

**REAL ACADEMIA DE FARMACIA
DE BARCELONA**

**SESION INAUGURAL DEL CURSO
1989**

Artículo 47 del Reglamento

La Academia no se hace solidaria de las opiniones científicas expuestas en sus publicaciones, especificándose esta norma en la contraportada de las mismas.

DISCURSO INAUGURAL
por el Muy Ilre. Sr. Dr. D.
TOMAS ADZET PORREDON
Académico Numerario

NUEVAS APORTACIONES AL MECANISMO DE

ACCION DE LAS BENZODIACEPINAS.

INTRODUCCION

Los estados de tensión emocional e inquietud, relacionados con hechos ocurridos o supuestos, son una experiencia frecuente en muchas personas. En ocasiones, sin embargo, estos síntomas se vuelven muy desconcertantes e interfieren con la capacidad del individuo para llevar a cabo una vida normal. Los fármacos ansiolíticos han demostrado ser eficaces para aliviar tales síntomas.

Una propiedad común a los fármacos ansiolíticos y los hipnóticos es la de provocar sedación. Pero en el caso de los ansiolíticos, la depresión del sistema nervioso central no es predominante y puede lograrse en consecuencia una ligera acción sedante. Por el contrario los barbitúricos tienen un estrecho margen entre la acción sedante y la hipnótica.

La popularidad de las benzodiazepinas como ansiolíticos ha aumentado rápidamente desde que se introdujeron en terapéutica. Aunque el precursor químico de las benzodiazepinas se sintetizó en 1933, fue solamente en 1955 cuando la modificación química adecuada de este compuesto logró la primera benzodiazepina, el clordiazepóxido. Los ensayos iniciales demostraron que este compuesto producía sedación en el ratón. Poco después se comprobó la capacidad del clordiazepóxido para lograr un efecto de domesticación en animales agresivos a dosis muy inferiores que las que eran capaces de producir somnolencia o ataxia. El clordiazepóxido se introdujo en la clínica por el año 1960.

En la actualidad se han sintetizado un total de más de 2000 benzodiazepinas, habiéndose logrado una cierta selectividad de acción y, por tanto, de indicación terapéutica. Así, el flurazepam y el temacepam al producir una sedación intensa suelen usarse como hipnóticos, mientras que el clonazepam, se utiliza preferentemente como anti-convulsivo.

EL RECEPTOR BENZODIAZEPÍNICO CENTRAL

En 1975, los estudios electrofisiológicos demostraron que tanto los barbitúricos (1,2) como las benzodiazepinas (3) potenciaban las acciones del GABA, el neurotransmisor inhibitor principal del sistema nervioso central de los mamíferos. Estos descubrimientos, junto con el hecho de encontrar sitios de unión con una selectividad estereoespecífica para las benzodiazepinas (4, 5), estimularon la investigación sobre la farmacología del complejo receptor benzodiazepínico/gabaérgico y el canal del cloro.

Aunque los primeros estudios de caracterización del receptor benzodiazepínico (5) no demostraron un efecto sobre la mayor parte de los neurotransmisores centrales, incluido el GABA, Tallman y co-

laboradores (6) demostraron que el GABA y el muscimol (estructuralmente relacionado con el GABA y agonista de los receptores GABA_A), incrementaban la afinidad del diazepam tritiado en homogeneizados de tejido libres de GABA endógeno. Este efecto era estereoespecífico e inhibido por la bicuculina, un antagonista del receptor gabaérgico. Este estudio, primordial para el conocimiento del mecanismo de acción de las benzodiazepinas a nivel central, junto con el hecho de que las benzodiazepinas potencian la unión del GABA tritiado a sus receptores (7,8), sugirieron una asociación entre el receptor benzodiazepínico y el gabaérgico. De igual manera, otros estudios (9,10), demostraron que los barbituratos incrementaban las tasas de unión de GABA tritiado a sus sitios de unión, sugiriéndose asimismo una asociación entre los receptores gabaérgicos y los sitios de reconocimiento de los barbituratos.

Tanto los estudios electrofisiológicos (11), como los neuroquímicos (12), sugieren hoy en día que los barbituratos actúan en unos sitios cercanos al complejo receptor gabaérgico-canal del cloro. Las observaciones de que barbituratos como el pentobarbital potencia el efecto del GABA e indirectamente incrementa la unión del diazepam tritiado (un efecto altamente dependiente de la presencia de aniones capaces de atravesar los canales del cloro) (13,14), permiten establecer la hipótesis de que el sitio de unión alostérico para las benzodiazepinas, los barbituratos y el GABA están físicamente asociados y son capaces de modular el funcionalismo del canal del cloro.

ORGANIZACION DEL COMPLEJO SUPRAMOLECULAR

Actualmente se ha conseguido la purificación del receptor gabaérgico y benzodiazepínico (15,16). El peso molecular estimado es del orden de 220.000. Experiencias con flunitrazepam y diazepam tritiados (17) han permitido establecer unos pesos moleculares de las proteínas integrantes del orden de 50.000-60.000. Este peso molecular estimado para las subunidades del receptor benzodiazepínico y del gabaérgico, están en concordancia con los obtenidos por la codificación a través de técnicas de ingeniería genética y de biotecnología (DNA complementario) (18). Asimismo, la co-expresión a partir de RNAs de estas subunidades en oocitos de *Xenopus* (19), conduce a la obtención de canales de cloro sensibles a la acción de las benzodiazepinas y de los barbituratos.

Estos resultados sugieren que el receptor benzodiazepínico acoplado al gabaérgico y el canal del cloro (el cual contiene unos sitios de reconocimiento para los barbituratos, las benzodiazepinas y otros fármacos con similares acciones farmacológicas), se forma por agrupamiento de las subunidades α y β . Se ha propuesto una configuración $\alpha_2\beta_2$ (19) que estaría de acuerdo con los datos obtenidos a nivel del peso molecular determinado.

Sin embargo, los resultados obtenidos con sustancias que actúan específicamente a nivel de los canales del cloro dependientes del receptor gabaérgico, tales como el butilbifosforotionato (que se une a los sitios específicos de la picrotoxina a nivel del sistema gabaérgico) y el diazepam tritiado sugieren que la configuración supramolecular puede ser más compleja que una simple estructura de cuatro subunidades (20,21).

La elucidación de la secuencia aminoacídica de las subunidades α y β , ha permitido comprobar que existe una homología del 35% y que puede llegar al 57% en base a la conservación de las sustituciones aminoacídicas. La existencia de una homología del orden del 50% entre estas subunidades y la subunidad responsable de la unión específica de la estricnina del receptor a la glicina (un neurotransmisor operativo a través de los canales iónicos) (22) así como las homologías entre estas proteínas y el receptor colinérgico nicotínico permiten sugerir que todos ellos serían constituyentes de una "superfamilia" de receptores acoplados a canales iónicos.

La síntesis de las β -carbolinas (ésteres del ácido β -carbolin-3-carboxílico) las cuales no sólo antagonizan la acción de las benzodiazepinas a nivel central, sino que también son capaces de desencadenar convulsiones cuando son administradas al animal de experimentación, inició el campo de los denominados "agonistas inversos" y permitió establecer las bases moleculares de la interacción de las benzodiazepinas con el complejo receptor.

Existen muchos fármacos cuya acción es mediada por la provocación de cambios conformacionales de su propio receptor. Este cambio conformacional, que tan sólo se da cuando el fármaco se une al receptor es el que determinará la eficacia de dicho fármaco. Estos cambios conformacionales tan sólo pueden explicarse a nivel molecular si se acepta que el fármaco se une a distintos estados del receptor y con distinta afinidad. Este modelo es de aplicación en el caso de las benzodiazepinas y el GABA. Hoy en día, podemos admitir que el receptor gabaérgico/benzodiazepínico puede existir en dos estados conformacionales uno activo y otro de reposo los cuales coexistirían en un estado de equilibrio.

El estado de reposo y el activado representarían los estados de cierre y apertura respectivamente del canal del cloro. La presencia de dos clases de sitios de unión en el complejo receptor implica necesariamente el tener en cuenta los fenómenos de cooperatividad. Cualquier combinación de dos fármacos que se unen a distintos sitios de unión y que pueden acceder a estados activados o en reposo desarrollará la cooperatividad. Esta combinación es de tipo heterotrópico puesto que la interacción supone la unión a distintos sitios (el receptor gabaérgico y el benzodiazepínico) (23).

El funcionalismo molecular del complejo supone que la unión del GABA a su receptor provoca la apertura del canal del cloro, manteniéndose abierto mientras dure esa unión y permitiendo en

consecuencia el flujo de los iones cloro a través del ionóforo (24,25). Cualquier benzodiazepina, por ejemplo el diazepam, potencia la unión del GABA puesto que presenta una selectividad específica por el estado activo del complejo receptor y en consecuencia se prolonga la apertura del canal (26). La cooperatividad entre las benzodiazepinas y el GABA puede definirse por tanto como de heterotrópica y positiva.

Por su parte, el GABA potencia la unión de las benzodiazepinas a su correspondiente receptor central, sin embargo este hecho es mucho más difícil de demostrar experimentalmente, debido probablemente a que el receptor gabaérgico es un receptor de baja afinidad. Aparentemente, la mayor parte de las benzodiazepinas utilizadas en la clínica diaria no son capaces de provocar por sí mismas la apertura de los canales del cloro y es necesaria la presencia del GABA.

Aunque el complejo receptor gabaérgico-canal del cloro normalmente, conduce a una situación de cierre del canal en ausencia de GABA, las experiencias llevadas a cabo en animal "in vivo" (27), permiten deducir que la liberación endógena de GABA, en situación de homeostasis gabaérgica, mantiene un cierto estado de apertura del canal del cloro. Es obvio el mencionar aquí la importancia de la neurotransmisión gabaérgica, en el sentido de que la administración de antagonistas gabaérgicos produce una serie de convulsiones letales en el animal de experimentación (28).

La administración de diazepam amplifica y potencia las acciones postsinápticas del GABA, cuya base molecular es el originar un flujo mayor de iones cloro. Por el contrario, la administración de cualquier β -carbolina antagoniza los efectos postsinápticos del GABA y ello se traduce en la aparición de las convulsiones. Tanto las acciones a nivel postsináptico de las benzodiazepinas clásicas o de las β -carbolinas son antagonizadas por el Ro 15-1788, el flumazemil, un compuesto catalogado como antagonista específico del receptor benzodiazepínico central y cuya comercialización reciente en USA ha permitido evitar las complicaciones que supone la administración excesiva, voluntaria o no, de las benzodiazepinas.

Relacionado con este último compuesto pero que en posición 8, en lugar de un flúor, se coloca un grupo azido, tenemos el Ro 15-4513, el cual interacciona igualmente con el receptor central a las benzodiazepinas y posee la particular propiedad de antagonizar los efectos del etanol a nivel central, actuando de forma preventiva o curativa. Se trataría de un agonista inverso parcial pues precisa ocupar la totalidad de los receptores para ejercer su efecto. Pese a revertir los efectos del etanol, no reduce su toxicidad hepática y esa es la razón por la cual no se ha introducido en el mercado (29).

Todos los fármacos que actúan modulando alostéricamente la neurotransmisión presentan una serie de ventajas con respecto a aquellos que actúan directamente en los sitios de reconocimiento de

los neurotransmisores endógenos. Si consideramos que la terapéutica de un determinado proceso patológico originado por una disfunción en los niveles del neurotransmisor, un fármaco agonista que actúe directamente en el receptor, competirá con el neurotransmisor y producirá un efecto continuado, la magnitud del cual dependerá de la cantidad de fármaco que es capaz de interactuar con el complejo receptor. Si la configuración de dicho receptor es única, se perderá la integridad temporal de dicha neurotransmisión. Por el contrario, si el fármaco es un efector heterotrópico positivo (un agonista alostérico), tan sólo se potenciará el efecto cuando se libere el neurotransmisor y, consecuentemente, se mantendrá la neurotransmisión de una forma normal.

A pesar de todo lo expuesto, algunos autores (30) consideran hoy en día la posibilidad de una configuración triple para explicar el funcionalismo del complejo GABA-benzodiazepinas.

Pese a que se han propuesto una considerable cantidad de sustancias, queda sin resolver el problema de los ligandos endógenos para el receptor benzodiazepínico central. A este respecto, Guidotti y colaboradores han extraído y purificado del cerebro de rata un polipéptido denominado DBI (inhibidor de la unión del diazepam), el cual muestra una elevada afinidad por los sitios centrales de unión a las benzodiazepinas (31). Este péptido produce unos efectos similares a los de las β -carbolinas. Un fragmento de este péptido (18 aminoácidos) denominado ODN produce los mismos efectos que el péptido DBI precursor y se une asimismo a los sitios específicos para las benzodiazepinas (32). El que el ODN o el DBI representen o sean parte del ligando endógeno para el receptor benzodiazepínico a nivel central es algo que todavía es prematuro establecer. Sin duda, el descubrir el ligando endógeno que a nivel cerebral modula la acción del GABA y de las benzodiazepinas contribuirá a esclarecer las bases moleculares de la ansiedad y de sus trastornos asociados.

ACCIONES PERIFERICAS DE LAS BENZODIAZEPINAS

A partir de 1983 comienza una nueva era en la investigación de las benzodiazepinas al identificarse un segundo tipo de sitios de unión para estos compuestos, el cual no está ligado al GABA como ocurría a nivel central y tampoco está relacionado con el canal del cloro. Esta clase de sitios de unión se ha encontrado a nivel de tejidos periféricos.

La síntesis del Ro 5-4864, una benzodiazepina sin efectos ansiolíticos ha permitido desarrollar toda la investigación sobre los denominados "receptores periféricos" a las benzodiazepinas. El Ro 5-4864 es 30.000 veces más potente en desplazar al diazepam tritiado de su unión al riñón con respecto al cerecho. La ausencia de una correlación entre las propiedades terapéuticas de las benzodiazepinas y su unión a los receptores periféricos ha supuesto una controversia res-

pecto al papel de estos receptores a nivel fisiológico o farmacológico.

Aparte de las propiedades farmacológicas, el receptor periférico aparece tardíamente en la escala evolutiva. Así, mientras el receptor central existe en aves, reptiles y anfibios, el receptor periférico tan sólo ha sido demostrada su existencia en mamíferos (33). Las diferencias también se observan a nivel ontogénico, pues mientras en la rata pueden detectarse sitios de unión al Ro 5-4864 desde una semana antes del nacimiento (34), los receptores centrales a las benzodiazepinas aparecen en el período perinatal y aumenta su densidad en las dos primeras semanas de vida (35).

Aunque el papel fisiológico de estos receptores periféricos no se conoce en la actualidad, cabe pensar en que estos receptores pueden jugar un papel en el metabolismo intermediario y en el crecimiento.

La existencia de estos receptores periféricos puede demostrarse tanto a nivel del sistema nervioso central como en tejidos periféricos por lo que su denominación puede verse modificada. Los estudios autorradiográficos llevados a cabo por diversos autores (36) han mostrado una localización específica a nivel central que incluiría el bulbo olfatorio, el epéndimo y los plexos coroides (37).

A nivel puramente periférico, utilizando Ro 5-4864 tritiado así como el PK 11195 (antagonista específico de estos receptores periféricos) se han identificado sitios de unión en corazón, bazo, pulmón, hígado, glándulas salivares y epitelio nasal. Particularmente interesantes son los resultados obtenidos en órganos endocrinos como puede ser la hipófisis, testículos y corteza adrenal. Esta última, contiene una elevada densidad de estos sitios de unión. La existencia de receptores periféricos es prácticamente indetectable en homogenados musculares o del tracto gastrointestinal (38). Los estudios llevados a cabo en nuestro Laboratorio y de los que hablaré más adelante han demostrado una acción de las benzodiazepinas sobre la musculatura lisa (conducto deferente de rata). Si bien esta acción no parece mediada por sitios específicos de unión.

¿A nivel subcelular dónde se encuentran esos receptores periféricos?. La respuesta hay que encontrarla en los trabajos de Morangos (38) y Schoemaker (39), los cuales demuestran que los sitios de unión para el Ro 5-4864 se localizan preferentemente a nivel de las fracciones nuclear y mitocondrial. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado una correlación entre la unión de las benzodiazepinas y enzimas marcadores de los distintos compartimentos subcelulares por lo que esta localización propuesta puede ser revisada en cualquier momento. Tan sólo los estudios autorradiográficos de animal entero han mostrado una localización preferencial de estos receptores periféricos con estructuras mitocondriales (40).

Las acciones cardiovasculares de las benzodiazepinas tales como el inotropismo y el cronotropismo negativos, un efecto vasodilatador y antiarrítmico, sugirieron ya desde sus inicios una relación de este efecto con los canales del calcio (41). Varias experiencias "in vitro"

han demostrado que existe una interacción entre las benzodiazepinas y los canales de calcio voltaje dependientes. De esta forma, el diazepam y el flurazepam inhiben las contracciones inducidas por calcio. La unión de la nitrendipina tritiada a sus sitios de unión, también se ve inhibida de forma competitiva por estos compuestos.

El aparente efecto antagonista del calcio no se centra a nivel cardiovascular. En nuestro Laboratorio el equipo de investigación que dirige el Dr. Camarasa ha demostrado que las benzodiazepinas inhiben de forma no competitiva las contracciones inducidas por calcio en preparaciones despolarizadas de musculatura lisa utilizando como reactivo biológico el conducto deferente de rata. Asimismo, las propias benzodiazepinas son capaces de inhibir también de forma no competitiva las contracciones inducidas por noradrenalina en la mencionada preparación. Este efecto inhibitorio es revertido si se modifica la concentración de calcio extracelular del medio. La potencia de las distintas benzodiazepinas a nivel del conducto deferente de rata "in vitro" se correlaciona bastante bien con la selectividad por los receptores centrales y periféricos. Así, el producto más activo es el Ro 5-4864, seguido del diazepam y del clonazepam, éste último considerado como el prototipo de las benzodiazepinas con una mayor afinidad por los receptores centrales. El hecho de que el PK 11195 no sea capaz de antagonizar esta acción inhibitoria confirma la no existencia de receptores específicos periféricos. Además las concentraciones a las que son eficaces estas benzodiazepinas (nivel micromolar) implican un mecanismo de acción ligado a los canales del calcio.

Aunque el receptor benzodiazepínico periférico se haya convertido en un tema de especial interés en la investigación farmacológica de los últimos años, el hecho de que benzodiazepinas poco específicas como el propio diazepam sean capaces de interactuar a nivel de ambos tipos de receptor (central y periférico) ha renovado el esfuerzo investigador en el terreno de las acciones centrales de las benzodiazepinas.

Una posible explicación para aclarar las discrepancias entre las distintas afinidades de las benzodiazepinas por los receptores centrales o periféricos puede postularse en base a la denominada teoría del "receptor benzodiazepínico micromolar".

Este receptor de baja afinidad, identificado en cerebro, se une al diazepam con una afinidad del orden de $5 \times 10^{-5} M$. Esta concentración está en el rango en el cual las benzodiazepinas inhiben de forma estereoespecífica la captación del calcio en los sinaptosomas, la conductancia al calcio por parte de células neuronales y las convulsiones inducidas por electroshock (41).

El Ro 5-4864 con una afinidad micromolar disminuye la duración del potencial de acción, inhibiendo la entrada de calcio y produciendo en consecuencia un efecto inotropeo negativo. A igual rango de concentraciones, inhibe la despolarización inducida por potasio en las células de la musculatura lisa, hecho demostrado también en nuestro Laboratorio por el Dr. Camarasa y colaboradores, e inhibe asimismo la unión de la nitrendipina marcada (42).

Ya que las benzodiazepinas pueden en consecuencia, modular el funcionalismo de los canales de calcio, se plantea inmediatamente una cuestión de especificidad. Algunos autores (43) han demostrado que el efecto sobre los canales de calcio implica además un efecto inhibitorio sobre las conductancias al sodio y al potasio, lo que implica un efecto de tipo no específico a nivel de las propiedades eléctricas de membrana. Sin embargo, a nivel del lecho neuronal, concentraciones elevadas de benzodiazepinas son capaces de bloquear la conductancia al calcio sin que aparentemente se afecten los canales del sodio. Pese a que pueda aducirse que estas concentraciones no denotan un efecto específico, hay que citar que están en el rango de las utilizadas en la clínica humana en la prevención de las crisis epilépticas.

Queda claro pues, que las benzodiazepinas y otros compuestos no relacionados estructuralmente con ellas como puede ser el propio PK 11195 interaccionan con los procesos ligados a los canales de calcio voltaje-dependientes. Queda por determinar todavía cuál es el grado de especificidad en este tipo de acciones. ¿Es una consecuencia de la interacción con receptores benzodiazepínicos específicos o se trata de una acción asociada únicamente al canal del calcio?

Los datos actuales permiten inferir que tanto las acciones centrales como periféricas puedan estar moduladas por receptores específicos, la activación de los cuales conllevaría al cierre de los canales del calcio. Sin embargo, sabemos que existen distintos tipos de canales del calcio voltaje-dependientes y, por lo tanto, no debe desdeñarse la posibilidad de que las benzodiazepinas ejerzan su acción actuando selectivamente en uno de los tipos establecidos para el canal de calcio voltaje-dependiente.

El hecho de que las benzodiazepinas posean un espectro de actividad muy amplio y que esto se traduce en una utilización terapéutica variada, ha motivado que compuestos estructuralmente relacionados como el praziquantel y el diltiazem hayan sido estudiados a nivel de su unión al receptor benzodiazepínico. Estos estudios pueden dar lugar a la síntesis de nuevas estructuras que permitan el descubrimiento de nuevos tipos de canales de calcio.

Aparte de las especulaciones puramente teóricas y de la investigación farmacológica básica, es indudable que debe continuarse el estudio de la interacción de las benzodiazepinas con los canales del calcio. El control del "status epilepticus" requiere concentraciones micromolares de diazepam. Si este efecto terapéutico está ligado a la modulación de los canales de calcio existentes a nivel neuronal, sin duda el desarrollo de nuevas moléculas más activas a ese nivel constituiría un progreso terapéutico esencial.

Si bien la identidad y la función precisa del receptor benzodiazepínico periférico no puede establecerse todavía, sabemos que la membrana externa mitocondrial de la corteza adrenal contiene alrededor de 175 pmol de sitios de unión para el PK 11195 tritiado por mg de proteína. Asumiendo que esa membrana mitocondrial contiene

un 5% del total proteico de la mitocondria, puede estimarse que la proteína responsable de este sitio de unión tiene un peso molecular de alrededor 20-100 kDa, lo que representaría un 2-10% del total proteico de la membrana externa. Parece pues lógico pensar, que el sitio de unión de las benzodiazepinas debe estar localizado en algún componente de la cara externa de la membrana. La localización estratégica del receptor benzodiazepínico periférico en la cara externa de la membrana mitocondrial y la variedad de efectos que están mediados por las benzodiazepinas, como por ejemplo el crecimiento y diferenciación celular, permiten sugerir que este proceso farmacológico representa un sitio clave de modulación del metabolismo celular (44).

Han transcurrido tan sólo 30 años desde que se introdujo la primera benzodiazepina (el clordiazepóxido) en la clínica humana. En este corto período de tiempo la investigación farmacológica ha conseguido sintetizar, como ya se ha dicho, más de 2000 nuevos compuestos y ha permitido poner de evidencia la presencia de receptores específicos, incluso determinando la secuencia aminoacídica estructural, localización celular y distribución tisular. Pero esto no constituye una excepción en la investigación básica y clínica ya que si observamos cualquier campo de las ciencias biomédicas el avance ha sido paralelo.

Como cualquier investigación que se precie, la dedicación del personal investigador y la disponibilidad de medios son pilares fundamentales del desarrollo tecnológico. Este segundo apartado es el que sigue siendo la espada de Damocles de la investigación en nuestro país. Hemos de confiar que con nuestro esfuerzo personal y el de las generaciones venideras, España salga del túnel oscuro del que no se vislumbra la salida. Las benzodiazepinas, en particular, pueden constituir un vehículo apropiado para este fin.

Muchas gracias.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Nicoll, R.; Eccles, J. and Oshima, T. *Nature* 1975; 258: 625-627.
- (2) Ransom, R. and Barker, J. *Nature* 1975; 254: 703-705.
- (3) Haefely, W.; Kulcsar, A.; Mohler, H. et al. *Mechanism of action of benzodiazepines*. New York. Raven Press; 1975: 131-151.
- (4) Mohler, H. and Okada, T. *Science* 1977; 198: 849-851.
- (5) Squires, R. and Braestrup, C. *Nature* 1977; 266: 732-734.
- (6) Tallman, J.; Thomas, J. and Gallager, D. *Nature* 1978; 274: 383-385.
- (7) Martini, C.; Lucacchini, A.; Ronca, G. et al. *J. Neurochem.* 1982; 38: 15-19.
- (8) Skerritt, J.; Willow, M. and Johnston, G. *Neurosci. Lett.* 1982; 29: 63-66.
- (9) Asano, T. and Ogasawara, N. *Brain Res.* 1981; 225: 212-216.
- (10) Willow, M. and Johnston, G. *J. Neurochem.* 1981; 37: 1291-1294.
- (11) Nicoll, R. and Wojtowicz, M. *Brain Res.* 1980; 1971: 225-237.
- (12) Ticku, M. and Olsen, R. *Life Sci.* 1978; 22: 1643-1652.
- (13) Leeb-Lundberg, F.; Snowman, A. and Olsen, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980; 77: 7468-7472.
- (14) Skolnick, P.; Montcada, V.; Barker, J. et al. *Science* 1981; 211: 1448-1450.
- (15) Sigel, E. and Barnard, E. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 6965-6971.
- (16) Olsen, R.; Wong, E.; Stauber, G. et al. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2773-2778.
- (17) Sieghart, W. and Karobath, M. *Nature* 1980; 286: 285-287.
- (18) Deng, L.; Ransom, R. and Olsen, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 151: 277-280.
- (19) Schofield, P.; Darlison, M.; Fujita, N. et al. *Nature* 1987; 328: 221-227.
- (20) Nielsen, M.; Honore, T. and Braestrup, C. *Biochem. Pharmacol.* 1985; 34: 3633-3642.
- (21) Maksay, G.; Nielsen, M. and Simonyi, M. *Neurosci. Lett.* 1986; 70: 116-120.
- (22) Stevens, C. *Nature* 1987; 328: 198-199.
- (23) Pellow, S. and File, S. *Psychopharmacology* 1984; 83: 304-315.
- (24) Braestrup, C. and Squires, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 3805-3809.
- (25) Hunkler, W.; Mohler, H.; Pieri, L. et al. *Nature* 1981; 290: 514-516.
- (26) Olson, R. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1982; 22: 245-277.
- (27) Johnston, A. and File, S. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1987; 13: 452.
- (28) Margraf, J.; Ehlers, A. and Roth, W. *Behav. Res. Ther.* 1986; 24: 553-567.
- (29) Koch, H. *Int. Pharm. J.* 1988; 2: 85-86.
- (30) Gavish, M. and Snyder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 1939-1941.
- (31) Guidotti, A.; Forchetti, C.; Corda, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 3531-3535.
- (32) Costa, E.; Ferrari, M.; Ferrero, P. et al. *Neuropharmacology* 1984; 23: 989-991.
- (33) Papp, C. *Br. Heart J.* 1966; 31: 267-272.
- (34) Akutagawa, K., Makino, M. and Ishii, K. *Jap. J. Pharmacol.* 1983; 33: 845-850.
- (35) Cherubini, E. and North, R. *Nuroscience* 1985; 14: 309-315.
- (36) Anholt, R.; De Souza, E.; Oster-Granite, M. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985; 233: 517-526.
- (37) De Souza, E.; Anholt, R.; Murphy, K. et al. *Endocrinology* 1985; 116: 567-573.
- (38) Morangos, P.; Patel, J.; Boulenger, J. et al. *Mol. Pharmacol.* 1982; 22: 26-32.
- (39) Schoemaker, H.; Boles, R.; Horst, W. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 225: 61-69.
- (40) Anholt, R. *Trends Pharmacol. Sci.* 1986; 12: 506-511.
- (41) Rampe, D. and Triggle, D. *Trends Pharmacol. Sci.* 1986; 11: 461-464.
- (42) Holck, M. and Osterreider, W. *Eur. J. Pharmacol.* 1985; 118: 293-301.
- (43) File, S.; Green, A.; Nutt, D. et al. *Psychopharmacology* 1984; 82: 199-202.
- (44) Anholt, R.; Pedersen, P. De Souza, E. et al. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 576-583.