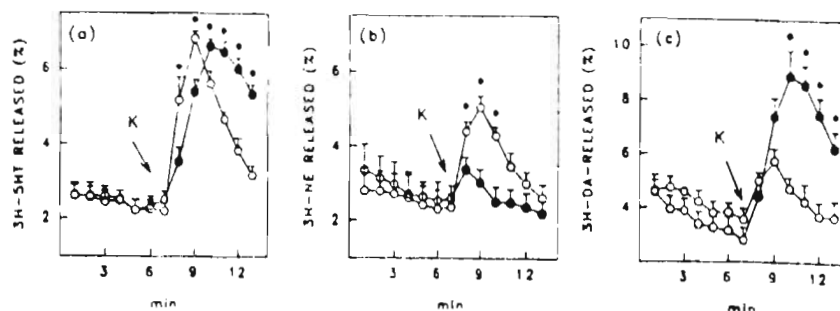


Fig. 1. Effect of verapamil on the high  $K^+$  depolarization-evoked release of [ $^3H$ ]-5-HT, [ $^3H$ ]-NE, and [ $^3H$ ]-DA. Rat hippocampal synaptosomes ( $P_2$ ) preloaded with [ $^3H$ ]-5-HT (a) or with [ $^3H$ ]-NE (b) and rat striatal synaptosomes ( $P_2$ ) preloaded with [ $^3H$ ]-DA (c) for 20 min were superfused with SRM. Where indicated (arrows) SRM was rapidly replaced by high (50 mM)  $K^+$  depolarizing medium without ( $\bullet$ ) or containing ( $\circ$ ) 50  $\mu$ M verapamil. The percentage of [ $^3H$ ] released for this

and Figures 2 and 3 is calculated as the percentage released/min of the total radioactivity contained in synaptosomes at the beginning of the perfusion experiment (total radioactivity equals the radioactivity released during the 14 min of perfusion plus that remaining in the filter at the end of the experiment). Data are the mean  $\pm$  SEM values of 5 (a) and 4 (b,c) independent experiments. \* $P < 0.05$ .

presence of verapamil in the high  $K^+$  medium facilitates the evoked release of [ $^3H$ ]-DA from aliquots of striatal synaptosomes layered in parallel perfusion chambers, as we have previously reported (Sitges et al., 1990).

For testing whether our hippocampal synaptosomal preparation was responding to high  $K^+$  depolarization in the conventional  $Ca^{2+}$ -dependent manner, [ $^3H$ ]-5-HT and [ $^3H$ ]-NE release induced by 37 mM external  $K^+$  was tested in the absence and in the presence of external  $Ca^{2+}$ . Figure 2a shows that the depolarization-induced release of [ $^3H$ ]-5-HT is considerably diminished in the absence of external  $Ca^{2+}$ , and Figure 2b shows that the depolarization-induced release of [ $^3H$ ]-NE is practically abolished in the absence of the divalent cation.

#### Effect of Verapamil on the Release of [ $^3H$ ]-5-HT and [ $^3H$ ]-NE Under Non-Depolarizing Conditions

Figure 3a shows that increasing concentrations of verapamil (1.5–50  $\mu$ M) progressively enhance the baseline release of [ $^3H$ ]-5-HT in rat hippocampal synaptosomes. At the lower concentration tested (1.5  $\mu$ M), verapamil enhanced the release of 5-HT for 7 min over control values (i.e., 5-HT released in the absence of verapamil) by  $3.8 \pm 1.2\%$ . At 5, 15, and 50  $\mu$ M, verapamil increases [ $^3H$ ]-5-HT release for 7 min over control values by  $7 \pm 1.4$ ,  $13 \pm 1.8$ , and  $24.9 \pm 3.6\%$ , respectively. When compared to high  $K^+$  depolarization, the maximum increase in [ $^3H$ ]-5-HT baseline release induced by verapamil shows a delay of 1–2 min.

Figure 3b shows that even at a high concentration (50  $\mu$ M), verapamil was unable to modify the baseline release of the [ $^3H$ ]-NE preloaded in aliquots of the same hippocampal synaptosomal preparation.

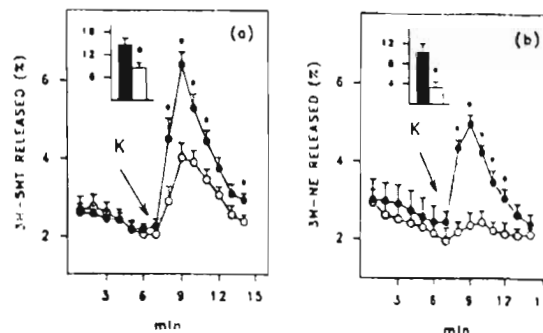


Fig. 2.  $Ca^{2+}$  dependence of the high  $K^+$ -evoked release of [ $^3H$ ]-5-HT and [ $^3H$ ]-NE. Rat hippocampal synaptosomes preloaded with [ $^3H$ ]-5-HT (a) or [ $^3H$ ]-NE (b) were perfused with SRM ( $\bullet$ , control) or with  $Ca^{2+}$ -free medium ( $\circ$ ). Where indicated (arrows) these media were rapidly replaced by high (50 mM)  $K^+$  depolarizing media with ( $\bullet$ ) or without ( $\circ$ )  $Ca^{2+}$ . Results are the mean  $\pm$  SEM values of 7 (a) and 5 (b) independent experiments. The bars represent the cumulative response (min 8–12) over control values (no depolarization) in the presence (dark bars) and in the absence (empty bars) of external  $Ca^{2+}$ . Ordinates, % of total radioactivity. \* $P < 0.05$ .

Figure 3c shows the effect of verapamil (10  $\mu$ M) on [ $^3H$ ]-DA baseline release under non-depolarized conditions. Comparison of Figure 3a and Figure 3c shows that at 10  $\mu$ M verapamil is more effective for inducing [ $^3H$ ]-DA release from striatal synaptosomes than [ $^3H$ ]-5-HT release from hippocampal synaptosomes. Furthermore, previously we have shown that the maximal increase of [ $^3H$ ]-DA release induced by verapamil in striatal synaptosomes is reached at 12.5  $\mu$ M verapamil (Sitges et al., 1990), whereas at 15  $\mu$ M, verapamil pro-

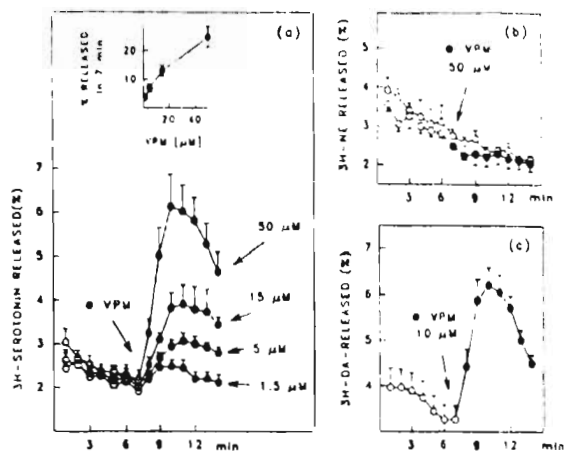


Fig. 3. Effect of verapamil on the baseline release of [ $^3$ H]-5-HT, [ $^3$ H]-NE, and [ $^3$ H]-DA. Rat hippocampal synaptosomes ( $P_2$ ) preloaded with [ $^3$ H]-5-HT (a) or [ $^3$ H]-NE (b) and rat striatal synaptosomes ( $P_2$ ) preloaded with [ $^3$ H]-DA (c) for 20 min were superfused with SRM (○). Where indicated (arrows) these media also contained verapamil (VPM; ●) at the indicated concentrations. The baseline release of [ $^3$ H]-NE during min 7–14 is shown in b (○, control values). In the inset of a, the cumulative release of [ $^3$ H]-5-HT induced by increasing concentrations of verapamil for 7 min (min 8–14) over control values is plotted. Results are the mean  $\pm$  SEM values of 3 independent experiments.

duces less than 50% of its maximal response on [ $^3$ H]-5-HT release in hippocampal synaptosomes (see Fig. 3a).

#### Effect of Verapamil on the Release of Endogenous DA From Striatal Synaptosomes

The effect of verapamil on the release of endogenous DA and its main metabolite (DOPAC) was tested in striatal synaptosomal suspensions exposed to 10  $\mu$ M verapamil for 5 min under non-depolarized conditions.

Table I (upper half) shows that in the supernatants obtained from centrifugation of the verapamil-treated synaptosomes, DA levels are increased by 70% over control values. Conversely, the amount of DA remaining in the pellet of the synaptosomes exposed to verapamil is diminished by 56% compared to control values. The total amount of DA (i.e., the DA released to the supernatant plus that remaining in the pellet) between control and verapamil-treated synaptosomes was not significantly different. The lower half of Table I shows that even in the presence of pargyline, the main metabolite of DA (DOPAC) is produced to some extent. Almost all the DOPAC is detected in the supernatant and just a low amount in the pellet. Nevertheless, neither the DOPAC released to the supernatant nor the amount of this me-

TABLE I. DA and DOPAC Released and Retained by Striatal Synaptosomes ( $\mu$ M/mg protein)<sup>a</sup>

	Supernatant	Pellet	Total
<i>DA</i>			
Control	407 $\pm$ 44	662 $\pm$ 45	1,069 $\pm$ 85
Verapamil	694 $\pm$ 105*	291 $\pm$ 59*	985 $\pm$ 71
<i>DOPAC</i>			
Control	264 $\pm$ 9	16 $\pm$ 3	276 $\pm$ 11
Verapamil	256 $\pm$ 17	15 $\pm$ 3	267 $\pm$ 11

<sup>a</sup>Results are the mean  $\pm$  SEM values of 3 independent experiments. \* $P < 0.05$ .

tabolite remaining in the synaptosomal pellet is modified by verapamil. Therefore, the total amount of DOPAC (supernatant plus pellet) is similar in control and verapamil-treated synaptosomes. Under the experimental conditions of this study other DA metabolites were not detected.

#### Effect of Verapamil on the Release of the Endogenous 5-HT From Hippocampal Synaptosomes

The effect of verapamil on the release of endogenous 5-HT and its main metabolite (5-HIAA) was tested in hippocampal synaptosomal suspensions exposed to 10  $\mu$ M verapamil for 5 min under non-depolarized conditions. Table II (upper half) shows that verapamil increases the baseline release of endogenous 5-HT about 40% over control values. This increase is independent on the presence of external  $Ca^{2+}$ : the amount of endogenous 5-HT released by verapamil from synaptosomes incubated in  $Ca^{2+}$  free medium (EGTA present) and in 1 mM  $Ca^{2+}$ -containing medium is similar. The amount of 5-HT retained by hippocampal synaptosomes (packed in the pellets) treated with verapamil is lower than in control synaptosomes. This change is also independent on the presence of  $Ca^{2+}$ . The total amount of 5-HT (i.e., 5-HT released to the supernatant plus that remaining in the pellet) is not changed by verapamil.

Table II (lower half) shows that the main metabolite of 5-HT, 5-HIAA, is also detected even in the presence of pargyline. Most of the 5-HIAA is detected in the supernatant. Only a low level is detected in the hippocampal synaptosomes packed in the pellet fraction. Verapamil does not modify this distribution pattern of 5-HIAA. The same results are obtained in synaptosomes incubated in the presence and in the absence of  $Ca^{2+}$ .

The effect of verapamil on the release of NE and their metabolites is not presented, because under the experimental conditions used in this study this transmitter runs very close to the front of the chromatogram and the determinations are not reliable.

TABLE II. 5-HT and 5-HIAA Released and Retained by Hippocampal Synaptosomes ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein)<sup>1</sup>

	Supernatant	Pellet	Total
<i>5-HT</i>			
Control (Ca)	18 $\pm$ 1.2	19 $\pm$ 1.2	36 $\pm$ 2.4
Verapamil (Ca)	24 $\pm$ 0.9*	13 $\pm$ 0.7*	37 $\pm$ 1.2
Control (EGTA)	17 $\pm$ 1.9	22 $\pm$ 1.6	39 $\pm$ 3.4
Verapamil (EGTA)	26 $\pm$ 2.6*	16 $\pm$ 1.6*	42 $\pm$ 2.8
<i>5-HIAA</i>			
Control (Ca)	22 $\pm$ 5.1	2 $\pm$ 0.3	23 $\pm$ 5.1
Verapamil (Ca)	23 $\pm$ 3.8	2 $\pm$ 0.5	26 $\pm$ 3.6
Control (EGTA)	25 $\pm$ 6.2	2 $\pm$ 0.5	27 $\pm$ 6.2
Verapamil (EGTA)	24 $\pm$ 5.4	2 $\pm$ 0.4	26 $\pm$ 5.6

<sup>1</sup>Results are the mean  $\pm$  SEM values of 3 independent experiments. \* $P < 0.05$ .

#### Effect of Verapamil on the Specific [<sup>3</sup>H]-Spiroperidol and [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 Binding to Striatal Synaptosomal Membranes

In an attempt to explore possible interactions of verapamil with presynaptic dopaminergic receptors, the effect of verapamil on the specific binding of the D<sub>2</sub> antagonist, [<sup>3</sup>H]-spiroperidol, and on the specific binding of the D<sub>1</sub> antagonist, [<sup>3</sup>H]-SCH-23390, to membranes obtained from striatal synaptosomes was tested. Figure 4 shows that verapamil displaces [<sup>3</sup>H]-spiroperidol binding from striatal synaptosomal membranes with a calculated K<sub>i</sub> of  $2.4 \times 10^{-6}$  M and [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 binding with a K<sub>i</sub> of  $9 \times 10^{-6}$  M.

The effect of verapamil on [<sup>3</sup>H]-spiroperidol specific binding is compared with that of the typical D<sub>2</sub> antagonist, haloperidol (Fig. 4a), and with that of the selective D<sub>1</sub> antagonist, SCH-23390 (Fig. 4b), on [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding. Verapamil is less potent than both compounds to displace [<sup>3</sup>H]-spiroperidol and [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding, respectively. The calculated K<sub>i</sub> for haloperidol on [<sup>3</sup>H]-spiroperidol specific binding is  $5 \times 10^{-8}$  M, similar to that previously reported for haloperidol displacement of [<sup>3</sup>H]-spiroperidol binding to rat striatum (Bunzow et al., 1988). The K<sub>i</sub> calculated here for [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding displacement by cold SCH-23390 to striatal synaptosomal membranes ( $2.4 \times 10^{-9}$  M) is also similar to that previously reported for [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding displacement by cold SCH-23390 in cells transfected with D<sub>1</sub> receptor encoding fragments (Zhou et al., 1990; Sokoloff et al., 1992).

#### Effect of Verapamil on the Specific [<sup>3</sup>H]-5-HT Binding to Hippocampal Synaptosomal Membranes

The effect of verapamil on [<sup>3</sup>H]-5-HT specific binding to membranes obtained from hippocampal synaptosomes was also explored. The displacement curves

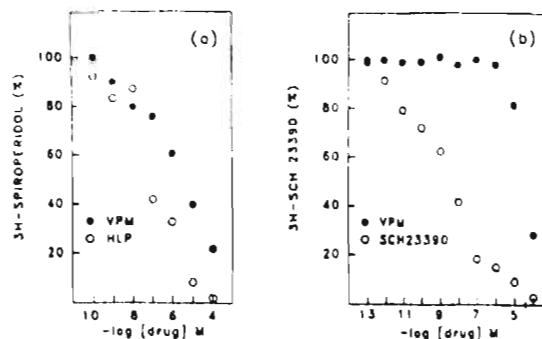


Fig. 4. Effect of verapamil on [<sup>3</sup>H]-spiroperidol and [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 specific binding. a: Displacement curves for [<sup>3</sup>H]-spiroperidol (0.5 nM) specific binding to membranes obtained from striatal synaptosomes in the presence of verapamil (VPM; ●) and haloperidol (HLP; ○). b: Displacement curves for [<sup>3</sup>H]-SCH-23390 (0.6 nM) specific binding to membranes obtained from striatal synaptosomes in the presence of verapamil (●) and SCH-23390 (○). Specific binding was defined using 10  $\mu\text{M}$  butaclamol. Each value represents the mean of 3 experiments performed with duplicate samples.

shown in Figure 5 show that verapamil is a weak inhibitor of [<sup>3</sup>H]-5-HT specific binding (K<sub>i</sub> of  $3 \times 10^{-5}$  M) when compared to 5-HT (K<sub>i</sub> of  $3 \times 10^{-8}$  M). The K<sub>i</sub> for 5-HT calculated here is similar to that reported for [<sup>3</sup>H]-5-HT displacement to rat hippocampal membranes by cold 5-HT (Bennett, 1978).

## DISCUSSION

The effects of verapamil on baseline and stimulated release of several neurotransmitters under comparable experimental conditions were studied. The results show that this organic Ca<sup>2+</sup> channel antagonist does not modify the release of all neurotransmitters in the same manner.

The dependence on external Ca<sup>2+</sup> of the high K<sup>+</sup>-evoked release of [<sup>3</sup>H]-NE or [<sup>3</sup>H]-5-HT shown here (Fig. 2) and previously shown for the depolarization-evoked release of [<sup>3</sup>H]-DA (Sitges et al., 1990) demonstrates that with this experimental approach exocytosis of the biogenic monoamines after the entrance of Ca<sup>2+</sup> via a pathway activated by depolarization is detected. The inhibition exerted by verapamil on the Ca<sup>2+</sup>-dependent, high K<sup>+</sup> depolarization-evoked release of [<sup>3</sup>H]-NE from hippocampal synaptosomes (Fig. 1b) is consistent with a Ca<sup>2+</sup> antagonistic action of verapamil, as is the previously reported inhibition by verapamil of NE release induced by electrical stimulation of sympathetic nerve terminals (Tsuda et al., 1986). This inhibition exerted by verapamil on the evoked release of [<sup>3</sup>H]-NE is expected

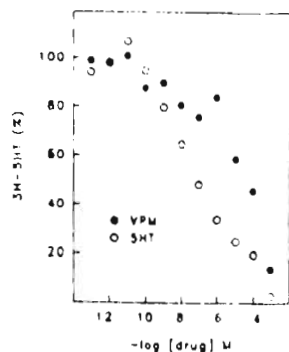


Fig. 5. Effect of verapamil on [ $^3\text{H}$ ]-5-HT specific binding. Displacement curves for [ $^3\text{H}$ ]-5-HT (2 nM) specific binding to membranes obtained from hippocampal synaptosomes in the presence of verapamil (VPM; ●) and 5-HT (○). Specific binding was defined using 1 mM serotonin. Each value represents the mean of 3 experiments performed with duplicate samples.

from a  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist, but not the increase of DA and 5-HT release exerted by verapamil from striatal and hippocampal synaptosomes, respectively. The large increase exerted by verapamil on endogenous DA release is not surprising if we consider the high population of dopaminergic nerve terminals present in the striatum compared to the level of endogenous 5-HT present in the hippocampal synaptosomes.

In the case of [ $^3\text{H}$ ]-NE, a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytotic process may essentially determine the depolarization-evoked response, as it is practically abolished in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2b) or in the presence of 50  $\mu\text{M}$  verapamil (Fig. 1b). We have previously found that verapamil at 50  $\mu\text{M}$  also abolishes the dissected  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent fraction of the [ $^3\text{H}$ ]-GABA released by high  $\text{K}^+$  depolarization and the rise in the  $\text{Ca}_i$  evoked by high  $\text{K}^+$  (Sitges et al., 1993). If verapamil (at 50  $\mu\text{M}$ ) prevents the high  $\text{K}^+$  depolarization-induced release of [ $^3\text{H}$ ]-NE and [ $^3\text{H}$ ]-GABA by antagonizing the entrance of  $\text{Ca}^{2+}$  as it seems, a similar pathway of  $\text{Ca}^{2+}$  entrance might be involved in the exocytosis of these two types of neurotransmitters. For the case of DA, verapamil fails to decrease the depolarization-evoked release of [ $^3\text{H}$ ]-DA (Fig. 1c) (Sitges et al., 1990), and for the case of 5-HT, a high concentration (50  $\mu\text{M}$ ) of verapamil only exerts a short-lasting decrease on the depolarization-evoked release of [ $^3\text{H}$ ]-5-HT (Fig. 1a) and a subsequent facilitation of this response, a result suggesting a combined effect of verapamil on  $\text{Ca}^{2+}$  channels and probably presynaptic receptors modulating the depolarization-evoked release of this monoamine.

The facilitation exerted by verapamil on the high  $\text{K}^+$ -evoked release of [ $^3\text{H}$ ]-DA (Fig. 1c) confirms pre-

vious findings showing that verapamil facilitates the release of [ $^3\text{H}$ ]-DA induced by veratridine depolarization of striatal synaptosomes (Sitges et al., 1990) and [ $^3\text{H}$ ]-DA release induced by electrical stimulation in rat striatal slices (Tsuda et al., 1992). This facilitation exerted by verapamil on DA release, also observed with some delay on 5-HT release, cannot be related to the  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistic properties of verapamil, which also cannot explain the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, verapamil-induced elevation of DA and 5-HT release (either radioactive or endogenous) under non-depolarized conditions (Figs. 4, 5) (Sitges et al., 1990; Tsuda et al., 1992).

Our findings that verapamil displaces [ $^3\text{H}$ ]-spiperone binding to membranes obtained from striatal synaptosomes within the same range of concentrations previously shown to increase [ $^3\text{H}$ ]-DA release from striatal synaptosomes (Sitges et al., 1990) might suggest that DA  $\text{D}_2$ -like presynaptic receptors are involved in the verapamil-induced release of DA. If DA receptors are involved in the facilitation of DA release induced by verapamil, we cannot completely discard the possibility of a more complex participation of other types of DA receptors in this response. Verapamil starts to displace [ $^3\text{H}$ ]-SCH-23390 binding at the concentration (10  $\mu\text{M}$ ) causing the maximal elevation of [ $^3\text{H}$ ]-DA baseline release (Sitges et al., 1990), although a synergistic action between DA  $\text{D}_2$  and  $\text{D}_1$  receptors has been reported on other responses (Bertorello et al., 1990; Piomelli et al., 1991).

The weakness of verapamil for displacing [ $^3\text{H}$ ]-5-HT binding in hippocampal synaptosomes makes improbable a determinant role of these receptors on the release of 5-HT induced by verapamil. On the basis of a dopaminergic regulation of 5-HT release, suggested by the elevation exerted by the DA agonist apomorphine (Reubi et al., 1978) or by DA itself (Balfour and Clasper, 1982) on the baseline release of [ $^3\text{H}$ ]-5-HT in hippocampal synaptosomes, it does not seem unreasonable to think that DA-like receptors could also be involved in the positive regulation exerted by verapamil on 5-HT release from hippocampal synaptosomes. Moreover, in synaptosomes obtained from the nucleus accumbens, in addition to the functional 5-HT autoreceptors, DA presynaptic receptors have shown to modulate 5-HT release (Drescher and Hetey, 1988).

The involvement of metabotropic receptors in the paradoxical facilitation exerted by verapamil on DA and 5-HT release is suggested by the finding of Tsuda et al. (1992) that pertussis toxin decreases verapamil-induced DA release from striatal slices. The apparent interaction of verapamil with presynaptic DA receptors could suggest that this type of receptors is functionally connected with the paradoxical effects of verapamil on the release of some neurotransmitters. However, the possibility that

other receptors determine these effects of verapamil is not improbable, as the specific binding of the sigma receptor ligand, [ $^3$ H]-1,3-di(2-tolyl)guanidine, to membranes prepared from guinea pig brain is effectively displaced by verapamil at micromolar concentrations (Rothman et al., 1991). Furthermore, the putative D<sub>2</sub> dopamine receptor antagonist haloperidol has been found to be one of the ligands of sigma receptor sites (Quirion et al., 1992). Thus, if a specific type of receptor is involved in the paradoxical regulation exerted by verapamil on the release of some neurotransmitters, to elucidate the type of this receptor, a systematic study directed to test which of the ligands displaced by verapamil is able to overcome its effects on neurotransmitter release has to be done.

Little is known about the second messenger systems associated with presynaptic receptors. Also, it is not known whether presynaptic receptors are coupled to the same second messenger systems that postsynaptic receptors are, or whether autoreceptors regulating release are differently coupled or differ structurally to autoreceptors regulating synthesis. In a previous study in striatal and olfactory tubercle synaptosomes (P<sub>2</sub>) treated with L-alpha-methyl p-tyrosine (an inhibitor of new amine formation), verapamil potentiated (within 20 min) the decline of the DA content induced by the new amine formation inhibitor (Bagchi, 1990). On the basis of these results it was proposed that verapamil enhances "the inactivation of the DA present in intraneuronal vesicles" and a possible action of verapamil on DA release was discarded. In the present study we also found that verapamil declines the endogenous DA level in the pellet of striatal synaptosomes (Table I), but the large amount of the endogenous DA lost from the pellet of verapamil-treated synaptosomes was found in the supernatant, indicating that it has been released. Furthermore, at least within the 5 min of verapamil treatment no change in DA synthesis might occur, as no significant difference between the total DA level in control and verapamil-treated synaptosomes has been found.

The hypothesis that at least two mechanisms, one due to Ca<sup>2+</sup> antagonism and the other involving presynaptic receptors not coupled to Ca<sup>2+</sup> movements, underlie the diverse effects of verapamil on the release of the various neurotransmitters is supported by the finding that verapamil, like other organic Ca<sup>2+</sup> channel antagonists, exhibits a lower binding affinity for Ca<sup>2+</sup> channel sites than for DA D<sub>2</sub> receptors (Leysen and Gommeren, 1984; Ikegami et al., 1992), and we have previously shown that in parallel experiments in rat striatal synaptosomes, lower concentrations of verapamil are required to enhance [ $^3$ H]-DA release than to inhibit the Ca<sup>2+</sup>-dependent fraction of the depolarization-evoked release of [ $^3$ H]-GABA (Sitges et al., 1990). Also, the inhibition of

the depolarization-evoked release of [ $^3$ H]-NE shown here is achieved at a higher (50  $\mu$ M) concentration of verapamil than those required to clearly detect an elevation of 5-HT release in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner.

In summary, after comparing the various effects of verapamil on the release of several neurotransmitters it is concluded that in addition to the Ca<sup>2+</sup> antagonistic properties exerted by verapamil on the Ca<sup>2+</sup>-dependent, depolarization-induced release of some neurotransmitters (GABA and NE), another mechanism, not related with Ca<sup>2+</sup> antagonism, underlies the effects of verapamil on DA and 5-HT release in discrete brain regions. Consideration of the multiple actions exerted by verapamil on the release of different transmitters may possibly help to explain the antimanic effects of this putative organic Ca<sup>2+</sup> channel antagonist.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. A. Guarneros for excellent technical assistance. This work was partially supported by Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, by project 2150 from Instituto Mexicano de Psiquiatría, SSA, by Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, and by project 400315-5-1708N from CONACyT.

#### REFERENCES

- Bagchi SP (1990): Antidopaminergic action of verapamil and several other drugs: Inactivation of vesicular dopamine. *Life Sci* 46: 857-863.
- Balfour DJK, Clasper P (1982): Evidence for a presynaptic dopamine receptor in rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 76:292P.
- Barton BM, Gitlin MJ (1987): Verapamil in treatment-resistant mania: An open trial. *J Clin Psychopharmacol* 7:101-103.
- Bennett JP (1978): Methods in binding studies. In Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ (eds). "Neurotransmitter Receptor Binding." New York: Raven Press, pp 57-90.
- Bortorello AM, Hopfield JF, Aperia A, Greengard P (1990): Inhibition by dopamine of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase activity in neonatal neurons through D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor synergism. *Nature* 347:386-388.
- Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988): Cloning and expression of a rat D<sub>2</sub> dopamine receptor cDNA. *Nature* 336: 783-787.
- Caillard V (1985): Treatment of mania using calcium antagonist: Preliminary trial. *Neuropsychobiology* 14:1423.
- Clark D, White FJ (1987): Review: D<sub>1</sub> dopamine receptor—The search for a function. A critical evaluation of the D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* 1:347-388.
- De Vries DJ, Beart PM (1985): Competitive inhibition of [ $^3$ H]spiperone binding to D-2 dopamine receptors in striatal homogenates by organic calcium channel antagonists and polyvalent cations. *Eur J Pharmacol* 106:133-139.
- Drescher K, Heley L (1988): Influence of antipsychotics and serotonin

- antagonists on presynaptic receptors modulating the release of serotonin in synaptosomes of the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology* 27:31-36.
- Dubovsky SL, Franks RD (1983): Intracellular calcium ions in affective disorders: A review and a hypothesis. *Biol Psychiatry* 18:781-797.
- Dubovsky SL, Franks RD, Allen S, Murphy J (1986): Calcium antagonists in mania: A double-blind study of verapamil. *Psychiatr Res* 18:309-320.
- Dubovsky SL, Franks RD, Allen S (1987): Verapamil: A new anti-manic drug with potential interactions with lithium. *J Clin Psychiatry* 48:371-372.
- Ferry DR, Goll A, Gadow C, Glossmann H (1984): (-)-<sup>3</sup>H-desmethoxyverapamil labelling of putative calcium channels in brain: Autoradiographic distribution and allosteric coupling to 1,4-dihydropyridine and diltiazem binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:183-187.
- Freckenstein A (1977): Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 17:149-166.
- Garza-Treviño ES, Overall JE, Hollister LE (1992): Verapamil versus lithium in acute mania. *Am J Psychiatry* 149:121-122.
- Giannini AJ, Houser WL, Loisel RH, Giannini MC, Price WA (1984): Antimanic effects of verapamil. *Am J Psychiatry* 141:1602-1603.
- Hoschl C (1991): Do calcium antagonists have a place in the treatment of mood disorders? *Drugs* 42:721-729.
- Hoschl C, Kozeny J (1989): Verapamil in affective disorders: A control double-blind study. *Biol Psychiatry* 25:128-140.
- Ikegami A, Ozaki A, Hara H, Sukamoto T, Yamashita A, Ito K (1992): Neurochemical investigation on the effects of a new diphenylpiperazine calcium antagonist, KB-2796, on the central dopaminergic system of rats. *Jpn J Pharmacol* 58:399-405.
- Leysen JE, Gommeren W (1984): In vitro receptor binding profile of drugs used in migraine. In Amery WK, Van Neuten JM, Wauquier A (eds): "The Pharmacological Basis of Migraine Therapy." London: Pitman Press, pp 255-266.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Macpherson GA (1983): A practical computer-based approach to the analysis of radioligand binding experiments. *Comput Programs Biomed* 17:107-114.
- Murphy KMM, Gould RJ, Snyder SH (1982): Autoradiographic visualization of [<sup>3</sup>H]nitrendipine binding sites in rat brain. Localization to synaptic zones. *Eur J Pharmacol* 81:517-519.
- Peroutka SJ, Snyder SH (1979): Multiple serotonin receptors: Differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]sergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *Mol Pharmacol* 16:687-699.
- Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC (1991): Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> receptor synergism. *Nature* 353:164-167.
- Pollack MH, Rosenbaum JF, Hyman SE (1987): Calcium channel blockers in psychiatry. *Psychosomatics* 28:356-369.
- Quinn R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su SP, Tani W, Taylor DP (1992): A proposal for the classification of sigma binding sites. *TIPS* 13:85-86.
- Rauten M, Cervoni AM, Del Carmine R (1978): Do presynaptic autoreceptors control dopamine release? *Nature* 274:706-708.
- Reubi JC, Emson PC, Jessel TM, Iversen LL (1978): Effects of GABA, dopamine and substance P on the release of newly synthesized [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine from rat substantia nigra in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 304:271-277.
- Rothman RB, Reid A, Mahboubi A, Kim CH, De Costa BR, Jacobson AE, Rice KC (1991): Labeling by [<sup>3</sup>H]1,3-di(2-tolyl)guanidine of two high affinity binding sites in guinea pig brain. Evidence for allosteric regulation by calcium channel antagonists and pseudoallosteric modulation by sigma ligands. *Mol Pharmacol* 39:222-232.
- Sitges M (1989): Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on 5-amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J Neurochem* 53:436-441.
- Sitges M, Possani LD, Bayón A (1986): Noxiustoxin, a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K<sup>+</sup> permeability. *J Neurosci* 6:1570-1574.
- Sitges M, Chiu LM, de la Fuente JR (1990): The effect of verapamil on GABA and dopamine release does not involve voltage-sensitive calcium channels. *Brain Res* 534:51-59.
- Sitges M, Chiu LM, González L (1993): Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [<sup>3</sup>H]-GABA. Inhibition by verapamil and amiloride. *Neurochem Res* 18:1081-1087.
- Sokoloff P, Martres MP, Giros B, Bouthenet ML, Schwartz JC (1992): The third dopamine receptor (D<sub>3</sub>) as a novel target for antipsychotics. *Biochem Pharmacol* 43:659-666.
- Tsuda K, Kuchii M, Nishio I, Masuyama Y (1986): Effects of calcium-antagonists on norepinephrine release from sympathetic nerve endings in rat mesenteric vasculature. *Jpn Heart J* 27:395-402.
- Tsuda K, Tsuda S, Masuyama Y (1992): Effects of calcium-antagonists on dopamine release in the central nervous system. *Jpn Circ J* 56:248-254.
- Walters JR, Bergstrom DA, Carlson JH, Chase TN, Braun AR (1987): D<sub>1</sub> dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D<sub>2</sub> agonist effects. *Science* 236:719-722.
- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HHM, Cone R, Pnbnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990): Cloning and expression of human and rat D<sub>1</sub> dopamine receptors. *Nature* 347:76-80.

## V.- DISCUSION

La inhibición inducida por VPM que se observa en la liberación  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-NA}$ , en sinaptosomas de hipocampo, en presencia de un agente despolarizante como es el  $\text{K}^+$  alto es consistente con el efecto del VPM como antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . La liberación  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-NA}$  es parcialmente eliminada al sustituir este catión divalente por EGTA en el medio de perfusión ó en presencia de VPM  $50 \mu\text{M}$ . Este mismo efecto inhibitorio del VPM también fue observado en el componente  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-GABA}$  estimulada por  $\text{K}^+$  alto, así como en el incremento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  interno inducido por despolarización con  $\text{K}^+$  alto en sinaptosomas de cerebro completo de ratón (Sitges y col., 1993), como se esperaría de un antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si el VPM ( $50 \mu\text{M}$ ) inhibe la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-NA}$  y  $[\text{}^3\text{H}]\text{-GABA}$  estimulada con  $\text{K}^+$  alto por antagonizar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal sináptica, esto sugieren que una vía común en la entrada de este catión divalente localizada en la terminal sináptica y que es activada por despolarización, puede estar involucrada en los procesos de inhibición de la liberación de estos dos neurotransmisores. Estos datos coinciden con los previamente reportados para la inhibición de la liberación de NA del nervio simpático estimulado eléctricamente (Tsuda y col., 1986).

Sin embargo la acción del VPM como antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  no explicaría el aumento sobre la liberación basal de DA y 5-HT en sinaptosomas de estriado e hipocampo respectivamente. La facilitación ejercida por el VPM en la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$  estimulada por  $\text{K}^+$  alto confirma los reportados previamente en sinaptosomas de estriado en donde el VPM facilita la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$  tanto en presencia de veratridina como de  $\text{K}^+$  alto (Sitges y col., 1990), así como en rebanadas de estriado de rata en donde el VPM facilita también la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-DA}$ , estimulada eléctricamente (Tsuda y col., 1992).

La mayor eficacia del VPM para incrementar la liberación basal de DA que la liberación basal de 5-HT, es de esperarse si consideramos la alta población de terminales



dopaminérgicas presentes en el estriado en comparación con la cantidad de terminales serotoninérgicas localizadas en el hipocampo. El VPM 50  $\mu\text{M}$  es incapaz de antagonizar la liberación  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente estimulada con  $\text{K}^+$  alto de DA y 5-HT. El VPM a la más alta concentración probada (50  $\mu\text{M}$ ), solo muestra una pequeña disminución en la liberación estimulada por despolarización de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT así como una subsecuente facilitación de esta amina. Estos datos sugieren, para el caso de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-5-HT, la posible existencia de un efecto combinado del VPM sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y probablemente sobre receptores presinápticos asociados a la liberación estimulada por despolarización de esta amina.

Si bien, la facilitación en la liberación por acción del VPM, de DA y 5-HT, cuantificadas tanto con el neurotransmisor radioactivo como endógenamente por HPLC, aun en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Sitges y col., 1990; Tsuda y col., 1992; Sitges y Reyes, 1995) incluso a concentraciones menores de las necesarias para inhibir la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-NA y [ $^3\text{H}$ ]-GABA (Sitges y col., 1990), no parece estar relacionada con las propiedades de este fármaco como antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, nuestro hallazgo de que el VPM, por un lado desplaza la unión de [ $^3\text{H}$ ]-espiroperidol a receptores  $\text{D}_2$  en membranas de sinaptosomas de estriado en el mismo rango de concentración en el que se induce la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-DA de sinaptosomas de estriado de rata, (Sitges y col., 1990) sugieren que un receptor dopaminérgico del tipo  $\text{D}_2$  ó de receptores emparentados a este (por ejemplo un receptor  $\text{D}_3$  o  $\text{D}_4$ ) puede estar involucrados en la liberación de DA inducida por VPM. Por otro lado el, VPM empieza a desplazar la unión de [ $^3\text{H}$ ]-SCH-23390 del receptor  $\text{D}_1$  en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  que en sinaptosomas produce la máxima liberación basal de [ $^3\text{H}$ ]-DA (Sitges y col., 1990; Sitges y Reyes, 1995). Si los receptores dopaminérgicos están involucrados en la facilitación que el VPM ejerce sobre la liberación de DA, no podemos descartar completamente la posibilidad de que la acción de más de un tipo de receptores dopaminérgicos estén involucrados, mediante una respuesta más compleja como ha sido previamente reportado para la acción sinérgica de los receptores

dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> en donde la activación previa de los receptores D<sub>1</sub> facilita la aparición de respuestas conductuales inducidas por la acción de los receptores D<sub>2</sub> ( Clark y White, 1987; Walter y col., 1987; Bertorello y col., 1990; Piomelli y col., 1991).

En la actualidad existe una familia de nuevos receptores dopaminérgicos todos ellos acoplados a diferentes sistemas de transducción a través de una proteína G (Sibely y Mosma, 1992; Vallar y Meldolesi, 1989; Sockoloff, 1993). En otras preparaciones como son, células cromafines, células de la retina y neuronas de caracol se ha reportado la presencia de un receptor dopaminérgico del tipo D<sub>2</sub> que se encuentra acoplado a un canal de Ca<sup>2+</sup>, a través de una proteína G (Bigornia y col., 1988; Yoshinori y col., 1991; Harris-Warrick y col., 1988). La liberación de DA y 5-HT estimuladas por VPM no parecen estar relacionadas con la participación de una población de receptores presinápticos acoplados a un canal de Ca<sup>2+</sup> a través de una proteína G, ya que esta respuesta es independiente de Ca<sup>2+</sup> externo. Además, el reporte de que en células de pituitaria de rata se puede observar una disminución en los niveles de Ca<sup>2+</sup> interno por acción de los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> y que este efecto no es detectable en sinaptosomas de estriado de rata (Wolf y Kapatos, 1989) descarta la posible existencia de un receptor dopaminérgico presináptico acoplado a un canal de Ca<sup>2+</sup> a través de una proteína G como el responsable de la liberación de DA en terminales nerviosas de estriado. Si una población de receptores presinápticos esta involucrada en la liberación Ca<sup>2+</sup> independiente de DA y 5-HT inducida por VPM la posibilidad de que estos receptores estén acoplados a un sistema de transducción que involucre a la PLC/PKC se puede mantener abierta. Activadores de la PKC como son los ésteres del forbol ó el DG, el cual junto con el IP<sub>3</sub> son los principales productos de la actividad de la PLC (Downes y col., 1982), han mostrado la capacidad de incrementar la liberación de DA y 5-HT de sinaptosomas de estriado de rata de una manera Ca<sup>2+</sup> - independiente (Chandler y Leslie, 1989; Nelson y Patrick, 1990). La poca potencia del VPM para desplazar [<sup>3</sup>H]-5-HT de los receptores serotoninérgicos presentes en las membranas de sinaptosomas de hipocampo hace poco probable la participación de éstos

receptores en la liberación de 5-HT por la acción del VPM. Tomando en cuenta los datos que muestran la existencia de una regulación dopaminérgica sobre la liberación basal de 5-HT sugerida por la acción el agonista dopaminérgico apomorfina (Reubi y col., 1978), así como de la misma DA (Balfour y Clasper, 1982) que estimulan la liberación basal de 5-HT endógena o [<sup>3</sup>H]-5-HT en sinaptosomas de hipocampo, no se hace difícil el proponer la existencia de un receptor dopaminérgico que pudiera estar involucrado en la regulación positiva de la liberación de 5-HT ejercida por el VPM en sinaptosomas de hipocampo. Por otro lado, en sinaptosomas obtenidos de núcleo acumbens, además de la existencia de un autorreceptor serotoninérgico, también se ha demostrado la presencia de un heterorreceptor dopaminérgico que modula la liberación de [<sup>3</sup>H]-5-HT (Drescher y Hetey, 1988).

La participación de un receptor metabotrópico, en la paradójica facilitación de la liberación de DA inducida por VPM, es sugerida a partir de los datos obtenidos en rebanadas de estriado de rata, en donde la liberación de DA estimulada por la presencia de VPM en el medio de perfusión, es disminuida por la incubación previa de esta preparación con la toxina pertussis (Tsuda y col., 1992). La aparente interacción del VPM con los receptores dopaminérgicos presinápticos sugiere que este tipo de receptores esta funcionalmente conectado con el efecto paradójico de este fármaco en la liberación de ciertos neurotransmisores. A favor de esta hipótesis existen las evidencias de que el VPM, como otros antagonistas orgánicos de los canales de Ca<sup>2+</sup>, muestra menor afinidad por los canales de Ca<sup>2+</sup> que por los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> (Leysen y Gommeren, 1984; Ikegami y col., 1992). No obstante la posibilidad de que otros receptores se encuentren asociados a los efectos del VPM no pueden ser descartados. Por ejemplo, la existencia de datos que muestran que el VPM, en el rango micromolar, desplaza la unión de [<sup>3</sup>H]-1-3-di(2-tolyl)guanidina, ligando selectivo del receptor sigma, en membranas totales de cerebro de cobayo, apoyan esta hipótesis (Rothman y col., 1991). Esta posibilidad se ve reforzada por el hallazgo de que el antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub>, haloperidol, también es un ligando de los receptores sigma (Quirion y col., 1992). Para elucidar la naturaleza del

receptor involucrado en la paradójica regulación ejercida por el VPM sobre la liberación de DA y 5-HT, se requiere realizar un estudio sistemático destinado a explorar cuál de los ligandos selectivos de los diferentes receptores que pudieran estar involucrados en dichos efectos del VPM son capaces de revertir los mismos.

En estudios previos en la fracción sinaptosomal P<sub>2</sub> de estriado y tubérculo olfatorio de rata, los que fueron tratados con L-alfa-metil-β-tirosina, inhibidor de la síntesis de monománias, el VPM en 20 minutos disminuyó el contenido de DA de las vesículas sinápticas (Bagchi, 1990). Este autor propuso, que el VPM disminuye la cantidad de DA presente en las vesículas sinápticas y descarta la participación del VPM en los procesos de liberación de esta monoamina. En el presente trabajo, una disminución de la DA endógena remanente en los sinaptosomas de estriado de rata tratados con VPM también ha sido mostrada. Esta disminución es el reflejo de la gran cantidad de este neurotransmisor liberado en el sobrenadante por efecto del VPM. En sinaptosomas de hipocampo el mismo comportamiento fue observado sobre la liberación de 5-HT endógena. En ambos experimentos no se observó una diferencia significativa en la cantidad total de DA y 5-HT, definida como la cantidad presente en la terminal más la liberada en el sobrenadante, en sinaptosomas control con respecto a los tratados con VPM. Además, en sinaptosomas expuestos durante 5 minutos a la acción del VPM no se pudieron detectar cambios en los metabolitos de degradación de DA y 5-HT, DOPAC y 5-HIAA respectivamente, con respecto a los sinaptosomas control. Estos datos muestran que el VPM estimula la liberación de ambas monoaminas y que, al menos en el corto plazo, en 5 minutos de acción no actúa sobre los mecanismos de síntesis de estos neurotransmisores.

El VPM presenta un efecto terapéutico en la profilaxis de la manía, el cual ha sido comparado con los efectos de los tratamientos tradicionales como son haloperidol en combinación con Li<sup>+</sup> (Dubovsky y Francks, 1983; Giannini y col., 1984; Caillard, 1985; Dubovsky y col., 1986; Barton y Gitlin, 1987; Pollack y col., 1987; Dubovsky y col., 1987; Höschl, 1991; Garza-Treviño y col., 1992). En la manía, se observa un incremento en los

niveles tanto de 5-HT como de DA, por lo que fármacos con efectos terapéuticos sobre este trastorno deberían disminuir los niveles de estos neurotransmisores. El tiempo requerido tanto por el VPM como el haloperidol para mostrar una mejoría en los pacientes con trastornos maníacos es de tres semanas. (Höschl, 1991; Garza-Treviño y col., 1992). El VPM estimula la liberación de DA y 5-HT a corto plazo (Sitges y col., 1990; Tsuda y col., 1992; Sitges y Reyes, 1995), por lo que resultaría paradójico el efecto terapéutico de este fármaco. Sin embargo, administrado de forma crónica, 21 días, disminuye los niveles de DA en estriado y no modifica los niveles de 5-HT en hipocampo de rata. (Sitges y Guarneros, 1997). En este mismo estudio, se comparó el efecto del VPM con el del antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub> haloperidol, tanto en forma crónica como aguda. El haloperidol al igual que el VPM, estimulan la liberación de DA a corto plazo, sin embargo a largo plazo ambos disminuye el contenido de DA. A corto plazo el VPM estimula la liberación de 5-HT (Sitges y Reyes 1995), en forma crónica no es observado ningún cambio en este neurotransmisor ni en su metabolito de degradación 5-HIAA (Sitges y Guarneros, 1997). Tomando en cuenta que el VPM presenta afinidad por los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> y que estos pueden regular la síntesis de DA (Gobert y col., 1985), este mecanismo podrían explicar el efecto terapéutico del VPM en la profilaxis de la manía. Si receptores dopaminérgicos presinápticos controlan la liberación de DA y 5-HT, se podría especular que una disminución en los niveles de DA o un cambio en la afinidad de estos receptores, producto de un tratamiento crónico con VPM o haloperidol, disminuirían los niveles de estas monomanías. Este podría ser el posible mecanismo de acción del VPM sobre la liberación de DA y 5-HT en la profilaxis de la manía. Experimentos tendientes a medir la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa así como cambios en la afinidad de diferentes sub tipos de receptores dopaminérgicos, con ligandos más selectivos, así como la cuantificación de estos neurotransmisores en otras regiones del cerebro debería ser llevada a cabo.

## VI.- CONCLUSIONES

El VPM presenta dos diferentes mecanismos de acción para cada uno de los neurotransmisores hasta ahora estudiados.

Actúa como antagonista orgánico de los canales de  $Ca^{2+}$  sobre la liberación inducida por despolarización de [ $^3H$ ]-GABA, en el componente  $Ca^{2+}$ -dependiente y [ $^3H$ ]-NA.

El VPM presenta, para la liberación de [ $^3H$ ]-DA y [ $^3H$ ]-5-HT, un mecanismo de acción no relacionado con el antagonismo de los canales de  $Ca^{2+}$ , ya que estimula la liberación de estos dos neurotransmisores de una forma dosis-dependiente.

Sobre la liberación de 5-HT, el VPM presenta un efecto combinado. Un bloqueo inicial de los canales de  $Ca^{2+}$  precedido de una estimulación dosis-dependiente probablemente mediada a través de receptores dopaminérgicos.

El VPM estimula la liberación de DA, al igual que para el caso de 5-HT, de forma dosis-dependiente posiblemente a través de autoreceptores dopaminérgicos.

## VII.-BIBLIOGRAFIA

- Aschberg JA., Cole J., Clin JN., Feighner JP., Ferris RM., Fibiger HC., Golden RN. Martin P., Potter W., Richelson E. and Sulser F. Bupropion: A review of its mechanism of antidepressant activity. *J Clin Psychiatry*. 1995, 56, 395-401.
- Aschberg JA., Traskman L. and Thoren P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry*. 1976, 33, 1193-1197.
- Balon R. and Ramesh C. Calcium channel blockers for anxiety disorders? *Ann Clin Psychiatry*. 1996, 8, 215-220.
- Bagchi S.P. Antidopaminergic action of VPM and several other drugs: inactivation of vesicular dopamine. *Life Sciences*. 1990, 41, 856-863.
- Baulfour D. J. and Clasper P. Evidence for presynaptic dopamine receptor in rat hippocampus. *Br J Pharmacol*. 1982, 74, 292-296.
- Barton B.M. and Gitlin M.J. Verapamil in treatment resistant mania: an open trial. *J Clin Psychopharmacol*. 1987, 7, 101-103.
- Benett J.P. Methods in binding studies. En Yamamura H.I., Emma S.J., Kuar M.J. (eds.) *Neurotransmitter Receptor Binding*. Raven Press NY. 1978, 57-90
- Berridge M.J. e Irvine, R.F., Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 1989, 341, 197-205.
- Bertorello A. M., Hopfel J.F., Aperia A and Greengard P. Inhibition by dopamine of (Na<sup>+</sup>)ATPase activity in neostriatal neurones through D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor synergism. *Nature*. 1990, 386-388.

Bigornia L., Suozzo M., Ryan K.A., Napp D. and Schneider A.S. Dopamine receptors on adrenal chromaffin cells modulate calcium uptake and catecholamine release. *J Neurochem.* 1988, 51, 999-1006.

Bradford H. Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release. En: *Handbook of Psychopharmacology* (eds) Iverson L. Iverson, S., Snyder S. Plenum Press. 1978, 191-252.

Brogden R.N., et al. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs.* 1996, 5, 28-36.

Bunzow J.R., Van Tol H.H.M., Grandy D.K., Albert P., Salomon J., Christie M., Neve K.A. and Civelli, O., Cloning and expression of rat D<sub>2</sub> dopamine receptor cDNA. *Nature.* 1988, 336, 783-787.

Caillard V. Treatment of mania using calcium antagonist: preliminary trial. *Neuropsychopharmacol.* 1985, 14, 1423.

Chandler L.J. and Leslie S.W. Protein kinase C activation enhances K-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal synaptosomes in the absence of an increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem.* 1985, 52, 1905-1912.

Charney D.S., Menkes D.B. and Heninger G.R. Receptor sensitivity and the mechanism of action of antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 1981, 38, 1160-1180.

Cho S., Neff N.H. and Hadjiconstantinou M. Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. *Eur J Pharmacol.* 1997, 323, 149-157.



Clark D. and White F.J. Dopamine receptors, the search of the function: A critical evaluation of the D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse*. 1987, 1, 347-388.

Cornfield L.J. and Nelson D.L., Biochemistry of 5-hydroxytryptamine receptor subtypes: coupling to second messenger system En: Peroutka S.J.(ed). Serotonine receptor subtypes: Basic and clinic aspect. Wiley-Liss press. N.Y. 1991, 81-102.

De Vries D.J. and Beart P.M. Competitive inhibition of [<sup>3</sup>H]-spiperone binding to D<sub>2</sub>dopamine receptors in striatal homogenates by organic calcium channel antagonists and polyvalent cations. *Europ J Pharmacol*. 1985, 106, 133-139.

DMS-IV: Mood disorders en: Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DMS-IV), 4<sup>o</sup> edition. American psychiatric association. Washinton DC. 1995, 317-391.

Downes C.P., Mussat M.C. and Michell, R.H., The inositol trisphosphate phosphomonoesterase of human erythrocyte membrane. *Biochem J*. 1982, 203, 169-177

Drescher K. and Hetey L. Influence of antipsychotics and serotonin antagonists on presynaptic receptors modulating the release of serotonin in synaptosomes of the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology*. 1988, 27, 33-36.

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

Dubovsky S.L., Kranks R.D., Alen, S. and Murphy J. Calcium antagonists in mania: A double-blind study of VPM. *Psychiat Res*. 1986, 18, 306-320.

Ferry D.R., Goll, A. and Glossman H. [<sup>3</sup>H]-desmetoxiverapamil labelling of putative calcium channels in brain: Autoradiographic distribution and allosteric coupling to 1,4-dihydropyridine and diltiazem binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1984, 327, 183-187

Fricke U. Tritosol: A new scintillation cocktail based on triton x-100., *Analyt Biochem.* 1975, 53, 555-558.

Garza-Trevino E.S., Overall J.E. and Holister L.E., Verapamil versus lithium in acute mania. *Am J Psychiatry.* 1992, 149, 121-122.

Gerber J.G. and Nies A.S. Beta-adrenergic blocking drugs. *Ann Rev Med.* 1985, 36, 145-164.

Giannini A.J., Houser W.L., Loiselle R.H., Giannini M.C. and Pricie W. A. Antimanic effects of VPM. *Am J Psychiat.* 1984, 141, 1602-1603.

Gobert A., Rivert J.M., Adinot V., Cistarelli L., Spedding M., Vian J., Peglion J.L. and Millan M.K. Functional correlates of dopamine D<sub>3</sub> activation in the rat in vivo and their modulation by the selective antagonist, (+)-S 14297 H. Both D<sub>2</sub> and silent D<sub>3</sub> autoreceptors control synthesis and release in mesolimbic, mesocortical and nigrostriatal pathways. *J Pharmacol and Exp Ther.* 1995, 275, 899-913.

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

Grace A.A., Bunney B.S., Moree H. and Todd C.L. Dopamine-cell depolarization block as model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *Trends Neurosci.* 1997, 20, 31-37

EST<sup>a</sup> TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gray E. and Whitaker V. The isolation of nerve endings from brain: An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Analit.* 1962, 96. 79-87.

Guitart X. and Nestler E.J. Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in frontal cortex. *J Neurochem.* 1992, 59, 1164-1167.

Hadcock J.R. and Malbon, C.C. Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G protein. *J Neurochem.* 1993, 60 1-4.

Hajos F., An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 1975, 136, 387-392.

Herndon J.F. and Glennon R.A., Serotonin receptors, agents, and actions. In A.P. Kozikowski (ed.), *Drug design for neuroscience.* Raven Press, NY. 1993, 167-212.

Hetey L. and Drescher K., Influence of antipsychotics on presynaptic receptors modulating the release of dopamine in synaptosomes of the nucleus accumbens of rats. *Neurpharmacol.* 1986, 25, 1103-1109.

Heywood J.T. Calcium channel blockers for heart control in atrial fibrillation complicated by congestive heart failure. *Can J Cardiol.* 1995, 10, 84-91.

Höschl C., Do calcium antagonists have a place in the treatment of mood disorders? *Drugs.* 1991, 42, 721-729

Höschl C. and Kozeny J., Verapamil in affective disorders: A controlled double-blind study. *Biol Psychiatry.* 1989, 25, 128-140.

Hyttel J. Inhibition of [<sup>3</sup>H]-dopamine accumulation in rat striatal synaptosomes by psychotropic drugs. *Biochem Pharmacol.* 1978, 27, 1063-1068.

Ikegami A., Ozaki A., Hara H., Sukamoto T., Yamashita A. and Ito, K. Neurochemical investigation on the effects of new diphenylpiperazine calcium antagonist, KB-2796, on the central dopaminergic system of rats. *Japan J Pharmacol.* 1992, 58, 399-405.

Jope R.S. and Williams M.B. Lithium and brain signal transduction system. *Biochem Pharmacol.* 1994, 47, 429-441.

Kandel E.R. and Siegelbaum S. Signaling between nerve cells. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. y Jessell T.M. (eds.) *Essentials of neural science and behavior.* Elsevier NY. 1995, 179-239.

Kandel E.R. and Kupfermann I. Emotional states. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. y Jessell T.M. (eds.) *Essentials of neural science and behavior.* Elsevier NY. 1995, 595-612

Langer S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev.* 1981, 32, 337-362

Levi G. and Raiteri M. Exchange of neurotransmitter amino acid at nerve endings can stimulate high affinity uptake. *Nature.* 1974, 250, 735-737.

Levi G. and Raiteri M., Modulation of gamma aminobutyric acid transport in nerve endings: Role of extracellular gamma aminobutyric acid and of cationic fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75, 2981-2985.

Leysen J.E. and Gommeren W. In vitro receptor binding profile of drugs used in migraine. En: Amery W.K. Van Neutlen J.M. Wauquier A (eds). *The pharmacology basis of migraine therapy.* London Pitman Press. 1984, 255-266

Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., Protein measurement, with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193, 265-275.

Malenka R.C., Hamblin M.W. and Barchas J.D. Biochemical hypotheses of affective disorders and anxiety. En: J.G. Siegal (ed.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, Raven Press, N.Y. 1989, 877-891.

Mann J.J., Stanley M., McBride P.A. and M.C Ewen B.S. Increased serotonin and alfa-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry.* 1986, 43, 954-959.

McPherson G.A. Analysis of radioligand binding experiments: A collection of computer programs for the IBM PC. *J Pharmacol Methods.* 1985, 14, 213-228.

Meltzer H.L. Lithium Mechanisms in bipolar illness and altered intracellular calcium functions. *Biol Psychiat.* 1986, 21, 492-510.

Miledi R. Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1973, 183, 412-425.

Miller H.L., Delgado P.L., Salomon R.M., Berman R., Krystal J.H., Heninger, G.R. and Charney D.S. Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Neuropsychopharmacol.* 1996, 53, 117-128.

Murai S., Saito H., Masuda Y. and Itoh T. Rapid determination of norepinephrine, dopamine, serotonin, their precursor amino acids, and related metabolites in discrete brain areas of mice within ten minutes by HPLC with electrochemical detection. *J Neurochem.* 1988, 50, 473-479.

Murphy K.M., Gould R.J. and Snyder S.H., Autoradiographic visualization of [<sup>3</sup>H]-nitrendipine binding sites in rat brain: localization to synaptic zones. *Eur J Pharmacol.* 1982, 81, 517-519.

Nelson D. and Parick R.L. Diacylglycerol-induced stimulation of neurotransmitter release from rat brain striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* 1990, 54, 662-668.

Nomikos G.G., Damsma G. and Wenkstern D. Effects of chronic bupropion on interstitial concentrations of dopamine in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology.* 1992, 7, 7-14

Parker E.M. and Cubeddu L.X., Comparative effects of amphetamine, phenylethylamine and related drugs on dopamine efflux, dopamine uptake and mazindol binding., *J Pharmacol Exp Ther.* 1988, 245, 199-210.

Peroutka S.J. and Snyder S., Multiple serotonin receptors: Differential binding of [<sup>3</sup>H]-5Hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]-Lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]-Spiroperidol., *Molecular Pharmacol.* 1979, 16, 687-699.

Piomelli D., Pilon C., Giros B., Sokoloff P., Martres M.P. and Schwartz J.C. Dopamine activation of arachidonic acid cascade as a basis for D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> receptor synergism. *Nature.* 1991, 353, 164-167

Pollack M.H. and Rosebaum J.F., Verapamil in the treatment of recurrent unipolar depression., *Biol Psych.*, 1987, 22, 779-782.

Quirion R., Bowen W.D., Itzhak Y., Junien J.L., Musacchio J.M., Rothman R.B., Su S.P., Tan W. and Taylor D.P. A proposal for the classification of the sigma binding sites. *TIPS.* 1992, 13, 85-86

Raiteri M., Cervoni A.M. and Del Carmine R. Do presynaptic autoreceptors control dopamine release Nature.1978, 274, 706-708.

Reubi J.C., Emeson P.C., Jessel T.M. and Iversen L.L. Effect of GABA dopamine and substancia P on the release of newly synthesized [<sup>3</sup>H]-5-Hydroxytryptamine from rat substatia nigra in vitro. Nauny- Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1978, 304, 271-277.

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

Rothman R.B., Reid A., Mahboubi A., Kim C.H., De Costa B.R., Jacobson A.E. and Rice K.C. Labeling by [<sup>3</sup>H]-1,3-di(2-yl)guanidine of two high affinity binding sites in guinea pig brain: Evidence for allosteric regulation by calcium channel antagonists and pseudoallosteric modulation by sigma ligands. Mol Pharmacol.1991, 39, 222-232.

Sckweizner E.E., Amsterdam J., Rickles K., Kaplam M. and Drobe M. Open trial of buspirone in the treatment of major depressive disorder. Psychopharmacol Bull. 1986, 22, 183-185.

Shepherd G.M. Neurotransmitters and Neuromodulators. En: Shepherd G.M., (ed.), Neurobiology, Oxford University Press, N.Y., 1988, 145-176.

Sibely D.R. and Monsma F.J., Molecular biology of dopamine receptors., Trends Pharmacol., Sci. 1992, 13, 61-69.

Sitges M. Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on gamma-amino butyric acid release induced by monensin and veratrine in absence of external calcium. J Neurochem. 1989, 53, 436-441.

Sitges M., Chiu L.M. and De la Fuente J.R. The effect of VPM on GABA and dopamine release does not involve voltage-sensitive calcium channels. *Brain Res.* 1990,543, 51-59.

Sitges M., Chiu L.M. and Gonzalez, L. Vesicular and carried-mediated depolarization-induced release of [3H]-GABA: Inhibition by amiloride and VPM. *Neurochem Res.* 1993, 18, 1081-1087.

Sitges M., Reyes A and Chiu L.M. Dopamine transporter mediated release of dopamine: Role of chloride. *J Neurosc Res.*,1994, 39, 11-22.

Sitges M. and Reyes A. Effects of verapamil on the release of different neurotransmitters. *J Neurosc Res* 1995, 40, 613-621.

Sitges M. and Guarneros A. Chronic verapamil modifies striatal and frontal cortex dopamine levels. *Europ Neuropsychopharmacol.* 1997, en prensa.

Sokoloff P., Martres M.P., Giros B., Bouthenet M.L. and Schwartz J.C. The third dopamine receptor (D3) as a novel target for antipsychotics drugs. *Biochem Pharmacol.*, 1992, 43, 654-666.

Tapia R. and Sitges M., Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res*, 1982, 250, 291-299.

The Lancet, Drugs acting on 5-Hydroxytryptamine receptors. *The Lancet.* 1989, 2, 717-719.



Tsuda K., Kuchii M., Nishio I. and Masuyama I. Effects of calcium-antagonists on norepinephrine release from sympathetic nerve endings in rat mesenteric vasculature. *Japan Heart J.* 1986, 27, 395-402.

Tsuda K., Tsuda S. and Masuyama Y., Effects of calcium-antagonists on dopamine release in the central nervous system. *Japan Circ J.* 1992, 56, 248-254.

Vallar L. and Mendolesi J. Mechanisms of signal transduction at the dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 1989, 10, 74-77.

Verge D., Daval G., Marcinkiewicz M., Pety A., Mestikawy S.E. Gozlan H. and Hamon M.. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-Dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci.* 1986, 6, 3474-3482.

Walter J.R., Bergstrom D.A., Carlson J.H., Chase T.N. and Braun A.R. Dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of agonist effects. *Science.* 1987, 236, 719-722.

Weiner R.D. and Krystal A.D. The present use of electroconvulsive therapy. *Ann Rev Med.* 1994, 45, 273-281.

Wolf M.E. and Kapatos G. Stimulation of D<sub>2</sub> dopamine receptors decreases intracellular calcium levels in rat anterior pituitary cells but not striatal synaptosomes: A flow cytometric study using indo-1. *Synapse.* 1989, 4, 353-370.

Yamamura H.I., Schoemaker H., Boles R.G. and Roeske W.R., Diltiazem enhancement of [<sup>3</sup>H]Nitrendipine binding to calcium channel associated drug receptor sites in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Comm.* 1982, 108, 640-646.

Yoshinori K., Hamahashi T., Mita C. and Itho T. D<sub>2</sub> dopamine receptors inhibit release of aspartate and glutamate in rat retina. *J. Pharmacol Exp Ther* 1990, 256, 634-638.

Yudofsky S.T. Electroconvulsive therapy in the eighties: Technique and technologies. *Am Journal of Psychoter.* 1982, 3, 391-398.

Zhou Q.Y., Grandy D.K., Thambi L., Kushmer J.A., Vantol H.H.M. Cone R., Pribnow D. and Civelli O. Cloning and expression of human and rat D<sub>2</sub> dopamine receptors. *Nature.* 1990, 347, 74-80.