

R. 10.842



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA
SEVILLA

ESTUDIO DEL DIACEPAN Y TRIAZOLAN EN LA AGREGA-
CION PLAQUETARIA DE RATAS NORMALES Y ANSIOSAS.



Tesis Doctoral presentada por:

Antonio Hevia Alonso

Sevilla, 1985.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA-4



DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA
TELF. (954) 37 05 78 *
INT. 1417

JOSE S. SERRANO MOLINA, Catedrático Numera-
rio de Farmacología y Director del Departamento
de Farmacología y Terapéutica de la Facultad
de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que Don Antonio Hevia Alonso, Licenciado en
Medicina y Cirugía ha realizado bajo su dire-
cción y la del Dr. D. José A. Durán Quintana,
Jefe de Sección del Servicio de Farmacología
Clínica del Hospital Universitario, la Tesis:
Estudio del Diacepán y Triazolán en la agrega-
ción plaquetaria de ratas normales y ansiosas,
como parte de los requisitos para optar al gra-
do de Doctor en Medicina y Cirugía.

Sevilla, 15 de Febrero de 1985

Prof. José S. Serrano

Dr. José A. Durán



A mi esposa, Maria del Pilar y
a mi hijo, Antonio Maria, por
las horas que no pasé junto a
ellos y por ser ambos el prin-
cipal estímulo de mi vida.

A la memoria de mi madre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y de una manera preferente quiero citar a los directores de esta Tesis, Prof. Dr. José S. Serrano Molina y Dr. José A. Durán Quintana, por su orientación, consejos y apoyo constante a lo largo de la misma.

A los componentes del Departamento de Farmacología y especialmente a D. Francisco J. Miñano y a D. Manuel Sancibrián, que me ofrecieron su colaboración y amistad.

Al Dr. Antonio Reche, por su colaboración y orientación en el apartado hematológico.

A D. Alvaro Rendón, por su colaboración y orientación en los esquemas gráficos.

A D. Manuel Molero, por su colaboración en la labor mecanográfica.

A los alumnos internos D. Francisco García-Angleu y D. Francisco López-Valpuesta, por su ayuda en la fase experimental.

A los laboratorios Roche y Upjohn por su gentileza al facilitarnos los fármacos Diacepán y Triazolán.

INDICE

I.	BENZODIACEPINAS	1
A)	Introducción	1
B)	Estructura química general y clasificación ..	4
C)	Propiedades fisicoquímicas de las benzodiacé- pinas	11
D)	Farmacocinética	12
E)	Metabolismo	18
F)	Modificaciones farmacocinéticas en función de la edad y del estado fisiológico	24
II.	EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO	26
A)	Introducción	26
B)	Estructura del receptor benzodiacépinico	28
C)	Localización del receptor benzodiacépinico ..	28
D)	Densidad de población del receptor benzodiacé- pinico	31
E)	Especificidad del receptor benzodiacépinico .	33
F)	Características de la unión benzodiacépinas-- receptores	35
G)	Evolución ontogénica del receptor benzodiacé- pinico	40
III	CARACTERISTICAS Y TIPOS DE RECEPTORES BENZO- DIACEPINICOS CENTRALES	41
IV.	EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO	47
V.	MECANISMO DE ACCION DE LAS BENZODIACEPINAS ..	53
VI.	BENZODIACEPINAS Y LIGANDOS ENDOGENOS	73
VII	ANTAGONISTAS DE RECEPTORES BENZODIACEPINICOS.	74
VIII	ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LAS BENZODIACEPI- NAS	76
A)	Ansiolisis	76

B)	Hipnosis	78
C)	Anticonvulsivante y antiepiléptica	81
D)	Relajante muscular	82
E)	Respiración	83
F)	Sistema cardiovascular	83
G)	Analgesia	85
H)	Memoria	85
I)	Benzodiacepinas y efectos sobre la coagulación sanguínea y hemostasis	86
IX.	INDICACIONES TERAPEUTICAS DE LAS BENZODIACEPINAS	88
A)	Tratamiento de la ansiedad	88
B)	Tratamiento del insomnio	90
C)	Tratamiento de la epilepsia y otros síndromes convulsivos	92
D)	Tratamiento de los espasmos y distonías musculares	93
E)	Indicación en la preanestesia y anestesia ..	94
F)	Tratamiento del alcoholismo crónico	96
G)	Terapéutica coadyuvante con benzodiacepinas.	97
X.	OTROS APARTADOS	98
A)	Efectos indeseables y contraindicaciones ...	98
B)	Dependencia	101
C)	Tolerancia	103
D)	Intoxicaciones agudas	104
E)	Interacciones	105
XI.	<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	107
XII.	<u>MATERIAL Y METODOS</u>	109
A)	Material	109
B)	Métodos	110
XIII.	<u>RESULTADOS</u>	117
1)	Estudio hematológico de los animales experimentales	117

2)	Agregación plaquetaria en animales sin ansiedad: Testigos y muestras pretratadas con <u>dia</u> cepán y triazolán	119
3)	Agregación plaquetaria en animales con ansiedad: Testigos y muestras pretratadas con <u>dia</u> cepán y triazolán	138
XIV.	<u>DISCUSION</u>	161
XV.	<u>CONCLUSIONES</u>	169
XVI.	<u>RESUMEN</u>	171
XVII.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	173

I BENZODIACEPINAS

A) Introducción

En 1930, Sterbach en Cracovia, obtuvo las "heptoxi-diazepinas, pero fue en 1955 en los laboratorios Hoffman-La Roche, cuando realizando un "screening" de nuevos tranquilizantes, se estudia la posible utilidad terapéutica de estas sustancias.

En 1957-58, se sintetiza el Ro-5-0690 o clordiacepóxido, que tenía efectos sedantes y relajantes musculares en animales de laboratorio. Desde su aparición en el mercado, estos compuestos suscitaron un gran interés y una prueba del mismo es el incremento de la literatura científica mundial sobre las benzodiazepinas de 1960 a 1979 (Fig. 1).

El clordiacepóxido se comercializó en los Estados Unidos en 1961 y a partir de él, se investigaron varios miles de compuestos similares de los cuales sólo unos pocos se utilizan en terapéutica. En 1964, se introduce el diacepán, que ocupa el primer lugar en el consumo mundial de ansiolíticos y en 1965 el oxacepán. Posteriormente fueron apareciendo las distintas benzodiazepinas que actualmente se emplean en terapéutica, no habiéndose dejado de investigar como lo prueba la aparición recientemente de las 1,5 benzodiazepinas, las triazolobenzodiazepinas y por último las trienodiazepinas.

La introducción de las benzodiazepinas desplazó a los barbitúricos y al meprobamato de sus usos en la ansiedad y el insomnio. La Tabla 1, muestra las diferencias fundamentales en cuanto a las acciones, de los diferentes fármacos ansiolíticos.

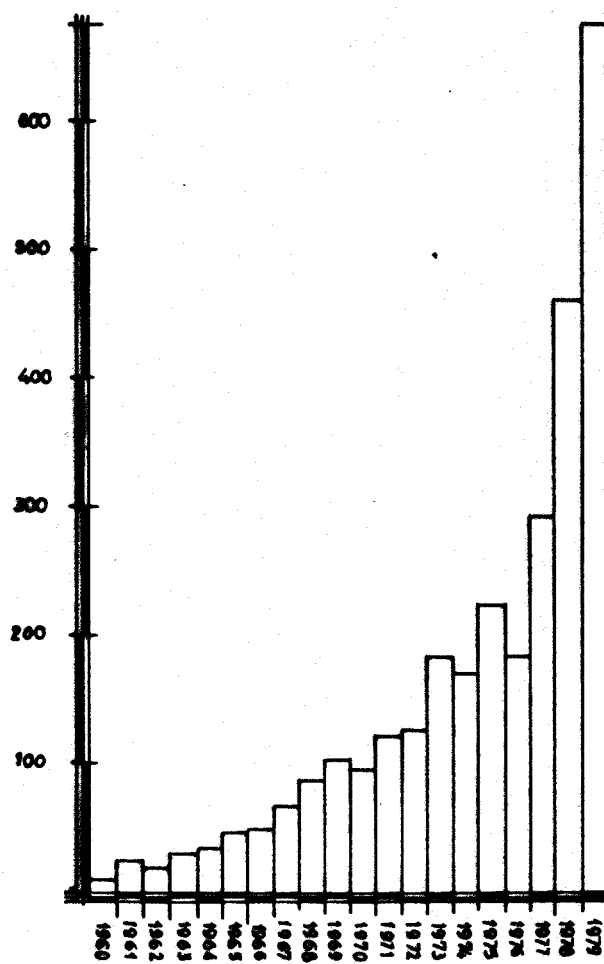


Fig. 1.- Incremento anual en la literatura sobre benzodiazepinas (148).

Tabla 1. Diferencias fundamentales entre los principales ansiolíticos (62)

	Benzodia- cepinas	Meproba- mato	Hidroxi- cina	Fenobar- bital
Relación ansiolisis/sedación	++	++	<u>+</u>	+
Relajación muscular	+++	++	0	<u>+</u>
Actividad anticonvulsivante	+++	++	-	+++
Duración de la acción	+++ [*]	+	+	+++
Tolerancia	+	+++	0	++
Dependencia física	+	+++	0	+
Alteraciones del sueño	+ [*]	++	++	++
Riesgo de suicidio	0	+++	++	+++

* Según el preparado y la dosis

B) Estructura química general y clasificación.

El nombre de benzodiazepinas define con exactitud la estructura básica de estos compuestos (Fig. 2). En efecto en ella hay condensados dos anillos, uno de los cuales es un benceno y el otro es una diazepina, heterociclo heptagonal con dos átomos de nitrógeno. El núcleo fundamental es el benzodiazepínico, salpicado de gran número de radicales. La mayoría de las benzodiazepinas poseen los átomos de nitrógeno en posiciones 1 y 4 (Fig. 2), aunque recientemente se han introducido las 1,5 benzodiazepinas (Fig. 3). Los átomos de dicho núcleo básico donde suele haber sustituciones son los siguientes (35,62,71):

Sustituciones en N-1:

La introducción de un radical carbonilo aumenta la potencia ansiolítica, aunque este radical no es esencial para la actividad farmacológica, determina en buena manera las características farmacocinéticas del compuesto.

Hay aumento de la actividad del compuesto si existe sustitución por un grupo metilo; otras sustituciones como la 1-etil, 1-alkil, 1-acetil y 1-ciclopropil son menos activas. El derivado 1-acetamido, posee menor capacidad de relajación muscular y propiedades sedantes, aunque mantiene los efectos anticonvulsivantes. Los grupos hidroxil y metoxil reducen la potencia y también la toxicidad al facilitar la conjugación.

Sustituciones en C-2 (R2):

Suele presentar un grupo carbonilo, que no es imprescindible para la actividad ansiolítica.

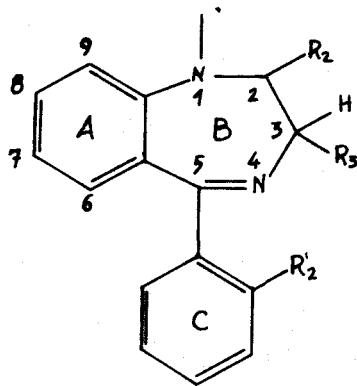


Fig. 2.-Estructura química del núcleo básico de benzodiazepinas 1,4.

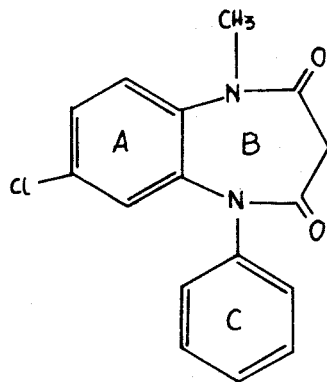


Fig. 3.- Benzodiazepinas 1,5 (Clonazepam).

La halogenación en esta posición eleva la potencia del compuesto, mientras que las sustituciones de grupos grandes reducen la actividad.

Sustituciones en C-3 (R3).

Habitualmente sin sustituir, la introducción de un radical hidroxilo facilita su eliminación al hacer al compuesto más polar.

Sustituciones en N-4.

De las benzodiazepinas 1,4, sólo el clordiazepóxido muestra una sustitución del N por un O y en las 1,5 por un grupo cetónico.

La reducción del doble enlace 4=5, reduce la actividad farmacológica.

Sustituciones en C-7 (R7).

La sustitución en 7, por un grupo o un átomo captador de electrones aumenta la actividad de la molécula. Todas las benzodiazepinas presentan sustituciones (bromo, cloro, nitrógeno) en esta posición, que reducen su actividad. La 7-trifluorometilación repercute en un aumento de la potencia. Los análogos $R_7 = H, CH_3, SCH_3, \text{ ó } SOCH_3$ son menos activos.

Otras sustituciones.

Las sustituciones en posiciones 6, 8 y 9 reducen la actividad del compuesto.

Por tanto las diversas sustituciones provocan cambios en :

- el espectro relativo de los efectos centrales: ansiolisis, sedación, miorelajación, hipnosis, etc.
- la potencia farmacológica en cada uno de dichos efec-

tos.

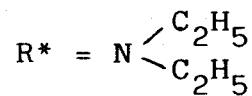
- las propiedades farmacocinéticas, con repercusión en la distribución del compuesto y la duración de la acción.

La Tabla 2, representa la estructura química de las principales benzodiazepinas 1,4. Otras benzodiazepinas 1,4 serían : camacepán, clonacepán, halacepán, medacepán, pinacepán, pracepán, tetracepán, etc. También benzodiazepinas 1,4 pero que añaden otros grupos químicos en su estructura son las Oxazolobenzodiazepinas y las Triazolobenzodiazepinas, que se representan respectivamente en las figuras 4 y 5 .

Cambiando el anillo A del núcleo clásico benzodiazepínico 1,4, obtenemos el Clotiacepán que sería una Tiofendiazepina 1,4 (Fig. 6) y el Brotizolam, también tiofendiazepina 1,4, pero que lleva añadido un núcleo triazolo (Fig. 7). Finalmente en la figura 8 se representa el Tofisopan, benzodiazepina 3,4.

Tabla 2. Estructura química de las principales 1,4 benzodiazepinas (62).

Compuesto	N ₁	R ₂	R ₃	C ₄	R' ₂	R ₇
Bromacepán	N-H	=O	-H		N	-Br
Cloracepato dipotásico	N-H	=O-- $\begin{matrix} \text{OH} \\ \text{OK} \end{matrix}$	-COOK	N--O		-Cl
Diacepán	N-CH ₃	=O	-H			-Cl
Flunitracepán	N-CH ₃	=O	-H		-F	-NO ₂
Fluracepán	N-CH ₂ -CH ₂ -R*	=O	-H		-F	-Cl
Loracepán	N-H	=O	-OH		-Cl	-Cl
Lormetacepán	N-CH ₃	=O	-OH		-Cl	-Cl
Nitracepán	N-H	=O	-H			-NO ₂
Oxacepán	N-H	=O	-OH			-Cl
Temacepán	N-CH ₃	=O	-OH			-Cl



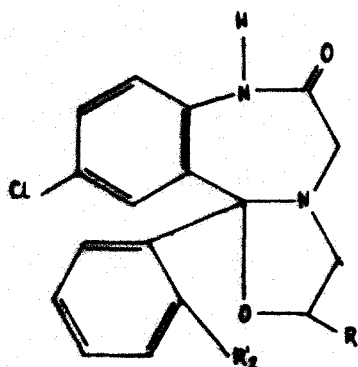


Fig. 4.- Oxazolobenzodiazepinas

	<u>R</u>	<u>R'</u> ₂
oxazolán	-CH ₃	-H
cloxazolán	-H	-Cl

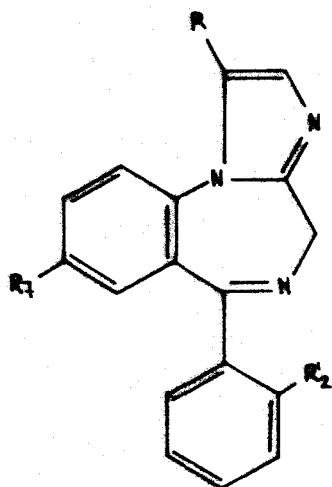


Fig. 5.- Triazolobenzodiazepinas

	<u>R</u>	<u>R'</u> ₂	<u>R</u> ₇
alprazolán	-CH ₃	-H	-Cl
estazolán	-H	-H	-Cl
triazolán	-CH ₃	-Cl	-Cl
midazolán	-CH ₃	-F	-Cl

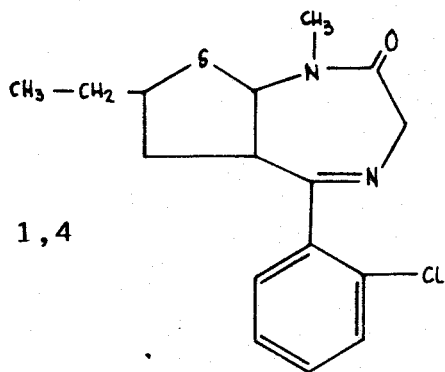


Fig. 6.- Tiofendiacepina 1,4
(Clotiazepán)

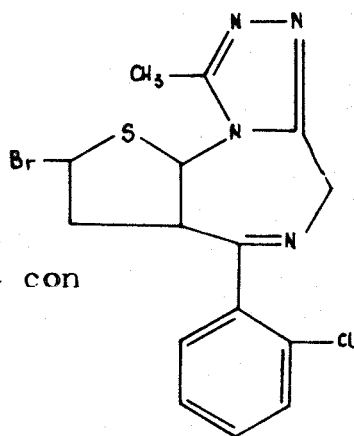


Fig. 7.- Tiofendiacepina 1,4 con
núcleo triazolo
(Brotizolán)

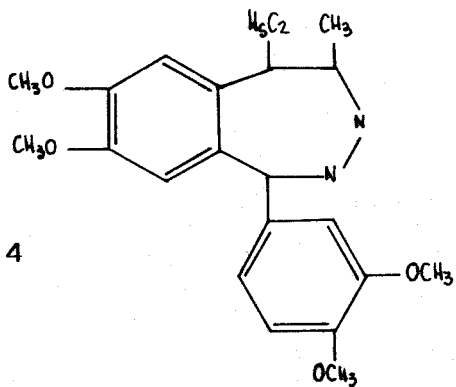


Fig. 8.- Benzodiazepina 3,4
(Tofisopán)

C) Propiedades fisicoquímicas de las benzodiazepinas.

Son polvos de color blanco amarillento. Su hidrosolubilidad es variable, prácticamente nula en las liposolubles y elevada en las que poseen radicales alcohólicos o ácidos en el núcleo diazepínico.

El carácter básico les podría conferir teóricamente la propiedad de formar sales ácidas, pero de ellas sólo es estable la del clordiazepóxido.

Su estabilidad es aceptable en general, aunque el cloracepato se altera por la luz. En medio acuoso son inestables por lo que las que precisan solución acuosa han de prepararse de forma extemporánea (158).

D) Farmacocinética.

Es muy variable de unas benzodiazepinas a otras y no existe un esquema común. Veáanse las tablas 3 y 4. Fundamentalmente las diferencias se establecen entre las benzodiazepinas hidrosolubles y las liposolubles (48, 72, 79, 158):

Las muy liposolubles (clordiazepóxido, diacepán) se absorben completamente por vía oral. Algunas como el diacepán y afines, presentan una biodisponibilidad equivalente o superior por vía oral que por vía i.m. (Figs. 9 y 10). Una excepción del grupo es el oxacepán que se absorbe por vía oral de forma más lenta y con una biodisponibilidad más baja que las demás. Las hidrosolubles tienen una absorción oral más pobre.

El tiempo en que se realiza la absorción es muy rápido en las benzodiazepinas liposolubles y más lento en las hidrosolubles. El flunitrazepán, diacepán, estazolán y triazolán (liposolubles), presentan una absorción rapidísima, de manera que las concentraciones máximas se obtienen de 0.5-2 horas después de la administración. Con las hidroxibenzodiazepinas (oxacepán, cloracepato, loracepán y lormetacepán) la absorción es más lenta y las concentraciones máximas se alcanzan entre las 3 y 6 horas post-administración.

Por vía i.m., las hidrosolubles, se absorben bien y de forma rápida, mientras que las liposolubles lo hacen de un modo lento y errático.

En la vía rectal, la absorción es inferior a la oral y variable según el sujeto.

Todas las benzodiazepinas se unen a proteínas, en concreto a la albúmina y esta unión varía desde un pequeño porcentaje para el fluracepán hasta casi el 99% para

Tabla 3. Características farmacocinéticas de las principales benzodiazepinas(62)

	t _{max}	Vd	(%)*	t _½	Principales metab. activos
Bromacepán	1		70	20-60	3-hidroxibromacepán
Clobazán	1-4		90	9-30	Norclobazán
Clordiazepóxido	1-4	0.3-0.6	94-97	5-30	Norclordiazepóxido Nordiazepán, Oxacepán
Desmetildiazepán (Nordiazepán)		0.9-1.3	97	51-120	Oxacepán
Diazepán	0.5-2	0.95-2	96-98	20-70	Nordiazepán, Oxacepán Temacepán
Flunitrazepán	1			15-30	
Fluracepán	1	3-4		51-100	N-desalquilfluracepán 3-H-N-desalquilfluracepán
Loracepán	1-2	0.7-1	85	10-20	
Oxacepán	1-4	0.6	87-90	4-13	
Triazolán	1			5-10	

t_{max.} = horas en que se aprecia la máxima concentración después de la administración

Vd = volumen aparente de distribución. Expresado en l/Kg

t_½ = vida media biológica

* = fijación a proteínas plasmáticas

Tabla 4. Resumen de las propiedades farmacocinéticas de las nuevas benzodiazepinas (73).

Fármaco	Via metabólica	Metabolito activo	Vida media
Clobazán	Oxidación(DM)	Clobazán-Desmetil-clobazán	Larga
Halacepán	Oxidación(A)	Desmetildiacepán (Halacepán)	Larga (Corta)
Ketazolán	Oxidación(OH)	Desmetildiacepán	Larga
Alprazolán	Oxidación(OH)	Alprazolán	Intermedia
Temacepán	Conjugación	Temacepán	Intermedia
Lormetacepán	Conjugación	Lormetacepán	Intermedia
Clotiacepán	Oxidación(OH,DM)	Clotiacepán Hidroxiclotiacepán Desmetilclotiacepán	Corta-Intermedia
Midazolán	Oxidación(OH)	Midazolán	Ultra-Corta
Triazolán	Oxidación(OH)	Triazolán	Ultra-Corta
Brotizolán	Oxidación	Brotizolán	Ultra-Corta

DM = Demetilación; DA = Desalquilación; OH = Hidroxilación

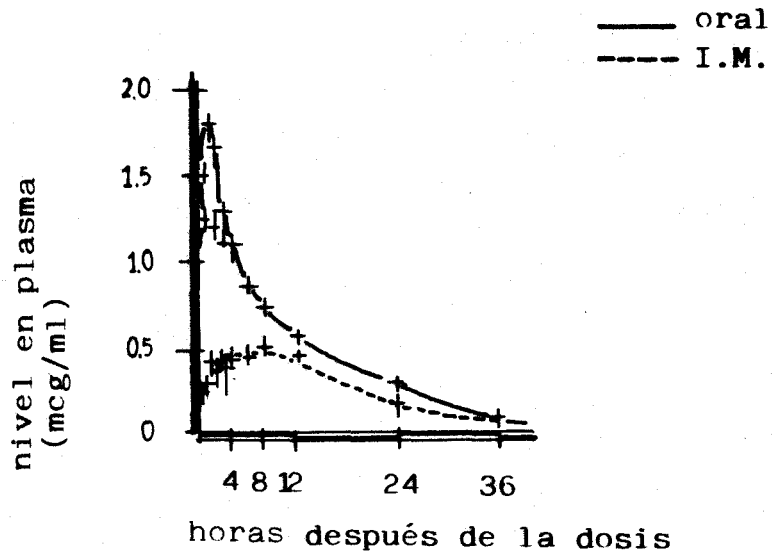


Fig. 9.- Estudios farmacocinéticos de niveles plasmáticos de clordiacepóxido.
(173)

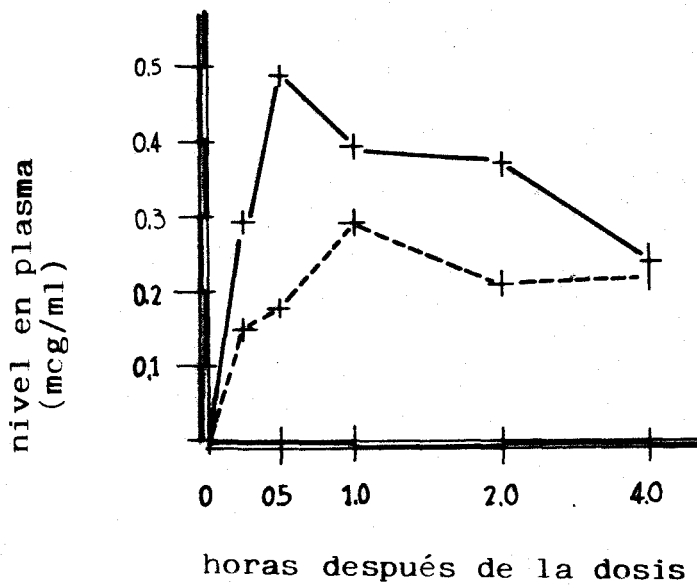


Fig. 10.- Estudios farmacocinéticos de niveles plasmáticos de diacepán.
(173)

el diacepán. El grado de unión está directamente relacionado con la liposolubilidad del compuesto. La competencia por la fijación a proteínas plasmáticas con otros medicamentos parece no tener trascendencia clínica, no obstante, algunos trabajos (33) muestran que en terapéutica concomitante con digitálicos, las benzodiazepinas inducen un incremento en la vida media de eliminación y disminución de la excreción urinaria de digoxina; probablemente producido por un efecto cooperativo que las benzodiazepinas ejercen sobre la unión a proteínas plasmáticas de la digoxina.

No parece tampoco existir correlación entre los niveles plasmáticos de las benzodiazepinas y sus efectos farmacológicos, ello podría deberse, entre otros factores, a la presencia de metabolitos activos y a la elevada fijación a proteínas de algunos compuestos (13).

La distribución es rápida y a favor de la alta liposolubilidad de los compuestos atraviesan bien las barreras hematoencefálica y placentaria. El comportamiento cinético de casi todas las benzodiazepinas se ajusta a un modelo bicompartimental abierto, aunque las más liposolubles como el flunitrazepán se adaptan mejor a uno tricompartmental y otras como el triazolán a uno monocompartmental (158).

Una vez que alcanzan la circulación son rápidamente captadas por la sustancia gris del encéfalo, a lo que sigue una fase más lenta de redistribución en la sustancia blanca y en el tejido adiposo. Esta fase lenta varia, según el compuesto, desde once minutos hasta doce horas. Una vez finalizada, el volumen de distribución es muy grande, siendo mayor en las liposolubles y en la mujer.

Trás la administración i.v. de benzodiazepinas, el descenso de sus concentraciones sanguíneas ocurre

en dos fases (120) :

- 1) Fase de distribución en los tejidos.
- 2) Fase de eliminación.

Ello se expresa con la siguiente ecuación exponencial, correspondiente a la distribución del medicamento en dos compartimentos :

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Siendo A la ordenada correspondiente a la concentración inicial del fármaco en el compartimento central o plasmático y B la relativa a la concentración del mismo fármaco una vez distribuido al compartimento periférico (o resto de tejidos). α y β , representan las respectivas constantes de eliminación.

El compartimento central comprende la sangre, los tejidos más vascularizados (corazón, hígado, pulmones, glándulas) y el SNC. El periférico incluye los tejidos menos vascularizados (músculos, grasa, hueso, etc.).

Cuando el fármaco se administra por otra vía distinta de la i.v., se suma a las anteriores una fase de elevación de las concentraciones sanguíneas que se corresponde a la absorción, en la cual las concentraciones sanguíneas son crecientes.

El descenso inicial (fase α) corresponde a la distribución del medicamento en los tejidos y es más o menos rápido según la benzodiazepina considerada. Cuánto más rápida sea esta fase, más corta es la duración del efecto farmacológico e incluso puede ser extremadamente rápida si el volumen de distribución del compuesto es grande (caso del nitrazepán o flunitrazepán).

La segunda fase del descenso (fase β) define su vida media y es la fase de la duración de la acción del fármaco y de sus posibilidades de acumulación.

E) Metabolismo.

Las benzodiazepinas sufren intenso metabolismo hepático. Los enzimas implicados se localizan en la fracción microsomal del retículo endoplasmático liso y fundamentalmente son oxidasa de función mixta. La mayoría de las benzodiazepinas no inducen la síntesis de estos ni de otros enzimas responsables del metabolismo de los medicamentos. Son una excepción el diazepán, clordiazepóxido y el fluracepán, ya que inducen su propio metabolismo. Por otro lado, el metabolismo del diazepán también puede inducirse por los inductores clásicos como el fenobarbital y la antipirina, siendo esta inducción ejercida sobre los procesos oxidativos N-desmetilación e hidroxilación; no obstante, la relevancia clínica de este hecho no está clara. Además algunas benzodiazepinas como el cloracepato y el fluracepán se metabolizan en la pared del estómago y del intestino delgado.

Muchos de los metabolitos originados poseen actividad farmacológica, en ocasiones superior al compuesto original, lo cual complica extraordinariamente tanto su farmacocinética como sus efectos farmacológicos.

La biontransformación de las benzodiazepinas difiere de la de otros fármacos que también poseen grupos fenílicos o bencénicos, en que son resistentes a la hidroxilación de dichos anillos.

Los procesos de metabolización son múltiples, aunque los más importantes son los que se desarrollan en el núcleo diazepínico. Uno de gran importancia es la desalquilación, que elimina el radical alquilo presente en el N-1, sin reducir su actividad. Otro es la 3-hidroxilación para las 1,4 benzodiazepinas o la 4-hidroxila-

ción para las 1,5, siendo también activos los metabolitos hidroxilados.

El tercer paso es la conjugación con ácido glucurónico, que los inactiva definitivamente. Los compuestos que no poseen grupos alquilo y que están ya hidroxilados (oxacepán y loracepán) sólo se conjugan, por lo que su inactivación es más rápida y su acción más corta.

El metabolito más importante es el N-desmetildiacepán o nordiacepán, por tres razones (62):

- 1) Su vida media es superior a la de las demás benzodiazepinas.
- 2) Aparece como metabolito común de varias benzodiazepinas (Fig. 11).
- 3) Su actividad farmacológica, que prolonga la acción del compuesto primitivo.

La producción de nordiacepán distingue a las benzodiazepinas en :

- a) las que lo producen, que serán de acción duradera y si su administración es repetida y continuada se acumularán tanto el fármaco original como el metabolito activo, sumándose sus efectos y tardándose más tiempo en alcanzar en el plasma la fase de equilibrio. Si se suspende la administración descenderán los niveles plasmáticos más lentamente, siendo distinta la velocidad de desaparición para el compuesto primitivo y el metabolito. En las terapéuticas crónicas los niveles del metabolito llegan a ser superiores a los del fármaco original (Fig. 12).
- b) las que no producen nordiacepán, se caracterizan por tener acción corta, menor grado de acumulación y una mayor rapidez en alcanzar la fase de equilibrio o en eliminarse (85) (Fig. 13).

El clobazán, la única benzodiazepina 1,5, sufre

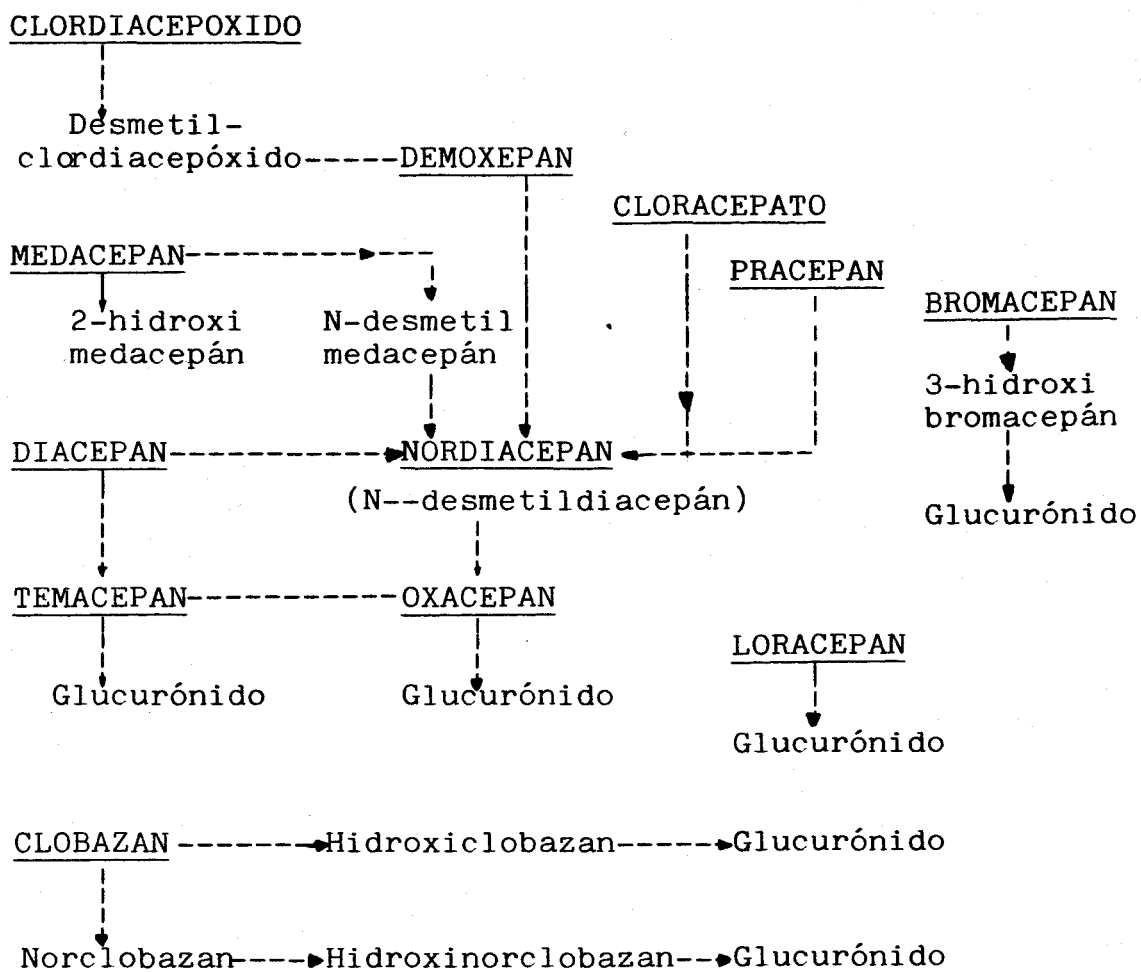


Fig. 11.- Metabolismo e interconexión de las vías metabólicas de las benzodiazepinas (62).

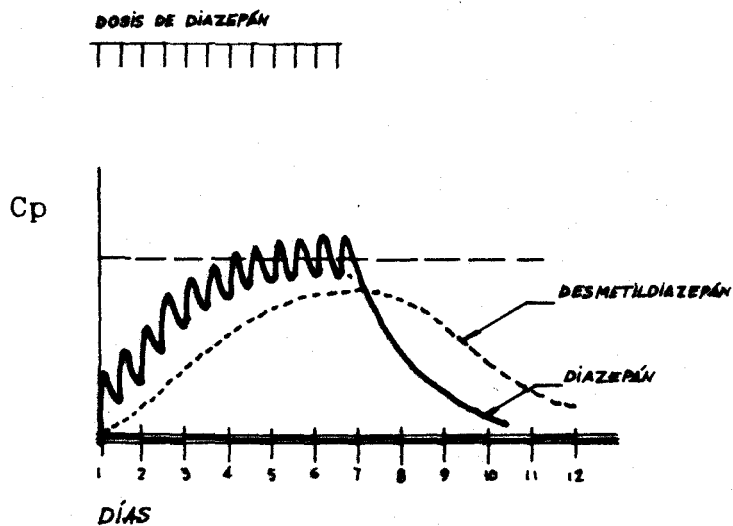


Fig. 12.- Diagrama de las concentraciones sanguíneas durante tratamiento crónico con diazepam. Hay acumulación del propio diazepam y de su metabolito activo desmetildiazepam. Ambos compuesto permanecen en sangre durante varios días después de suspender el tratamiento (48).

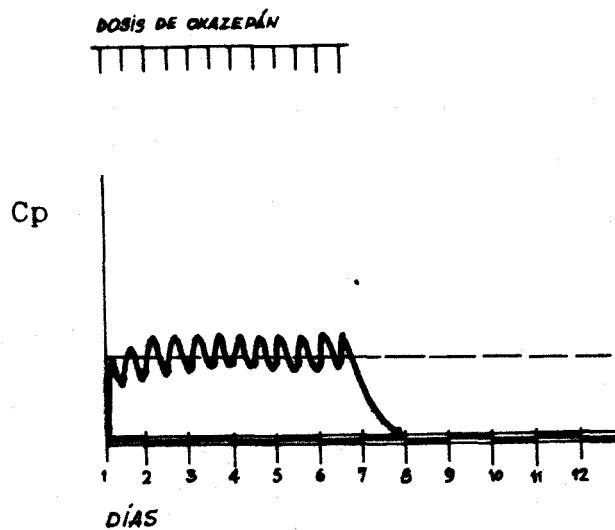


Fig. 13.- Diagrama de las concentraciones sanguíneas durante el tratamiento crónico con oxacepán, hay poca acumulación y no existen metabolitos activos (48).

N-desmetilación seguida de hidroxilación y conjugación (73). Su metabolito activo, el norclobazan, algo menos activo que el clobazan, tiene una vida media casi el doble que el fármaco original, por lo que en su administración crónica alcanza niveles más elevados.

Las nitrobenzodiazepinas tienen una vida media intermedia y sus metabolitos son inactivos como resultado de una hidrólisis en posición 7.

Las triazolobenzodiazepinas, debido al anillo heterocíclico en las posiciones 1 y 2, no se metabolizan a metabolitos activos.

La eliminación se lleva a cabo a través del riñón previa conjugación, pero en ciertos casos una pequeña fracción se elimina por secreción biliar y por heces.

F) Modificaciones farmacocinéticas en función de la edad y del estado fisiológico.

La mayoría de los estudios se han realizado con diacepán, aunque posteriormente se han generalizado los resultados (89, 120).

Todas las benzodiazepinas pasan con facilidad la barrera placentaria. La concentración sanguínea máxima en la vena umbilical se obtiene unos cuarenta minutos después de su administración por vía i.m. y doce minutos después de la administración i.v. a la madre. Las concentraciones en la sangre del cordón umbilical llegan a ser superiores a las de la sangre materna.

En el feto se concentran especialmente a nivel cardíaco. La administración de estos fármacos a la madre en la proximidad del parto, puede traer como consecuencia la aparición del llamado "síndrome de hipotonía en el niño", en el cual este nace con hipotonía, hipotermia y depresión respiratoria.

También pasan a la leche materna. Al sexto día de tratamiento se alcanzan en la leche concentraciones equivalentes a las plasmáticas. Ello puede repercutir en el lactante y evidenciarse como pereza para mamar; por ello es conveniente suspender la lactancia materna cuando éste indicado el tratamiento de la madre con benzodiazepinas.

La administración de benzodiazepinas a las parturientas no parece aumentar el riesgo de hiperbilirrubinemia en el recién nacido. Estudios "in vitro" demuestran que estos fármacos son incapaces de desplazar a la bilirrubina de su unión a la albúmina del recién nacido, ya que su grado de unión es cien veces más débil que el de la bilirrubina.

La vida media de las benzodiazepinas en el feto dependerá de su edad y del grado de madurez enzimática hepática. Así se explica la disminución progresiva de la misma en el caso del diazepam:

- 75 + 4 horas en los prematuros
- 31 + 2 horas en los recién nacidos
- 18 + 3 horas en los niños

Con la edad aumenta la vida media de algunas benzodiazepinas. La del diazepam a los veinte años es de 20 horas, mientras que a los ochenta es de 90 horas. Este aumento se ha adjudicado a las modificaciones del metabolismo hepático; ya que en la insuficiencia hepática está aumentada la vida media del diazepam y clordiazepóxido, fármacos que siguen procesos de oxidación y por tanto influenciados por el deterioro de la función hepática. Por tanto en los pacientes de edad y debido a que los procesos de biotransformación están disminuidos, debemos emplear benzodiazepinas que no sufran un incremento de su vida media y que serían aquellas que sufran procesos de conjugación hepática (no modificables por el grado de función del hígado), tales como bromazepam, lorazepam, y oxazepam (62).

II EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO

A) Introducción.

Al contrario que en otros procesos (esquizofrenia, depresión, Parkinson etc.), en la ansiedad no se han descrito alteraciones cuantitativas de los neurotransmisores cerebrales, ni la existencia de una disfunción cerebral, aunque estos datos no descartan la posibilidad de que exista alguna anomalía subyacente (26).

Uno de los mayores adelantos en la comprensión del mecanismo de acción de las benzodiazepinas, fue el descubrimiento en 1977 de la existencia en el Sistema Nervioso Central de receptores específicos para las benzodiazepinas. Para que las benzodiazepinas ejerzan efectos tan concretos deben unirse a unos receptores específicos a nivel central, localizados en las membranas neuronales. La adición de diazepam marcado a fragmentos de membranas de ratas demostró que si bien cierta cantidad del fármaco quedaba fijado en la membrana, esto no probaba su unión con receptores específicos. La adición a los fragmentos de membrana neuronal de diazepam marcado y flunitrazepam sin marcar, puso de manifiesto que el flunitrazepam desplazaba a la mayor parte del diazepam marcado, que correspondería al fijado a receptores específicos (53, 77). Estos hallazgos reafirman la hipótesis de que en el Sistema Nervioso Central existen receptores específicos para las benzodiazepinas (Fig. 14).

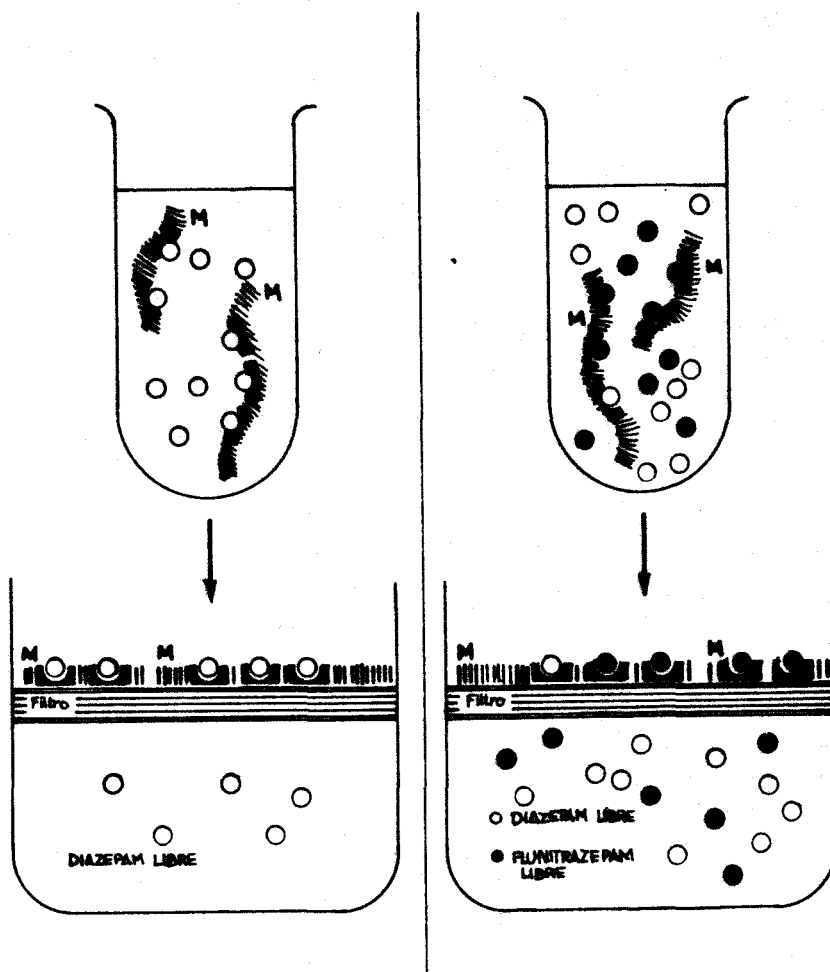


Fig. 14.- Investigación llevada a cabo para localizar los receptores de benzodiazepinas en fragmentos de membrana(M). Ver explicación en texto. (77).

B) Estructura del receptor benzodiazepínico.

Estructuralmente es una proteína de unos 200.000 daltons, localizada en las membranas neuronales. Algunos estudios han demostrado en él, la existencia de dos componentes proteicos (I y II) de 45.000 + 5.000 y 10.000 + 2.000 daltons, respectivamente. La proporción entre ambos componentes era de 1:3 aproximadamente. Resultados similares se obtuvieron con filtración aunque se comprobó que el componente I se convierte en el II, de lo que se ha deducido que la subunidad básica del receptor benzodiazepínico es el componente II y el I es un polímero que forma parte de aquél (18, 40, 113, 190).

C) Localización del receptor benzodiazepínico.

Mediante diazepán y flunitrazepán marcados isotópicamente se ha demostrado la existencia en membranas neuronales, de sitios con una elevada afinidad por las benzodiazepinas (56). Estos lugares de unión, son los receptores específicos que "in vivo" son probablemente responsables de los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas (20, 39, 53). También se ha demostrado la presencia del receptor benzodiazepínico y en cuantía muy elevada en neuronas integras del hipocampo (182).

En diversos ensayos (relajación muscular, actividad en la barra giratoria, actividad anticonvulsivante y potencia ansiolítica en el hombre, acción sedante en animales), se ha objetivado una buena correlación entre los valores que indican la afinidad de cada benzodiazepina por el receptor, medida por la capacidad de des-

plazar a las (3-H)-benzodiazepinas de dicho receptor y la correspondiente potencia farmacológica por estos (54, 106) (Tabla 5).

Algunos autores encuentran relación entre los efectos antipsicóticos de algunos fármacos y las células gliales al comprobar que una gran parte de los sitios de unión para el haloperidol y la dopamina se localizan en estas células. Posteriormente se detectó en ellas la presencia de uniones para (3-H)-diazepán, (3-H)-QNB (un antimuscarínico) y (3-H)-naloxona (antagonista puro de receptores μ , κ , y σ). Estos resultados sugieren una localización neuronal del receptor benzodiazepínico, el cual, por otra parte está relacionado con la Na⁺-K-ATPasa, de clara localización en las membranas celulares (81).

Otros autores encuentran que los lugares de unión para las benzodiazepinas en las células gliales no son relevantes clínicamente; además provocando una degeneración neuronal selectiva, se ha descartado la posibilidad de existencia de receptores benzodiazepínicos en la neuroglia de cerebros de rata (20, 105).

Tabla 5.- Benzodiacepinas : comparación de su afinidad con el lugar de fijación y la potencia terapéutica (158).

Fármaco	(1)		(2)	(3)	(4)
	hombre	rata			
Flunitracepán	2.2	2.8	0.32	0.06	7.9
Loracepán	2.3	2.7	0.62	0.78	7.7
Triazolam	2.4	2.8	-	-	3.2
Diacepán	7.4	6.3	7.00	0.70	26
Nitracepán	9.2	6.4	2.50	0.36	27
Fluracepán	11.0	11.0	4.70	4.70	53
Oxacepán	19.0	14.0	2.40	3.50	157
Bromacepán	21.0	12.0	2.20	0.63	57
Cloracepato	44.0	41.0	5.70	1.14	64
Clordiacepóxido	360.0	220.0	25.80	6.00	134

(1) Inhibición de la fijación de 3-H-diacepán en la corteza cerebral. (μmol)

(2) DL_{50} ($\mu\text{mol}/\text{Kg}$) . Antagonismo de la convulsión en ratas por pentetrazol.

(3) Acción relajante muscular en gato $\mu\text{mol}/\text{Kg}$

(4) Dosis terapéutica media $\mu\text{mol}/\text{dia}$

D) Densidad de población del receptor benzodiazepínico

La densidad de población de receptores benzodiazepínicos varía de unas regiones cerebrales a otras, constatándose la existencia de una buena correlación de la distribución entre rata y género humano (23, 62, 113, 138) (Tabla 6) :

Alta densidad :

- cortex frontal y occipital, cortex cerebral e hipocampo.

Intermedia:

- cuerpo estriado, globo pálido, hipotálamo, núcleo dentado y retina.

Baja:

- cuerpo calloso, puente, médula oblongata y médula.

La densidad de estos receptores puede modificarse en determinadas circunstancias por ciertas maniobras. Así las convulsiones por electroshock o pentilentetrazol aumentan el número de estos receptores; igual ocurre en las situaciones de ansiedad (26, 77). En tratamientos crónicos con benzodiazepinas o en enfermedades del Sistema Nervioso Central pueden existir cambios en las propiedades o variaciones en su número. Concretamente en la corea de Huntington existe un descenso de los receptores en el núcleo caudado y putamen. La interpretación y significación de estos hallazgos es teoría difícil, pero podría existir un ligando endógeno que al ser liberado en las circunstancias anteriores, ocupase los receptores y modificase la capacidad que tienen estos de unirse a los ligandos exógenos (23, 98, 113, 126).

D) Densidad de población del receptor benzodiazepínico

La densidad de población de receptores benzodiazepínicos varía de unas regiones cerebrales a otras, constatándose la existencia de una buena correlación de la distribución entre rata y género humano (23, 62, 113, 138) (Tabla 6) :

Alta densidad :

- cortex frontal y occipital, cortex cerebral e hipocampo.

Intermedia:

- cuerpo estriado, globo pálido, hipotálamo, núcleo dentado y retina.

Baja:

- cuerpo calloso, puente, médula oblongata y médula.

La densidad de estos receptores puede modificarse en determinadas circunstancias por ciertas maniobras. Así las convulsiones por electroshock o pentilentetrazol aumentan el número de estos receptores; igual ocurre en las situaciones de ansiedad (26, 77). En tratamientos crónicos con benzodiazepinas o en enfermedades del Sistema Nervioso Central pueden existir cambios en las propiedades o variaciones en su número. Concretamente en la corea de Huntington existe un descenso de los receptores en el núcleo caudado y putamen. La interpretación y significación de estos hallazgos es teoría difícil, pero podría existir un ligando endógeno que al ser liberado en las circunstancias anteriores, ocupase los receptores y modificase la capacidad que tienen estos de unirse a los ligandos exógenos (23, 98, 113, 126).

Tabla 6.- Receptores benzodiazepínicos en el cerebro humano.

	1	2	3
Corteza lóbulo frontal (c. frontal inf.)	960 \pm 200 (3)	860 \pm 130 (3)	3.5 \pm 0.3 (3)
Corteza lóbulo frontal (c. central inf.)	730 \pm 130 (4)	760 \pm 90 (4)	6.8 \pm 2.0 (4)
Corteza lóbulo occipital	1280 (2)	840 \pm 110 (3)	4.8 \pm 0.8 (3)
Corteza lóbulo temporal	870 \pm 260 (3)	670 \pm 150 (3)	4.9 \pm 1.3 (3)
Corteza hemisferio cerebeloso	580 \pm 20 (3)	580 \pm 40 (3)	4.2 \pm 0.5 (4)
Vermis	350 (2)	760 (2)	5.7 (2)
Hipocampo	615 \pm 190 (3)	670 \pm 120 (3)	4.2 \pm 0.6 (3)
Amígdala	165 (1)	510 (1)	9.0 (1)
Hipotálamo	250 \pm 75 (3)	450 \pm 120 (3)	7.4 \pm 2.3 (4)
Tálamo	560 (2)	330 \pm 55 (3)	4.6 (2)
Núcleo caudado	450 \pm 90 (3)	440 \pm 90 (3)	4.3 \pm 1.4 (3)
Putamen + Globus Pallidus	455 \pm 65 (3)	360 \pm 60 (3)	4.1 \pm 0.6 (4)
Núcleo dentado	80 (2)	160 (2)	7.0 (2)
Cuerpo calloso	85 \pm 20 (3)	110 (2)	20.0 \pm 7.0 (4)
Protuberancia	110 \pm 5 (3)	160 \pm 20 (3)	5.0 (3)
Bulbo raquídeo	130 (2)	200 (2)	12.0 \pm 6.0 (3)
Médula espinal	90 (2)	210 (2)	7.0 \pm 2.0 (3)

1.- Fijación específica 3-H-diazepán (cpm)

2.- Densidad de receptores de 3-H-diazepán (pmol/g proteína)

3.- Constante de disociación (nM)

E) Especificidad del receptor benzodiazepínico

Los sitios de unión del diazepán y flunitrazepán son específicos para las benzodiazepinas, lo demuestra el hecho que veintiuna benzodiazepinas diferentes modifican el IC_{50} (concentración que causa un 50% de inhibición de la unión específica del 3-H-diazepán) del 3-H-diazepán en un rango de concentraciones de 3×10^{-9} a 10^{-4} M (Tabla 7), mientras que otros depresores del Sistema Nervioso Central (meprobamato, barbitúricos y etanol) no logran modificar el IC_{50} ni a la concentración de 10^{-4} M. Por otro lado corroborando lo anterior, existe una buena correlación ($p < 0.001$) entre el desplazamiento del 3-H-diazepán por las benzodiazepinas y la potencia clínica de las mismas (108, 110).

Imnumerables compuestos (acetil-colina, noradrenalina, serotonina, GABA, glutamato, glicina o sus antagonistas, fenoxibenzamina, propranolol, pimozida, clozapina, metisergida, bicuculina, picrotoxina o estriquina), ni siquiera a la concentración de 3×10^{-6} M, desplazan al 3-H-diazepán (108, 110, 158, 159).

Tabla 7.- Inhibición de la unión específica del 3-H-diacepán (1.6 nM) a membranas cerebrales de rata por benzodiazepinas (159).

Compuesto	IC ₅₀ (nM)
RO 5-4023 (clonacepán)	5
RO 5-4200 (flunitracepán)	5
Loracepan	7
RO 5-3027	9.2
RO 5-3590	13.1
RO 5-6091 (fluracepán)	28
RO 5-2087 (diacepán)	34
RO 5-3059 (nitracepán)	34
RO 5-3350 (bromacepán)	48
RO 6-6616 (cloracepato)	62
RO 5-2904	76
Oxacepan	80
RO 5-2181	135
RO 5-4528	389
Clordiazepóxido	1072
RO 5-5807	4487
RO 5-3785	5686
RO 5-4556 (medacepán)	6217
RO 5-3636	8270
RO 5-4933	< 30000
RO 5-4864	163522

IC₅₀ = Concentración que causa un 50% de inhibición de la unión específica del 3-H-diacepán.

F) Características de la unión benzodiazepinas-receptores

Los sitios de unión en el cerebro para las benzodiazepinas presentan muchas de las características de un receptor (21, 109, 110, 159, 175):

- La fijación de un ligando exógeno (3-H-diazepán) se realiza en la membrana sináptica.
- La unión es estereoespecífica y saturable
- Existe una sola clase de lugares de unión, evidenciada por análisis del diagrama de Scatchard.
- El equilibrio de la interacción entre los lugares de unión y el ligando exógeno (3-H-diazepán) se alcanza alrededor de los quince minutos (Fig.15), siendo dicha unión termodependiente (máxima a 4° C., Fig 16) y el pH óptimo está entre 7 y 7.4 (Fig. 17).
- Existe una constante de disociación en dicha interacción (3.5 nM en ratas y 7 nM en humanos), siendo la cuantía máxima de la unión de 0.81 pmol/mg de proteínas en ratas y 1.2 en humanos (Figs. 18 y 19).

Es necesaria la integridad de dicha membrana, como lo demuestra la disminución de dicha unión cuando aquella se trata con carboxipeptidasas A y B, alfa quimotripsina, tripsina y pronasa, Como contraprueba, el pretratamiento de la membrana con fosfolipasas C y A-2 aumenta la unión del ligando exógeno, por aumentar la densidad y la afinidad de los receptores benzodiazepínicos respectivamente.

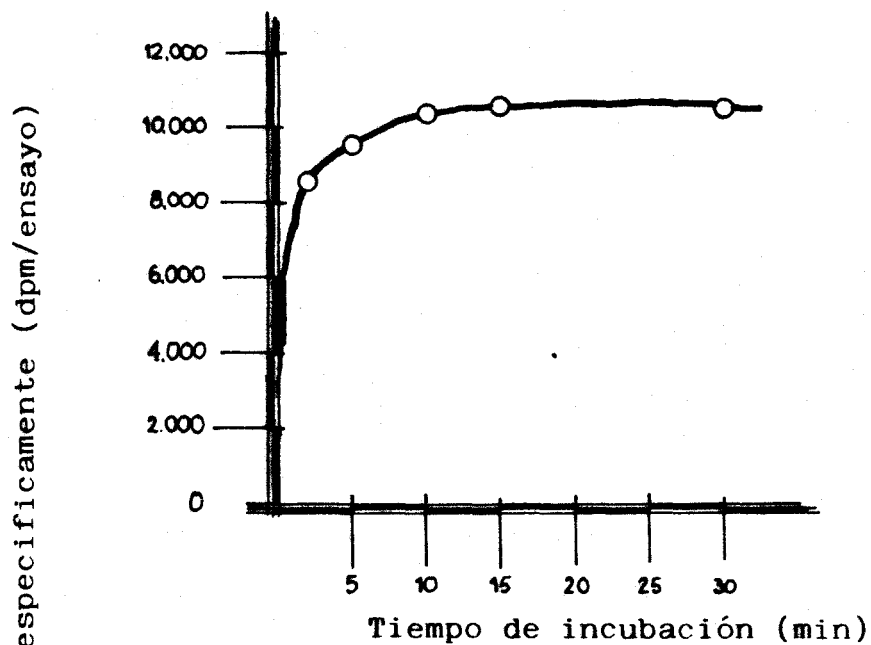


Fig. 15.-Dependencia del tiempo de la unión específica del 3-H-diacepán(109).

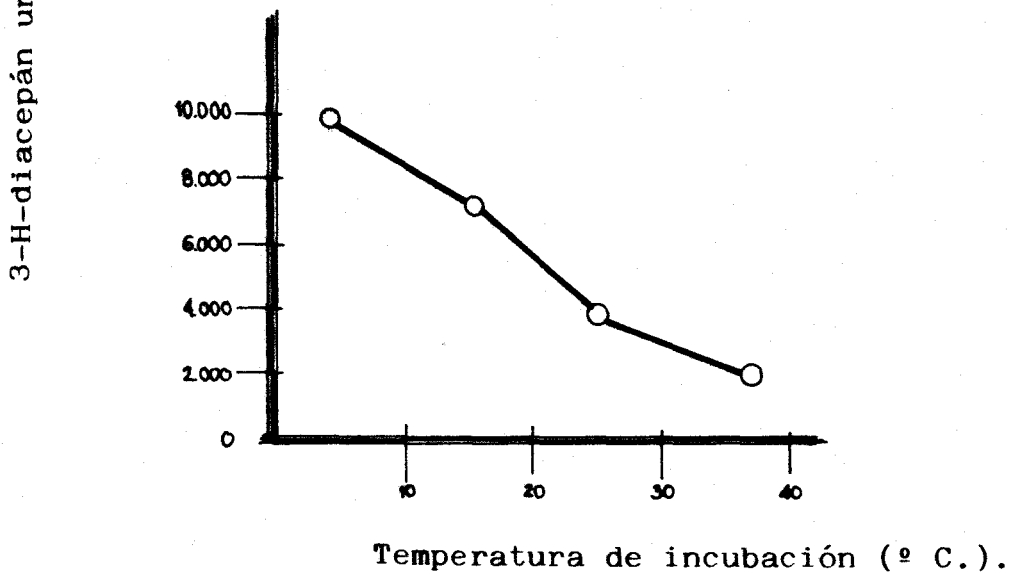


Fig. 16 .-Dependencia de temperatura de la unión específica del 3-H-diacepán(109).

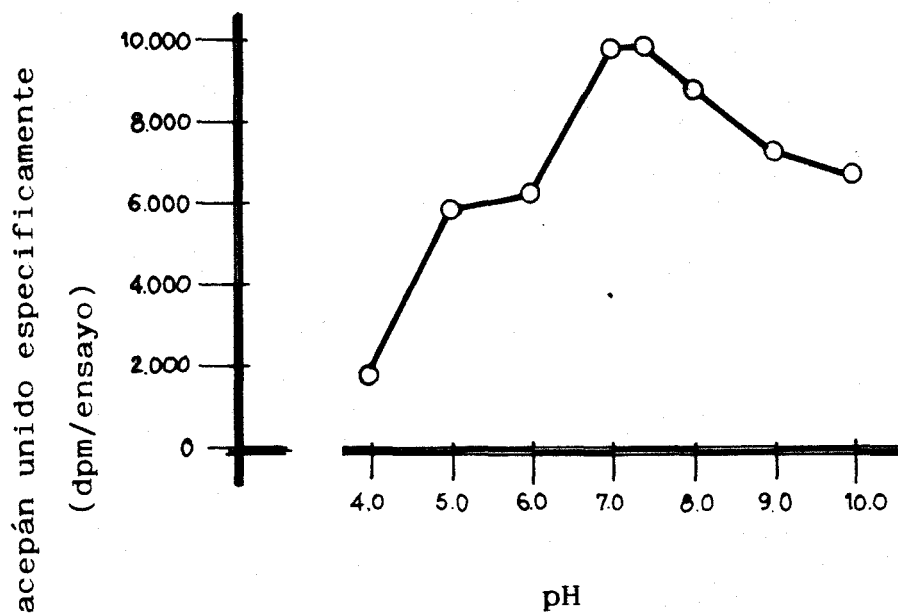
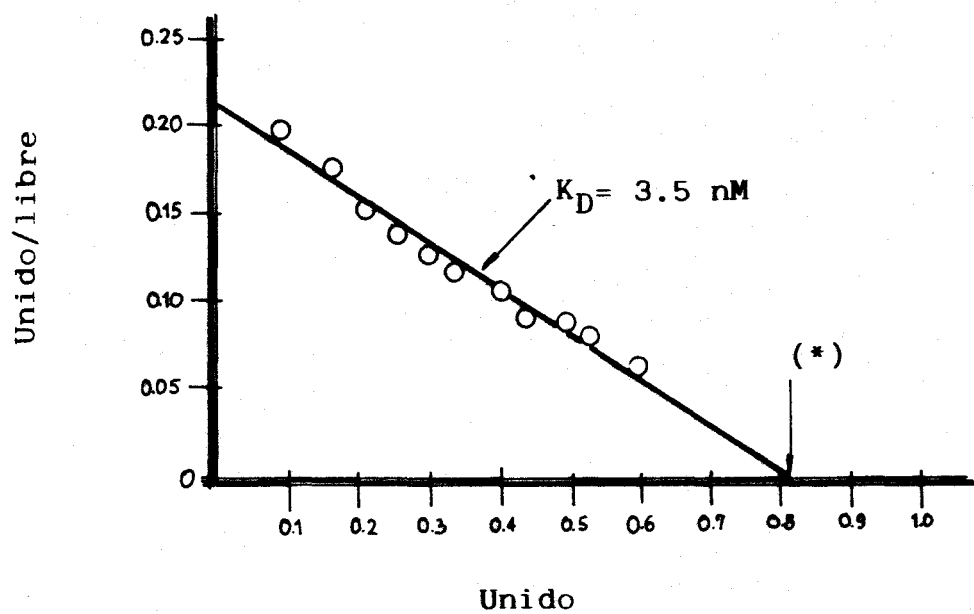
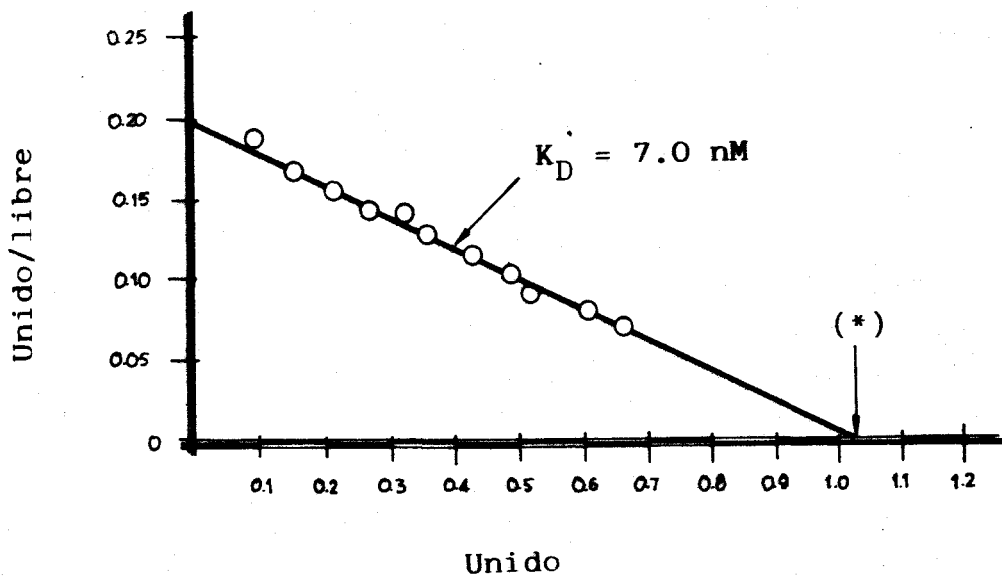


Fig. 17 .- Dependencia del pH de la unión específica del 3-H-diazepam (109).



(*) unión específica máxima = 0.81
pmol/mg proteína

Fig. 18 .- Diagrama de Scatchard del 3-H-diacépan unido específicamente (109)



(*) unión específica máxima = 1.02
pmol/ mg proteína

Fig. 19.- Diagrama de Scatchard del 3-H-diacépan unido específicamente (109).

G) Evolución ontogénica del receptor benzodiazepínico

En el tejido nervioso de los invertebrados estudiados no se detectan receptores benzodiazepínicos y en los primeros vertebrados en que aparecen son los peces, en algunos de los cuales se encontraron dos subclases, con alta y baja afinidad (113, 117).

Estos receptores se modifican con la escala filogenética y así el receptor benzodiazepínico aparece precozmente en el cerebro de rata y ratón. Sin embargo el desarrollo ontogénico no modifica sus características cualitativas, hallándose la máxima capacidad de fijación de benzodiazepinas una semana después del nacimiento en la rata y a los 21 días después del nacimiento en el ratón (19, 135).

III CARACTERISTICAS Y TIPOS DE RECEPTORES BENZODIACEPINICOS CENTRALES

El uso de compuestos no benzodiazepínicos que interactúan específicamente con los receptores benzodiazepínicos pone de manifiesto la heterogeneidad de dichos receptores. Estos agentes incluyen las triazolopiridazinas (TPZ)(CL 218872), que desplazan al diazepam y flunitrazepam marcados de sus lugares de unión y las Beta-carbolinas-carboxilatos (etil y propil β -carbolina-3-carboxilato (BCC), compuestos endógenos que presentan gran afinidad hacia los receptores benzodiazepínicos no acoplados al receptor gabaérgico. Las TPZ reconocen dos subtipos de receptores benzodiazepínicos, clasificados como Tipo I y Tipo II (el primero tiene alta afinidad por TPZ y BCC, mientras que el segundo presenta baja afinidad por estos ligandos). Los subtipos discriminados por las BCC se han designado como BZ1 (alta afinidad) y BZ2 (baja afinidad) (25, 31, 58, 116, 164, 180).

Existe una distribución regional de estos subtipos de receptores, localizándose el Tipo I preferentemente en, el cerebro, cerebelo y cuerpo estriado y el Tipo II en hipocampo, putamen y giro dentado.

Los Tipos I y II de receptores benzodiazepínicos presentan también diferencias de tipo físico : El Tipo I resiste a la acción de los detergentes (Triton X-100, cloruro sódico, digitonina, Nonidet P-40 y Lubrol OX) y el II es fácilmente solubilizable por ellos.(99).

Los datos presentados sugieren que los receptores BZ1 y BZ2 podrían corresponderse con el Tipo I y II respectivamente.

Basado en la afinidad de las TPZ por los dos sub-

tipos de receptores benzodiazepínicos, se ha propuesto que los efectos ansiolíticos estarían mediados por el Tipo I de receptores, que serían independientes de la acción del Gaba y del ionóforo del cloro, mientras que los efectos anticonvulsivantes e hipnótico-sedantes lo serían a través del Tipo II, Gaba y cloro dependiente. Las benzodiazepinas tendrían similar afinidad por ambos tipos de receptores, por lo que pueden producir sedación y sueño a las mismas dosis que producen ansiolisis (22, 82, 83, 90, 118, 119, 191).

Conocida la capacidad del Gaba para elevar la afinidad de las benzodiazepinas por los receptores benzodiazepínicos, es conveniente determinar si las afinidades de las BCC marcadas por los subtipos de receptores BZ1 y BZ2 están reguladas o no por Gaba como se había postulado previamente para los Tipos I y II (69, 125, 135, 136, 186):

Se sabe que las 3-H-BCC reconocen a los dos subtipos de receptores benzodiazepínicos, aunque tienen alta afinidad por el subtipo BZ1. Esta selectividad permite la determinación de la capacidad del Gaba para regular la unión de las benzodiazepinas al receptor BZ1. En consecuencia se utilizaron las 3-H-BCC a bajas concentraciones para marcar los receptores de alta afinidad y el 3-H-flunitracepán o altas concentraciones de 3-H-BCC para marcar a ambos receptores, el de alta y el de baja afinidad (BZ1 y BZ2 respectivamente).

Se encontró que los receptores BZ1 de cortex cerebral e hipocampo no eran regulados por Gaba, mientras que si lo era el receptor BZ1 del cerebelo. Como era de esperar, los receptores BZ2 del cortex cerebral e hipocampo si estaban regulados por Gaba. Por otro lado, el Gaba no incrementó la afinidad del flunitracepán por el receptor benzodiazepínico de alta afinidad del hipo-

campo, ya que no desplazó a las 3-H-BCC a bajas concentraciones a la temperatura de 0° C. Se interpretó que sólo el receptor de alta afinidad, el BZ1, fijaba en tales condiciones experimentales las 3-H-BCC a bajas dosis, lo que confirmaría la existencia de dos subtipos de receptores benzodiazepínicos.

En cortex cerebral se ha observado, que el Gaba puede inducir un pequeño incremento en la afinidad del flunitracepán por el receptor de alta afinidad y además el Gaba aumenta la afinidad del flunitracepán hacia los receptores BZ1 cerebelosos, ello sugiere la posibilidad que estos receptores (asociados al receptor Gaba) sean diferentes de los hallados en el cortex cerebral. No obstante el efecto del Gaba en el cerebelo fue menor que en el hipocampo y cortex cerebral, lo que permite suponer que el acoplamiento entre el Gaba y receptores BZ2 en hipocampo y cortex cerebral, pueda ser cualitativamente diferente del existente con el receptor BZ1 en el cerebelo. Esta diferencia de receptores puede explicarse de dos maneras:

- a) que los receptores benzodiazepínicos ocupados por bajas concentraciones de 3-H-BCC y a 0° C., puedan no estar acoplados al receptor de Gaba, mientras que los ocupados por altas concentraciones del mismo ligando y a la misma temperatura si están funcionalmente acoplados (a 37° C., por razones termodinámicas todos los receptores pueden aparecer acoplados tanto con las BCC como con PTZ).
- b) otra posibilidad es que bajas concentraciones de 3-H-BCC a 0° C., puedan ocupar un subtipo de receptor benzodiazepínico que está asociado al receptor de Gaba pero que es insensible al Gaba o muscimol y tiene una gran sensibilidad hacia derivados de piperidina. Precisamente esta heterogeneidad de los receptores Gaba hace

posible que los receptores benzodiazepínicos puedan asociarse con diferentes subtipos de ellos.

c) que los receptores benzodiazepínicos (BZ1) presenten "per se" una conformación con alta afinidad por el flunitracepán. Si la conformación inducida por Gaba es similar a aquella, la administración del neurotransmisor no modifica la afinidad de los receptores BZ1 por el flunitracepán.

El efecto de la temperatura sobre la unión de las 3-H-BCC a los receptores benzodiazepínicos tiene gran relación con la heterogeneidad del receptor benzodiazepínico, aunque dicho efecto es reversible. La incapacidad de las BCC y PTZ para discriminar los subtipos de receptores benzodiazepínicos a 37° C., sugiere que su heterogeneidad se debe a la existencia de distintos estados de conformación de un único receptor. Se puede admitir por tanto, que el acoplamiento entre el Gaba y los receptores benzodiazepínicos influye en la conformación de estos últimos. Como es lógico, la posibilidad de que a 37° C., se desnaturalice uno de estos subtipos de receptores no puede ser excluida.

En resumen, la baja afinidad de los receptores BZ2 en cortex cerebral e hipocampo los hace más sensibles que los BZ1 a la influencia del Gaba.

El receptor BZ1 del cerebelo es diferente a los del cortex cerebral e hipocampo ya que está acoplado a un receptor de Gaba. Ello indicaría que también existiría una heterogeneidad interregional de tales receptores. No obstante la función del Gaba sobre tales receptores benzodiazepínicos no está todavía bien establecida. Es posible que el Gaba pueda influir en la conformación de dichos receptores y ello se refleja en las diferentes capacidades de unión de las beta-carbolinas a 0°C.

También se ha demostrado la heterogeneidad de los receptores benzodiazepínicos en el Sistema Nervioso Central, tras la obtención de curvas de disociación bifásicas, curvas polifásicas a la inactivación por el calor y por último mediante estudios de afinidad con flunitrazepam marcado (105).

Por otra parte estudiando las características de la unión del diazepam y del flunitrazepam a los receptores benzodiazepínicos centrales se encontró que :

- en cortex cerebral y cerebelo, el número de receptores fue similar para ambos ligandos, pero la afinidad del diazepam fue cuatro veces mayor que la del flunitrazepam.

- en hipocampo el número de receptores era mayor para el diazepam que para el flunitrazepam, pero la afinidad para aquel era diecisiete veces menor (181).

Estas diferencias confirman la presencia de dos tipos de receptores benzodiazepínicos, con baja y alta afinidad respectivamente para las benzodiazepinas marcadas isotópicamente.

Otro estudio que justifica la heterogeneidad de los receptores benzodiazepínicos es la diferente fijación de diazepam y beta-carbolinas a los mismos tras el pretratamiento con irazepina, una benzodiazepina alquilante. La unión del diazepam se redujo en un 25-30%, mientras que la de las carbolinas solamente disminuyó un 8.5 %. Todo ello sugiere que benzodiazepinas y beta-carbolinas se unen al mismo tipo de receptor, aunque en subunidades o sitios diferentes de fijación y con diferentes afinidades (156).

Es tal la afinidad y especificidad de las beta-carbolinas por el receptor BZ1 que pueden ser antagonistas de los mismos e impedir los efectos de las benzodiazepinas :

- ansiolíticos, anticonvulsivantes (aunque ellas no son convulsivantes) e hipnótico-sedantes, reduciendo además las dosis de fármacos tales como pentilentetrazol que producen convulsiones. Por otro lado, la existencia de distintos sitios en el receptor benzodiazepínico, con diferente afinidad para las benzodiazepinas, puede explicar las diferencias de afinidad de dicho receptor por compuestos como el Gaba y el pentobarbital (38, 82, 169).

IV EL RECEPTOR BENZODIACEPINICO PERIFERICO

Además de en Sistema Nervioso Central, se detectan sitios de unión para las benzodiazepinas en corazón, células cebadas, hígado, íleo, plaquetas, pulmón, riñón y se les califica como auténticos receptores benzodiazepínicos, si bien diferentes de los centrales; no habiéndose demostrado hasta el presente momento su función fisiológica (12, 22, 43, 161, 165, 184).

Existen diferencias entre este tipo periférico de unión para benzodiazepinas o receptores periféricos y el tipo de unión central o receptor benzodiazepínico central. La afinidad del 3-H-diazepán por dicho receptor es de 5 a 30 veces menor que para el central. De todas maneras, este receptor periférico parece ser una variedad del central como lo demuestra el que la unión del ligando 3-H-diazepán es específica, saturable, dependiente de temperatura (unión máxima a 0°C.), pH-dependiente (óptimo de 5 a 9 para las plaquetas y de 6.8 a 7.4 para las células cebadas) y lineal con el número de células. Además el diagrama de Scatchard demuestra la presencia de una sola población de estos tipos de unión periférica (18, 165, 184).

Su especificidad se ha puesto de manifiesto frente a numerosos fármacos (noradrenalina, propranolol, acetil-colina, carbacol, atropina, hexametonio, serotonina, morfina, levalorfan, histamina, difenhidramina, metiamida y Gaba) que a la concentración de 10 μM , no modificaban la unión al receptor del diazepam marcado isotópicamente. (168).

La unión del diazepam a los receptores benzodiazepínicos centrales o periféricos, puede ser diferenciada mediante el uso del clonazepam y del Ro-5-4864

(4'-clorodiacepán). El primero, un ligando específico para el receptor benzodiazepínico central, no desplaza al 3-H-diacepán unido a los receptores benzodiazepínicos periféricos, pero si desplaza al 3-H-diacepán unido al receptor central. Lo contrario ocurre con el Ro-5-4864, ligando específico para el tipo de unión periférica y agente proconvulsivante.

El Ro-5-4864 ejerce sus acciones uniéndose en el cerebro a un componente del complejo supramolecular Gaba-benzodiazepina-ionóforo del cloro, diferente del sitio de unión de las benzodiazepinas; pero también se une reversiblemente y con alta afinidad ($K_D = 0.6 \text{ nM}$), a una población única y saturable de sitios de reconocimiento de benzodiazepinas en las membranas de células periféricas.

El PK-11195, compuesto no benzodiazepínico, ó 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolinacarboxamida, desplaza al Ro-5-4864 no sólo del cerebro sino también de los sitios específicos de unión periféricos (corazón, riñón, etc), por lo que ha sido considerado como un antagonista selectivo de receptores benzodiazepínicos periféricos.

Finalmente debemos destacar que la unión del Ro-5-4864 a membranas cerebrales aunque específica, de alta afinidad ($K = 1.1 \text{ nM}$) y termosensible no es modulada por Gaba, barbitúricos, ionóforo del cloro o fármacos convulsivantes. Siendo la distribución regional y subcelular de estos lugares de unión diferente de la que presentan las benzodiazepinas en el cerebro, mostrando el bulbo olfatorio la más alta densidad, mientras que áreas corticales de hipocampo son las de menos densidad entre las estudiadas (10-15%). Mostrando el Ro-5-4864 una afinidad por el lugar periférico de 10 y 1200 veces superior al diacepán y clonacepán respec-

tivamente, siendo la afinidad del diacepán y flunitracepán por el sitio de unión periférico solo ligeramente más baja que por el sitio central (146, 188).

Los estudios de relación entre estructura y actividad de ligandos de receptores benzodiazepínicos periféricos, revelan que una 4-sustitución asegura la especificidad para el tipo periférico y una fracción N-metil es esencial para su actividad. Estos hallazgos son importantes porque estructuralmente el Ro-5-4864 difiere del diacepán sólo por una cloro sustitución en el carbono 4 del fenilo. De cualquier modo las benzodiazepinas que se unen a sitios periféricos tienen en su estructura una serie de características químicas:

- la sustitución en el carbono 4 del grupo fenilo por una molécula de cloro incrementa su afinidad por dicho receptor.
- las sustituciones en el nitrógeno 1 son imprescindibles para su actividad (146)

Se sabe que el receptor benzodiazepínico central forma parte del complejo supramolecular que es el receptor gabaérgico. Sin embargo ni el Gaba, ni otros componentes de dicho complejo como el pentobarbital, los proconvulsivantes Ro-5-3663, picrotoxina y los iones de cloro, afectan la unión periférica del Ro-5-4864, lo que demuestra que se trata de otra unión distinta de la central. Por otra parte el tracazalato, una pirazolopiridina, que estimula la unión de las benzodiazepinas al receptor benzodiazepínico central en el sitio picrotoxina-barbitúrico del complejo supramolecular, inhibe la unión del Ro-5-4864 a las membranas cerebrales de rata, lo que proporciona un nuevo criterio diferencial entre el sitio de unión central y el periférico (12).

La distribución regional de los lugares de fija-

ción del Ro-5-4864 es diferente de la que previamente se estableció para el tipo de receptores centrales como ya comentamos anteriormente, pero se distingue una diferencia adicional entre los sitios centrales y periféricos; los primeros se enriquecen en la fracción sinaptosómica-mitocondrial (P_2) o en la fracción mitocondrial (P_3), mientras que los periféricos se enriquecen en la fracción nuclear (P_1)(66, 146).

Las consideraciones expuestas permiten considerar a los lugares periféricos de fijación como auténticos receptores benzodiazepínicos periféricos.

Tanto en las plaquetas intactas como en las membranas de plaquetas, existen lugares de unión para benzodiazepinas que muestran una afinidad similar para el 3-H-diazepán. Sin embargo la unión máxima a las membranas, es menor que en las plaquetas intactas, lo que puede deberse a pérdida o inactivación de los lugares de unión por el pretratamiento al que se someten las plaquetas para la obtención de las membranas.

No se ha demostrado un sitio de unión para el Gaba en las plaquetas, ni dicho neurotransmisor modifica la unión del 3-H-diazepán a las mismas. Ello no descarta la existencia de un ligando endógeno para los receptores benzodiazepínicos periféricos plaquetarios, hasta ahora no identificado.

La función de estos receptores no está aclarada, aunque existen datos sugerentes de que intervienen en algunas situaciones fisiopatológicas. Así en ratas hiperlipémicas el diazepán inhibe la coagulación inducida por el detergente Tritón-WR-1339, aunque ello no permite aventurar hipótesis al respecto podría afectar a la agregación plaquetaria. Además en ratas hipertensas la unión máxima del 3-H-diazepán al receptor plaquetario

es mayor que en las normotensas, aunque en el riñón ocurre lo contrario. Estas diferencias en la unión máxima podrían representar una señal bioquímica para conocer el grado de evolución de la hipertensión espontánea, ya que en estos animales el número de lugares de unión benzodiazepínicos suele estar alterado (138, 166, 167, 184).

Cuando se perfunde el riñón con solución salina helada, se incrementa en un 35% la densidad de receptores benzodiazepínicos periféricos sin que se modifique su afinidad. Es probable que ello se deba a la eliminación de un inhibidor endógeno fijado a dichos sitios de unión. La densidad intrarrenal de los sitios de unión es muy alta en el cortex y es virtualmente nula en la médula, cálices menores y arteria renal (137, 146, 172).

Otra localización donde se han estudiado los receptores benzodiazepínicos periféricos es en las células cebadas, en las que tampoco se han encontrado lugares de unión para Gaba, ni se han identificado receptores opiáceos o colinérgicos muscarínicos, pero si receptores adrenérgicos (alfa y beta). Por otro lado el Gaba no modifica la unión del 3-H-diazepán a éstas células (ni a sus membranas ni a las células intactas), pretratadas o no con el detergente Tritón X-100. Como se sabe estas células poseen gránulos que contienen sustancias farmacológicamente activas como histamina, serotonina, SRS-A, factor quimiotáctico eosinófilo de la anafilaxis y factor activador de las plaquetas; cabría pues preguntarse que papel juega el receptor benzodiazepínico en la liberación de dichas sustancias y en los procesos mediados por ellas, aunque existe poca información al respecto (165).

También se han identificado receptores benzodia-

cepínicos periféricos en el corazón, principalmente en ambos ventriculos y septum interventricular, aunque su papel fisiológico es desconocido. El dipiridamol desplaza al diacepán marcado unido a dichos receptores y se postula que de esta forma el diacepán podría remedar las acciones del dipiridamol(que inhibe la recaptación de adenosina), potenciandose sus acciones. Se ha supuesto que a través de estos receptores, el diacepán ejerce efectos antiarrítmicos e incrementa el flujo coronario , lo que produce un aumento de la contractilidad cardiaca. No obstante en aurícula izquierda aislada de rata, se ha observado como el Ro-5-4684 (agonista de receptores benzodiazepínicos periféricos), muestra un efecto inotrópico negativo a la concentración de 3×10^{-6} M;siendo este efecto antagonizado por el PK-11195, antagonista de dichos receptores. Las benzodiazepinas con afinidad preferente por el tipo de receptor benzodiazepínico central, como el clonacepán, no muestran acción significativa en el modelo experimental citado (43, 168, 194).

En resumen, aunque los receptores benzodiazepínicos periféricos estén bien diferenciados de los centrales, su trascendencia clínica es todavia desconocida.

V MECANISMO DE ACCION DE LAS BENZODIACEPINAS

Las benzodiazepinas están relacionadas con gran número de neurotransmisores centrales: modifican el turnover de noradrenalina, serotonina y posiblemente el de acetil colina, de modo dosis dependiente y no modifican prácticamente el turnover de dopamina. Estas acciones pueden intervenir en los efectos sobre la conducta, ansiolíticos y sedantes que presentan estos compuestos (6, 50, 70, 79, 97, 144, 160).

También están relacionadas con la glicina, ya que presentan afinidad por los lugares de fijación de la estriquina, antagonista de receptores glicinérgicos (48).

No existe correlación entre la distribución de sitios de unión para el (3-H)-diazepán y los de dopamina, acetil colina y noradrenalina. Además diferentes neurotransmisores (dopamina, noradrenalina, histamina, serotonina, acetil colina, glicina, endorfinas, ácidos glutámico y aspártico) no tienen afinidad ni actividad intrínseca por el receptor benzodiazepínico. Por tanto las benzodiazepinas no actúan en su receptor a través de un neurotransmisor conocido (17, 18, 21).

Hoy se admite que la acción de las benzodiazepinas se ejerce a través de un aumento de la actividad de mecanismos inhibidores mediados por Gaba. El Gaba es un neurotransmisor inhibitor responsable de un buen número de inhibiciones postsinápticas (Fig. 20), en las que causa en general hiperpolarización de la membrana y también en la mayor parte de las inhibiciones presinápticas (Fig. 21), en las que suele producir despolarización neuronal (48, 57, 77, 183).

Existen muchas observaciones que corroboran la relacion Gaba-benzodiazepinas (22, 23, 60, 61, 62, 84,

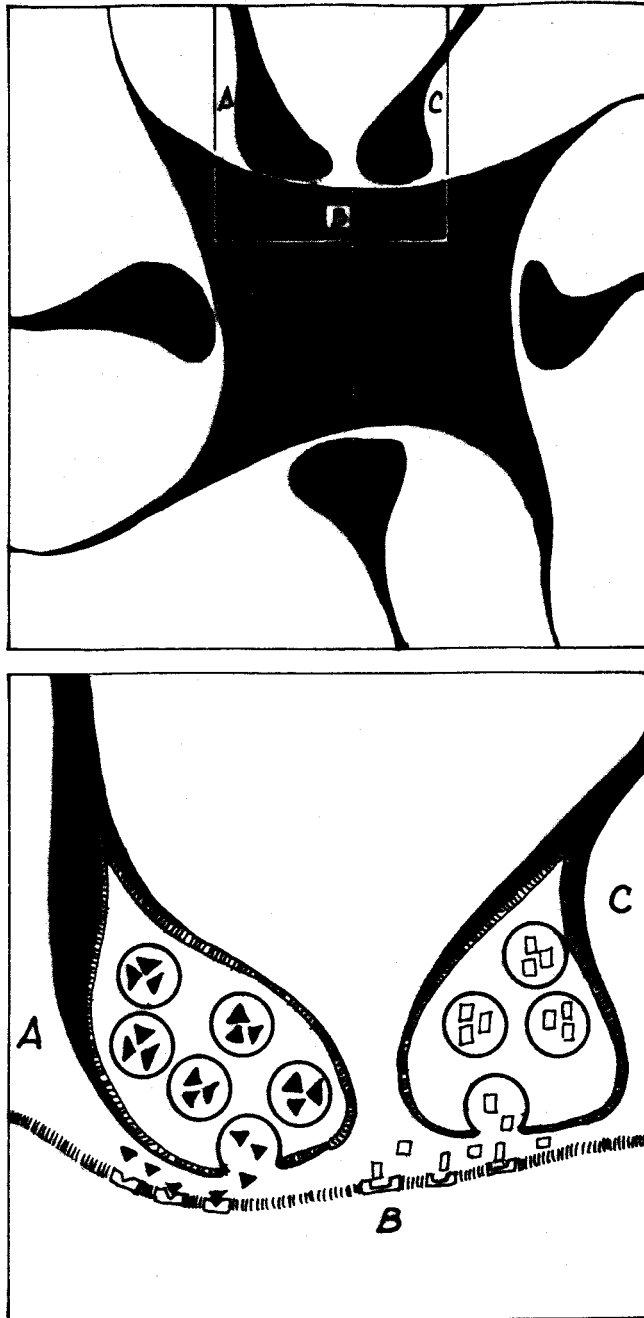


Fig. 20.-Inhibición postsináptica gabaérgica. El transmisor inhibitor liberado en la sinapsis por la neurona C, reduce la reactividad de la neurona B a la acción del neurotransmisor excitador liberado por la neurona A. (77)

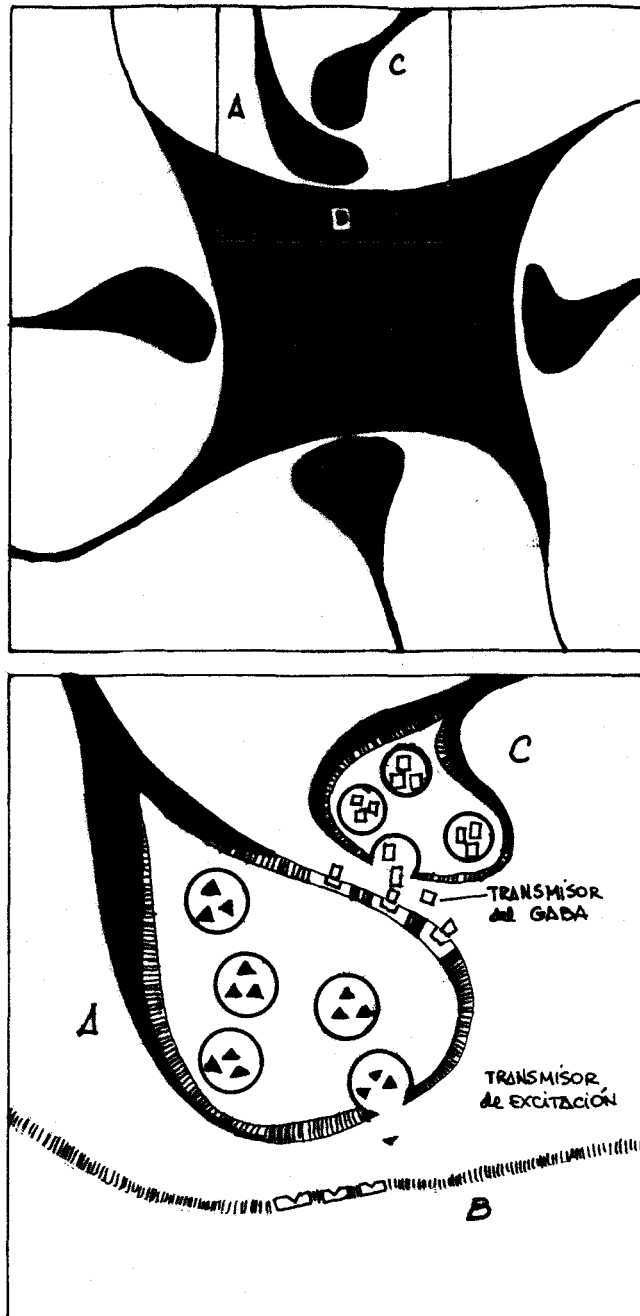


Fig. 21 .- Inhibición presináptica gabaérgica. El transmi-
sor inhibitor liberado por la neurona C, hace
que el potencial de acción de la neurona A li-
bere menor cantidad de neurotransmisor de ex-
citación, por tanto el impulso excitador de la
neurona B es menor. (77)

107, 143, 161, 182) :

- las dosis de otros neurotransmisores necesarias para antagonizar las convulsiones provocadas por compuestos que inhiben la transmisión gabaérgica (INH, bicuculina, picrotoxina), son varias veces superiores a las de las benzodiacepinas.

- la picrotoxina, antagonista gabaérgico, inhibe la capacidad de las benzodiacepinas para facilitar las pruebas de castigo en las ratas tras una situación conflictiva.

- las benzodiacepinas incrementan la inhibición presináptica inducida por Gaba en la médula espinal.

- las benzodiacepinas ejercen una acción agonista sobre los receptores gabaérgicos postsinápticos, tanto en diversos núcleos del cerebro como en cultivos celulares, aunque aquí la actividad es menor. En efecto en neuronas y en células de la glía aisladas del hipocampo de ratas, no se detectó incremento de la unión del 3-H-diacepán en presencia de Gaba.

- las acciones de las benzodiacepinas se bloquean con bicuculina y picrotoxina, antagonistas de Gaba. También los inhibidores de la síntesis de Gaba (tiosemicarbazona) previenen sus efectos, mientras que los inhibidores de su degradación (ácido amino-oxo-acético) los aumentan.

No obstante algunos trabajos demuestran que ni el Gaba, ni sus agonistas o antagonistas poseen acción directa sobre el receptor benzodiacepínico. Incluso se ha observado que en algunas localizaciones (neuronas del núcleo vestibular lateral y células de Purkinje), las benzodiacepinas pueden ejercer un efecto antagonista sobre la neurotransmisión gabaérgica (21, 161).

El receptor benzodiacepínico se comporta como un mecanismo amplificador o de retroalimentación positiva

para la unión neuronal del Gaba liberado por su receptor y conviene aclarar que esta acción primaria de las benzodiazepinas sobre la transmisión gabaérgica, no excluye la posibilidad de que también puedan activar mecanismos catecolaminérgicos, colinérgicos, glicinérgicos o serotoninérgicos, que podrían explicar parte de sus acciones psicofarmacológicas.

Podemos resumir diciendo que las benzodiazepinas actúan de modo semejante al aminoácido inhibitor Gaba en todos los lugares y con los mismos mecanismos con los que éste ejerce sus acciones, es decir facilitan la transmisión gabaérgica y ello pueden efectuarlo de distintas maneras (62, 66, 107):

- por activación directa del receptor gabaérgico post-sináptico.
- incrementando la liberación presináptica del Gaba.
- inhibiendo la eliminación del Gaba.
- por una alteración en la respuesta postsináptica del Gaba.

La ausencia de efectos gabamiméticos directos de las benzodiazepinas excluye la primera posibilidad, lo cual significa que las acciones de las benzodiazepinas son de tipo gabaérgico indirecto. Tampoco la potenciación de la respuesta gabaérgica por benzodiazepinas parece ser debida al incremento de la liberación presináptica del neurotransmisor o al bloqueo de su recaptación o de su catabolismo. En efecto el diacepán no parece afectar la actividad de la GAD (descarboxilasa del ácido glutámico) o de la Gaba-transaminasa, enzimas relacionadas con la síntesis y el catabolismo del Gaba, respectivamente.

En conclusión, las benzodiazepinas modulan la transmisión gabaérgica, pero no incrementan los niveles de Gaba, ni bloquean su recaptación, ni inhiben su meta-

bolismo, ni facilitan su liberación, por lo que se puede descartar su acción presináptica. De cualquier forma, aunque su sitio de acción sea postsináptico, no son agonistas gabaérgicos propiamente dichos, ya que su acción gabamimética solamente se aprecia si hay transmisión gabaérgica. Eso significa que actúan postsinápticamente sobre el receptor de Gaba de manera indirecta, facilitando específicamente su activación. Ello implica que las benzodiazepinas deban reconocer un lugar específico próximo al receptor de Gaba y activarlo, de lo que resultaría un incremento de la afinidad entre el Gaba y su receptor(66, 97, 189).

En efecto diversos estudios han puesto de manifiesto una íntima relación entre los lugares de unión para benzodiazepinas y el Gaba. En membrana de corteza cerebral, la adición de Gaba o sus agonistas incrementa la unión del diacepán a su sitio de fijación por un aumento de la afinidad del receptor benzodiazepínico sin que se modifique su número; sin embargo otros aminoácidos neurotransmisores (glicina, glutamato, aspartato) no modificaron la unión de esta benzodiazepina. Dicho incremento fue bloqueado por los antagonistas de Gaba como la bicuculina(7, 154).

Pretratando las membranas cerebrales con ácido amino oxoacético (inhibidor del metabolismo de Gaba) también se eleva la unión específica del diacepán, lo que corrobora las observaciones anteriores. No obstante cuando los receptores gabaérgicos se exponen crónicamente a la acción de las benzodiazepinas, se ha reportado una subsensibilidad funcional del Gaba (67, 100).

Igualmente se obtienen aumentos en la unión de las benzodiazepinas a sus receptores tratando previamente los animales vivos con análogos de Gaba(muscimol,

baclofen y gamma-butirolactona), siendo bloqueado tales efectos por la bicuculina. Señalemos por último que se ha observado una correlación entre los datos obtenidos "in vivo" e "in vitro". Los datos "in vivo" proporcionan evidencia adicional de que el sistema gabaérgico y los sitios de unión para benzodiazepinas están funcionalmente unidos (32).

En estudios sobre el desarrollo ontogénico de los receptores de alta afinidad de benzodiazepinas y de Gaba, se comprobó que tienen una localización celular diferente y que esa afinidad elevada se desarrolla independientemente. No obstante el incremento de la unión de las benzodiazepinas a sus receptores producido por Gaba, fue paralelo al desarrollo de los mismos (176).

También la autorradiografía demuestra que la mayoría de los receptores benzodiazepínicos están acoplados a un receptor gabaérgico. Varias observaciones sugieren que el receptor benzodiazepínico puede ser una parte del complejo supramolecular del receptor gabaérgico, incluyendo dicho complejo al receptor de Gaba, una proteína moduladora o Gaba-modulina, la proteinkinasa, el ionóforo del cloro y el receptor benzodiazepínico. No obstante, otros datos inducen a pensar que ello no ocurre en todos los receptores benzodiazepínicos, la razón estriba en que existen al menos dos tipos de receptores benzodiazepínicos (22, 37, 58, 66, 69, 90, 107, 164, 176):

- receptores no acoplados al receptor de Gaba o receptor benzodiazepínico I, que parece mediar la acción ansiolítica de las benzodiazepinas y en el que la existencia de histidina es imprescindible para su actividad.

- receptores acoplados al receptor de Gaba o receptor benzodiazepínico II, que se piensa que media la seda-

ción que producen las benzodiazepinas y en el que la histidina no juega un papel decisivo en su actividad.

Otros autores piensan que existe una multiplicidad de receptores Gaba: de alta y baja afinidad, presinápticos y autoreceptores no sensibles a bicuculina. Esta idea es contraria a otros trabajos que apoyan la existencia de un solo tipo de receptores de Gaba en membranas neuronales, siendo este de alta afinidad. Investigaciones posteriores evidencian que pueden existir dos sitios diferentes de fijación de Gaba en las membranas neuronales, uno de alta afinidad y distribución homogénea (sitio de unión Gaba II) y otro de relativa baja afinidad y distribución heterogénea (sitio de unión Gaba I). Las benzodiazepinas parecen actuar selectivamente en el receptor tipo II cuya proporción en relación con el tipo I es de 10:1 (97, 124, 129, 176).

La hipótesis de la existencia de varios tipos de receptores de Gaba, se comprueba de otras maneras como en el estudio de las diferencias de sensibilidad que presentan dichos receptores a la inactivación por la temperatura, que sugiere la existencia de múltiples variedades de los mismos (92, 104, 132).

Por el contrario otros estudios, aunque anteriores, suponen que sólo los receptores de baja afinidad de Gaba están acoplados a los receptores benzodiazepínicos y estos modulan la sensibilidad de aquellos. Corroborando lo anterior, se ha observado que el diazepam incrementa la afinidad del Gaba unido a lugares de baja afinidad sin modificar los de alta afinidad (32, 66, 151).

Finalmente se acepta que los sitios de unión de Gaba y benzodiazepinas son dos entidades diferentes acopladas a un ionóforo común y funcionalmente relacionadas (Fig.22). Cuando el receptor de Gaba se ocupa,

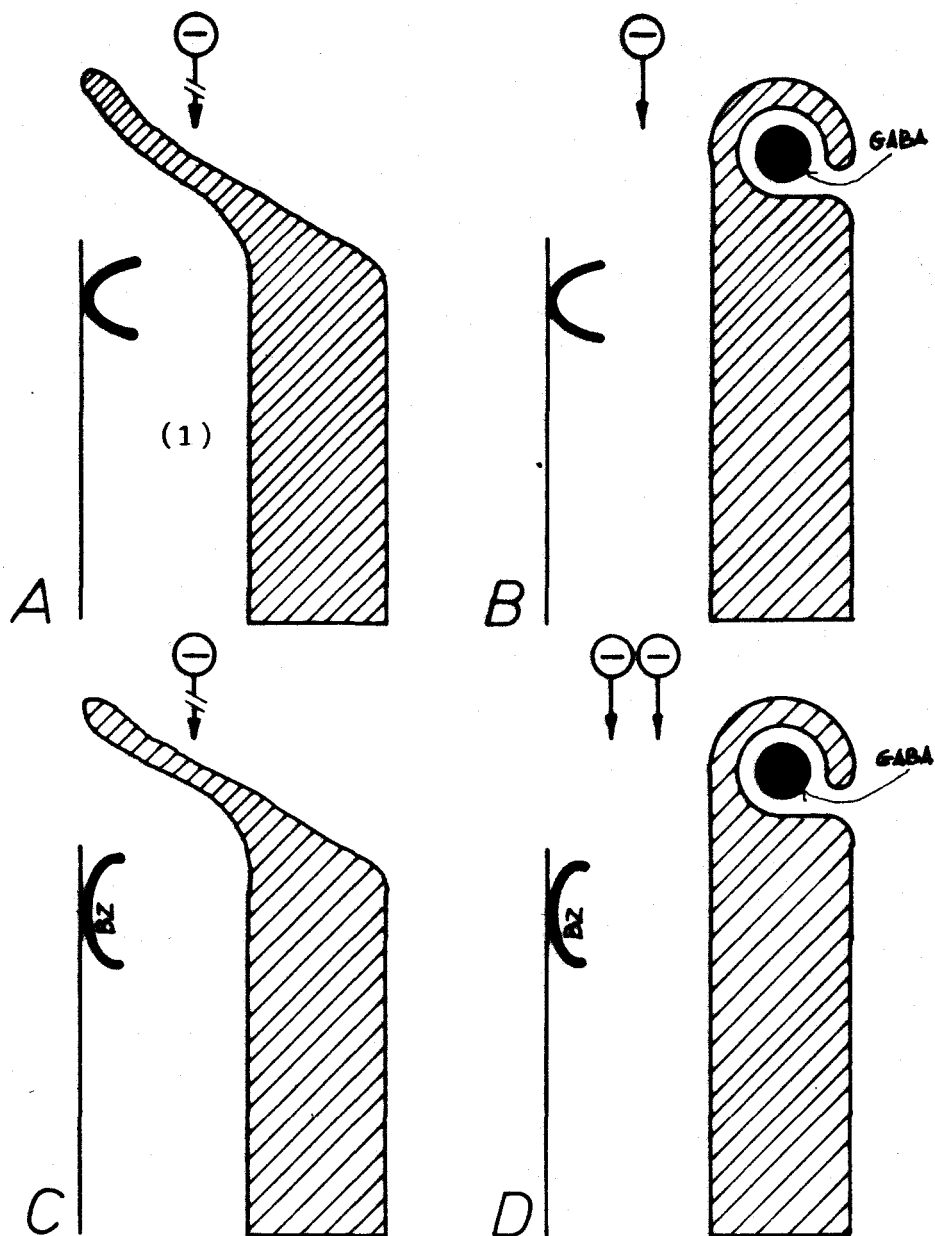


Fig. 22.-Modelo simplificado para describir la interacción entre benzodiazepinas (BZ) y GABA. A(receptores no ocupados), B (receptor de Gaba activado), C (receptor de benzodiazepinas ocupado), D(ambos tipos de receptores ocupados). (1) canal del cloro. (66)
(Explicación en texto)

ocurren cambios conformacionales en el ionóforo que permiten el aflujo de iones negativos (Cl^-), resultando así una hiperpolarización celular e inhibición de su actividad. Si se ocupan simultáneamente ambos lugares de unión, se facilitará la hiperpolarización anterior (54, 62, 66, 97, 104).

Existen también evidencias experimentales de que las benzodiazepinas facilitan la transmisión gabaérgica por desplazar del sitio de unión del Gaba a la Gaba-modulina. La Gaba-modulina es un polipéptido, con peso molecular de 1.500 daltons, presente en el complejo del receptor Gaba y que modula la actividad de dicho receptor. Dicha modulación es de tipo inhibitorio, ya que al desplazarse abre el ionóforo del cloro, permitiendo la entrada de dicho ión al interior de la neurona e hiperpolarizando la célula. Este efecto se ejerce tanto sobre el receptor de Gaba como, indirectamente, sobre el de benzodiazepinas (Fig.23) (23, 36, 86).

También se ha propuesto que el receptor benzodiazepínico formaría parte de una proteína localizada en superficie del receptor para el Gaba, siendo la beta-carbolina uno de los posibles ligandos que se ha propuesto para la interacción del receptor benzodiazepínico y el receptor de Gaba (107).

Un ejemplo que permite comprender la unión de benzodiazepinas a este complejo asociado al receptor gabaérgico, es lo que ocurre con la molécula de hemoglobina y las modificaciones que sufre su estructura en presencia o ausencia de O_2 . La hemoglobina está formada por cuatro cadenas proteicas diferentes, plegadas en el interior de cuatro subunidades distintas que envuelven a los grupos hemo conteniendo átomos de hierro (Fig.24). Estamos pues ante un tetramero con dos cadenas dobles de distintas secuencias denominadas (alfa

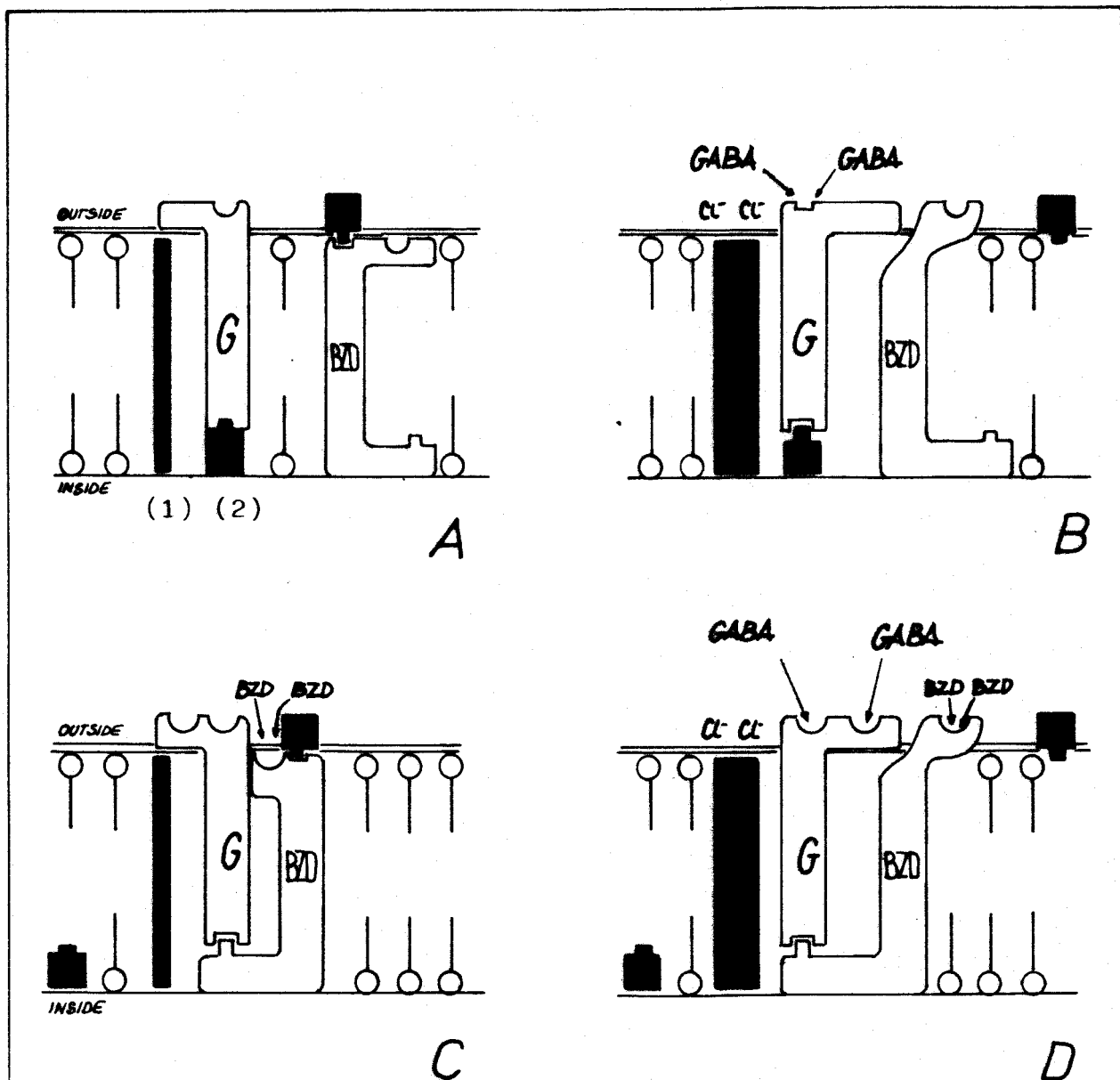


Fig. 23.- Modelo hipotético de la acción de las benzodiazepinas en "la unidad reguladora del receptor de Gaba". A. Estado de reposo. B. Estimulación del receptor de Gaba y apertura del canal del cloro. C. Estimulación del receptor benzodiazepínico e incremento de afinidad del receptor de Gaba. D. Estimulación del receptor gabaérgico y benzodiazepínico: apertura del canal del cloro e incremento de afinidad de ambos tipos de receptores. (36)

G = Gaba BZD = Benzodiazepina

(1)=canal del cloro (2) = Gaba-modulina

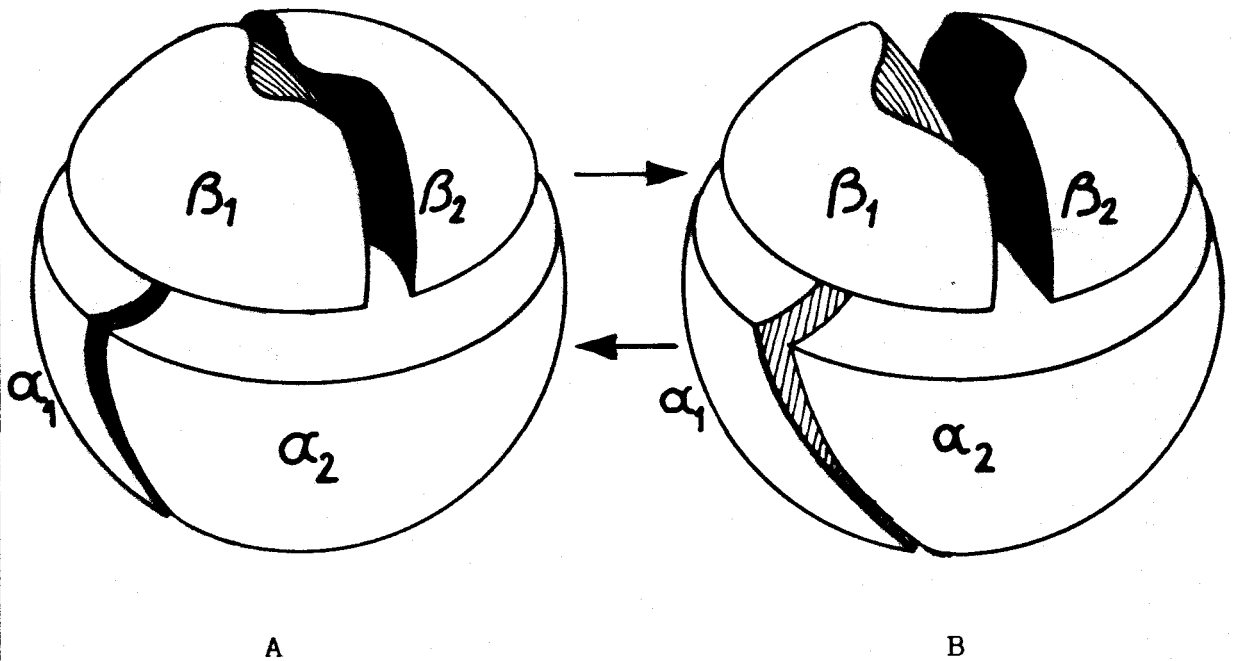


Fig. 24 .- Estructura de la oxihemoglobina con las cuatro unidades estrechamente unidas (fig. A).y de la carboxihemoglobina, con "grietas" entre las subunidades beta, para el DFG (107).

1 y alfa 2) y beta (también 1 y 2). Estas cuatro subunidades se muestran estrechamente unidas en presencia de oxígeno cuando este se combina con cada átomo de hierro (oxi-hemoglobina). En caso contrario, es decir, en ausencia de oxígeno las subunidades se "despegan" (más la beta) y se reduce la afinidad de los átomos de hierro para el oxígeno que es liberado (deoxi-hemoglobina). El espacio existente entre las dos subunidades beta de la deoxi-hemoglobina, constituye un molde para la molécula del 2-3-difosfoglicerato (DFG). Este constituyente de los eritrocitos se une a la proteína intercalada estabilizando la deoxi-hemoglobina y reduciendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. En presencia de oxígeno, el lugar de acción del DFG queda enmascarado entre las subunidades beta de la oxihemoglobina. Existe un equilibrio dinámico entre la conformación espacial de la oxihemoglobina y la deoxihemoglobina en el que el DFG actúa como factor.

Los receptores benzodiazepínicos, dependiendo del estado conformacional del receptor gabaérgico pueden presentarse de dos modos : al descubierto o enmascarados. Ello explicaría la facilidad con que se modifican en algunas circunstancias : electroshock, administración aguda de diazepam y ácido kaínico, trastornos emocionales y corea de Huntington (107).

Por otra parte, se han estudiado los efectos de Gaba y cloro y la asociación de ambos sobre la afinidad de diversas sustancias (benzodiazepinas, ligandos endógenos, beta-carbolinas, CL-128872) frente al receptor benzodiazepínico, en el que se supone la existencia de tres sitios de unión (a, b y c) hacia los que tienen afinidad específica diferentes compuestos. Según los efectos del Gaba e ión cloro los ligandos se clasifican en cuatro grupos cuando la unión al receptor se realiza

a 0° C. (Fig. 25):

- Tipo I o tipo diacepán que incluiría : diacepán, nitracepán, etazolán y medacepán, cuya afinidad aumenta tanto con Gaba como con cloro.

- Tipo II o CL-218872 que comprende : CL-218872, inosina y dos benzodiazepinas (oxacepán y loracepán). La afinidad es aumentada por Gaba pero no por cloro.

- Tipo III o beta-carbolina que englobará : beta-carbolina, harmano, harmina y hamalina. El cloro incrementa la afinidad fundamentalmente de los tres últimos y discretamente la de la primera, disminuyendo el Gaba el efecto del cloro.

Tipo IV o inactivo, del que forman parte la nicotinamida y el pentilenetetrazol. Ni el Gaba ni el cloro influyen en esta unión.

Sólo los compuestos que pueden unirse al lugar "b" parecen poseer efectos benzodiazepínicos, los restantes compuestos muestran efectos antagonistas. Otros autores defienden la existencia de dos sitios de unión en el receptor benzodiazepínico, uno para agonistas y otro para antagonistas; el lugar "b" posiblemente interactuaría con el receptor de Gaba y el "c" podría ser modificado por el ionóforo del cloro.

Cuando la unión de los ligandos al receptor se realiza a 37 ° C., los efectos del Gaba sobre la afinidad por el receptor benzodiazepínico persisten, decreciendo en forma importante el efecto activador del cloro.

Así pues, la afinidad de las benzodiazepinas o de los compuestos tipo benzodiazepínicos, es incrementada por Gaba (tipo I y II), mientras que la de sustancias con propiedades antagonistas de las benzodiazepinas es aumentada sólo por cloro o no es modificada (64, 99, 104, 107).

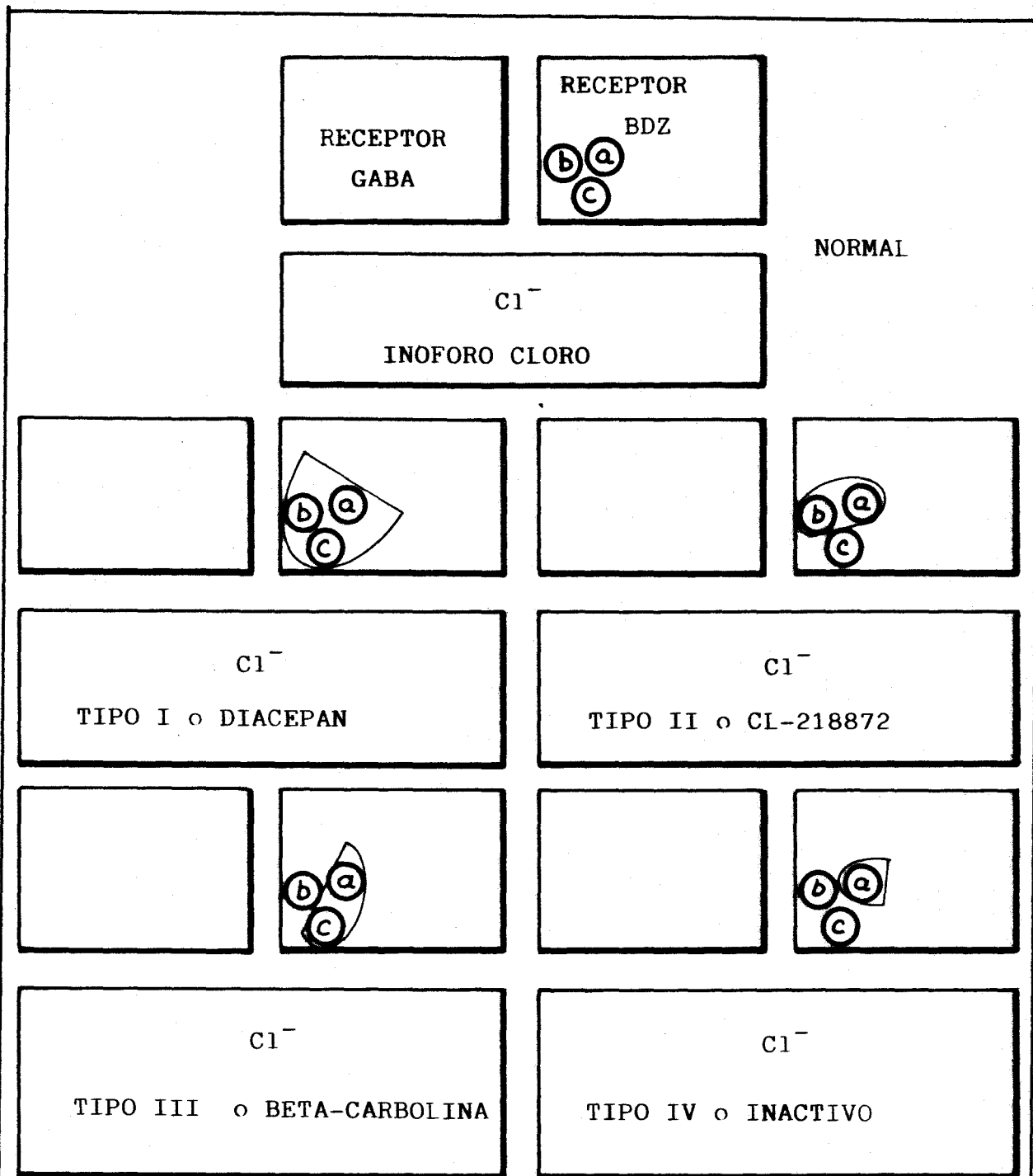


Fig. 25.- Esquema postulado para la unión de cuatro tipos de ligandos al receptor benzodiazepínico (107).

Diferentes trabajos explican la relación Gaba-benzodiazepinas-ionóforo del cloro, por la existencia de un complejo supramolecular en el que habría una unión funcional entre estos tres componentes (Fig. 26) (37, 44, 59, 128, 131, 142, 152, 158):

- En este complejo que puede ser solubilizado por Lubrol, se distingue una fracción de peso molecular 61.000, que corresponde al sitio de unión para benzodiazepinas y otra de peso molecular 185.000, que es el lugar de unión para la picrotoxina.

- El receptor de Gaba incluido en el complejo, cuando es ocupado por Gaba, sufre un cambio conformacional que facilita la apertura de los canales de cloro. Así los iones cloruro penetran en el interior de la célula y éstas adquieren un potencial eléctrico más negativo que las hace más difíciles de excitar. De esta manera la acción del Gaba es una inhibición neuronal.

- Cuando las benzodiazepinas ocupan sus receptores, no hay modificaciones en los canales de cloro ni en los receptores de Gaba; sin embargo la adición de Gaba a una neurona pretratada con benzodiazepinas, aumenta la entrada de cloro al interior de la célula. Ello no se debe a una apertura más prolongada de los canales de cloro, sino a un incremento en la frecuencia de apertura.

- Las pirazolopiridinas SQ-20009 (etazolato), SQ-65396 (cartazolato) y ICI-136753 (tracazolato), con acciones ansiolíticas en animales, elevan la afinidad del receptor benzodiazepínico del complejo en presencia del ión cloro, mientras que la bicuculina revierte totalmente dicho efecto. Las pirazolopiridinas incrementan la unión del 3-H-Gaba al complejo, favoreciendo la asociación entre los sitios de reconocimiento para Gaba y un ionóforo del cloro; por tanto la unión es mayor si se emplean simultáneamente pirazolopiridinas y agonistas

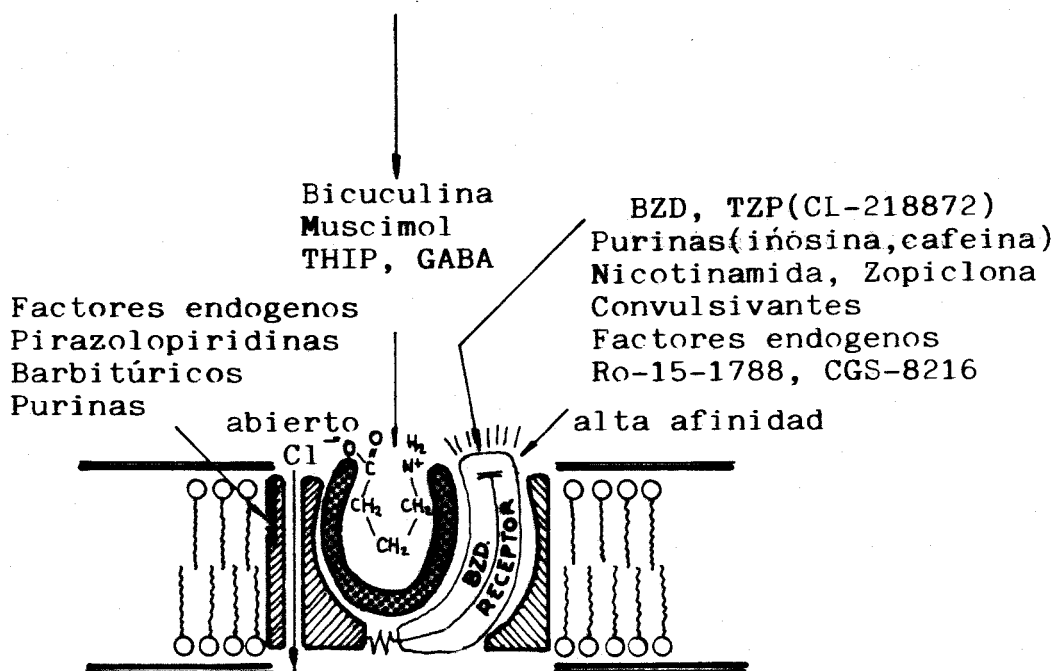
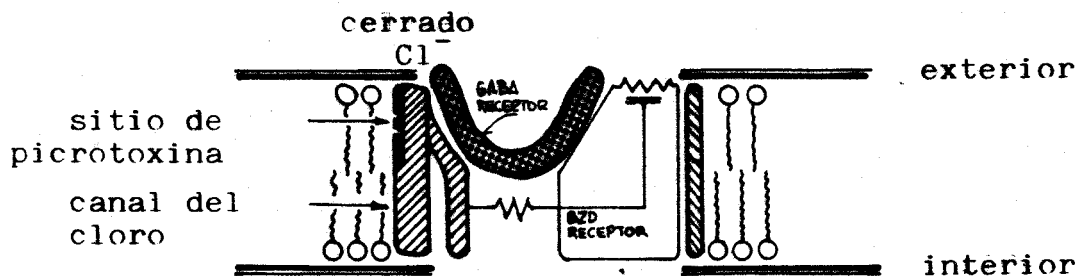


Fig. 26 .- Diagrama de un complejo formado por un receptor gabaérgico, un receptor benzodiacepínico y el ionóforo del cloro, flotando en la doble capa lipídica de la membrana plasmática. Se señalan distintos fármacos y agentes que probablemente interaccionen con el complejo.
(26)

gabaérgicos, lo que sugiere diferentes sitios de unión aunque interrelacionados. Las pirazolopiridinas no incrementan la unión del 3-H-diacepán a la fracción de peso molecular 61.000, pero inhiben la unión de la 3-H-dihidro-picrotoxina (análogo de la picrotoxina) a la fracción de peso molecular 185.000. Ello demuestra que su relación con el complejo supramolecular del receptor gabaérgico se realiza a través del sitio de unión para la picrotoxina (9, 95, 134, 171).

- El pentobarbital incrementa aún más que las pirazolopiridinas la unión de las benzodiazepinas a su receptor, aumentando esta unión en presencia de Gaba. El pentobarbital actúa uniéndose al sitio sensible para la picrotoxina y al igual que las pirazolopiridinas inhibe también la unión de la 3-H-dihidro-picrotoxina a dicho sitio de unión. Esta acción se realiza probablemente por una interacción con los canales de cloro, cuya apertura aumenta (de 25 a 90 mseg.) por los barbitúricos de tipo hipnótico. Algunos de los efectos tóxicos de estos fármacos, se explican a través de un efecto directo sobre estos canales de cloro.

La observación de que el Tritón X-100, inhibe la unión de la picrotoxina a su sitio específico y con ello reduce la unión de las benzodiazepinas y Gaba a los suyos respectivos, indica que las acciones de estos compuestos estarían mediadas por el sitio de unión para picrotoxina. Por tanto el pentobarbital incrementa la afinidad de las benzodiazepinas y potencia las acciones del Gaba a través del ionóforo del cloro por desplazamiento de la 3-H-dihidro-picrotoxina, acciones que son antagonizadas parcialmente por la bicuculina y picrotoxina (4, 5, 46, 170).

- En relación a su acción sobre el complejo supramolecular, hay entre pirazolopiridinas y el pento-

barbital algunas diferencias :

. la bicuculina antagoniza totalmente el efecto de las pirazolipiridinas y solo parcialmente el del pentobarbital. El incremento que produce el pentobarbital en la unión de las benzodiazepinas a sus receptores específicos, es superior al de las pirazolopiridinas; ello sugiere que el pentobarbital podría actuar sobre otro sitio del complejo o sobre una subpoblación de receptores benzodiazepínicos no acoplados alostericamente al receptor de picrotoxina.

Otros agentes tienen también efectos sobre el complejo supramolecular Gaba-benzodiazepinas-inonóforo del cloro (26, 128, 188):

- Los antagonistas Ro-5-4864, Ro-15-1788 y CGS-8216, junto con los ligandos tipo beta-carbolinas y amino-gamma-carbolina.
- El CL-218872 y la zopiclona, cuyo perfil clínico y farmacológico es muy similar al de las benzodiazepinas y actúan sobre su receptor.
- Los agonistas y antagonistas de Gaba.
- Algunos ansiolíticos, barbitúricos y determinados inhibidores de la fosfodiesterasa, que aumentan la conductancia de los canales del cloro.
- El alcohol como los barbitúricos y benzodiazepinas, aumenta el desplazamiento del 3-H-diazepán unido al receptor para la picrotoxina. Este incremento es dosis-dependiente y máximo a la concentración de 30 mM, siendo bloqueado por bicuculina y picrotoxina. También facilita la transmisión gabaérgica en Sistema Nervioso Central, ya que modifica la respuesta a glicina, serotonina y dopamina. Es posible que algunos efectos centrales del alcohol como la ansiolisis, relajación muscular y la sedación, se deban a esta acción facilitadora. Otros alcoholes presentan los mismos efectos, aunque

en menor proporción :

etanol > metanol > isopropilalcohol > propanol-1

El tratamiento agudo con alcohol incrementa la densidad de los sitios de unión para Gaba, no apareciendo tolerancia a este efecto en el tratamiento crónico. Los gabamiméticos incrementan los efectos del etanol sobre la conducta en la intoxicación aguda por etanol y en el síndrome de abstinencia, mientras que los antagonistas gabaérgicos disminuyen tales efectos (45, 170).

VI BENZODIACEPINAS Y LIGANDOS ENDOGENOS

Se discute la existencia y naturaleza de ligandos endógenos para los receptores benzodiazepínicos como existen para los receptores opiáceos. El ácido etil-éster-beta-carbolina-3-carboxílico (B-cc) obtenido en pequeñas cantidades de orina humana, es la sustancia orgánica más potente capaz de interactuar con el receptor benzodiazepínico. No obstante ni el B-cc, ni ningún derivado suyo se ha identificado en el Sistema Nervioso Central.

La hipoxantina, inosina y nicotinamida, presentes en cerebro, tienen una afinidad por el receptor benzodiazepínico cien mil veces menor que el B-cc, por lo que no se pueden considerar ligandos endógenos para estos receptores.

También se han propuesto como posibles ligandos endógenos para estos receptores, la nefentina que inhibe la fijación del diazepán y el tromboxano A_2 , pero falta información que permita asegurarlo (1, 26).

VII ANTAGONISTAS DE RECEPTORES BENZODIACEPINICOS

El ácido etil-ester-beta-carbolina-3-carboxílico, no tiene acciones anticonvulsivantes ni ansiolíticas como las benzodiazepinas. Las imidazobenzodiazepinas (RO-5-1788) y las pirazoloquinolinas (CGS-8216), tienen un comportamiento semejante, impidiendo las acciones sedantes, anticonvulsivantes y ansiolíticas de las benzodiazepinas; por lo que con reservas pueden calificarse como antagonistas de los receptores benzodiazepínicos.

Su importancia clínica es desconocida por el momento. Podrían ser de utilidad en pacientes de cirugía menor excesivamente sedados por benzodiazepinas o para detectar la tolerancia a estos fármacos si aparece síndrome de abstinencia. En sobredosificación por benzodiazepinas probablemente no serían útiles, ya que la naturaleza competitiva de la interacción requeriría dosis muy elevadas del antagonista, que podrían producir efectos indeseables propios (14, 26, 97, 114, 174).

Otros ligandos de los receptores benzodiazepínicos y de estructura beta-carbolínica recientemente descubiertos, como el metil 6,7 dimetoxi-4-etil-beta-carbolina-3-carboxilato o DMCM y el metil-beta-carbolina-3-carboxilato o B-CCM, que producen convulsiones en ratones y ratas, también se comportan como antagonistas.

Finalmente los derivados de amino-gamma-carbolinas, 3-amino-1-4-dimetil-5H-pirido-(4-3)-píndol o Trp-P-1 y 3-amino-1-metil-5H-pirido-(4-3)-indol o Trp-P-2, antagonizan : el primero, el efecto supresor del diazepam sobre las convulsiones y muerte producidas por el pentileno-tetrazol y el segundo, precipita ataques convulsivos y muerte en animales.

Se comprueba por tanto, que sobre un solo tipo de receptor benzodiazepínico actúan dos clases de agentes con efectos opuestos, los ligandos convulsivos y las benzodiazepinas. Como es lógico los antagonistas de los receptores benzodiazepínicos, inhiben los efectos de ambas clases de ligandos ocupando simplemente el receptor y obstruyendo el acceso a otros ligandos. Al contrario que los agentes similares a las benzodiazepinas que incrementarían la neurotransmisión gabaérgica, los ligandos convulsivos la reducirían (86, 147).

VIII ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LAS BENZODIACEPINAS.

Aunque está muy extendido el concepto de que existen benzodiazepinas específicamente hipnóticas, ansiolíticas, etc., todas las benzodiazepinas presentan los mismos efectos terapéuticos y/o tóxicos; variando la potencia según el efecto que se considere. La razón de estas diferencias, aunque se manejan distintas hipótesis, se desconoce todavía.

A) Ansiolisis

La disminución o desaparición de la ansiedad, tanto reactiva como endógena, es uno de los principales efectos de las benzodiazepinas. La ansiedad es un mecanismo de defensa frente a determinadas situaciones o agresiones. Cuando esta respuesta es mayor que el estímulo que la origina o se mantiene de forma indefinida, es cuando se hace necesario el uso de fármacos ansiolíticos, de los que las benzodiazepinas son los más eficaces y los mejor tolerados.

A pesar del efecto ansiolítico, las 7-nitrobenzodiazepinas producen hiperactividad en ratones, ratas y monos (6).

Las benzodiazepinas disminuyen la agresividad en los animales de experimentación sin deteriorar las funciones neurológicas ni reducir la actividad general psicomotora. Las benzodiazepinas en las que predominan los efectos ansiolíticos (clordiazepóxido, diazepam), disminuyen la agresividad defensiva pero no incrementan la ofensiva o de ataque. También en algunas personas, las benzodiazepinas alivian la ansiedad, pero aumentan su irritabilidad y hostilidad. Este efecto, poco fre-

cuenta, predomina en casos de gran ansiedad y se cree que es debido a la desinhibición que producen (79).

Bajo los efectos de las benzodiazepinas, los animales realizan actos que suponen un premio aunque reciban un castigo; es decir, inhiben la tendencia que tiene el animal a contener la conducta conservadora ante el castigo, suprimiendo el miedo a una situación conflictiva. Los ansiolíticos por tanto favorecen la reaparición de la conducta que había sido suprimida por el castigo, quizás porque liberan la conducta de su inhibición. Todos estos efectos anticonflictivos, se impiden con el pretratamiento con bicuculina o tiosemicarbazida. En consecuencia, puede asegurarse que las acciones de las benzodiazepinas sobre la conducta, no pueden atribuirse a una depresión general del Sistema Nervioso Central(6).

El mecanismo de la acción ansiolítica consistiría en el estímulo del subtipo I de receptor benzodiazepínico. La acción ansiolítica de estos fármacos está localizada en el sistema límbico, fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala; aunque a altas dosis, alcanza a otras estructuras incluida la formación reticular. Su selectividad sobre el hipocampo, explica la capacidad de liberar la conducta previamente suprimida. Sin embargo es difícil correlacionar hipocampo y ansiolisis, a pesar de que la lesión bilateral del hipocampo produce modificaciones de la conducta similares a las observadas con el uso de las benzodiazepinas.

La acción de las benzodiazepinas sobre otras áreas cerebrales, podría deberse a las conexiones del hipocampo con esas áreas y/o a la falta de selectividad de la acción a altas dosis. Ello explicaría su capacidad de bloquear las respuestas vegetativas y otras acciones conductuales (6, 62, 78).

B) Hipnosis

Todas las benzodiazepinas tienen acción hipnótica, aunque a dosis superiores a las ansiolíticas, por su efecto depresor sobre la formación reticular activadora ascendente.

Los efectos sobre el electroencefalograma y las etapas del sueño son los siguientes (29, 49, 61, 79, 80, 112, 115, 123):

- En el E.E.G., reducen el ritmo alfa y aumentan el beta. Estos efectos son sobretodo evidentes en las áreas frontales y rolándicas. También disminuyen la amplitud de los potenciales evocados, acortando la latencia del primer pico y prolongando la del máximo tardío. Existe tolerancia a estos efectos a los pocos días de iniciar la administración de las benzodiazepinas.

- La acción de las benzodiazepinas sobre las fases del sueño se conoce a través de los estudios realizados casi siempre en sujetos sanos, no existiendo apenas estudios en pacientes neuróticos, depresivos, esquizoides o en pacientes efectos de otros procesos que cursan con insomnio.

- No todas las benzodiazepinas producen los mismos efectos sobre las fases del sueño, ignorándose si tales diferencias son farmacocinéticas o farmacodinámicas. Todas sin embargo, producen un sueño profundo y reparador, siendo más evidente en los insomnes, en los que puede llegar a triplicarse la duración del sueño. Se desconoce el mecanismo de esta acción.

- La mayoría de las benzodiazepinas disminuyen la latencia del sueño (sobre todo la primera vez que se usan) y el número de despertares.

- La duración de la primera etapa del sueño disminuye con el fluracepan, loracepán, nitracepán y temacepán,

pero aumenta con el clordiazepóxido, diacepán y oxacepán.

- La duración de la segunda etapa aumenta con todas las benzodiazepinas, mientras que la de las dos últimas etapas (3 y 4), se acorta. No obstante en pacientes neuróticos o con depresión endógena, el temacepán prolonga la etapa 3 y abrevia la 4. La disminución del sueño de la etapa 4 se acompaña de una reducción de los terrores nocturnos y pesadillas. Sin embargo, si la disminución es intensa, estos fenómenos pueden pasar a las horas de vigilia (pesadillas diurnas).

- Las benzodiazepinas aumentan la latencia del sueño REM, excepto el fluracepán que la acorta en algunos insomnes neuróticos o psicóticos. La frecuencia de los movimientos oculares durante el sueño REM disminuye. La duración total de sueño se acorta en general, no ocurriendo esto a dosis bajas.

- El triazolán disminuye el sueño REM en las primeras horas, pero el tiempo perdido se recupera después. Se desconoce si esto se debe a la aparición de tolerancia aguda o a una rápida eliminación del fármaco. Incluso con benzodiazepinas que reducen el sueño REM, el número de ciclos del mismo aumenta casi siempre. Algunas, en realidad, aumentan el sueño REM y la actividad rápida durante el mismo en esquizofrénicos, deprimidos, neuróticos, insomnes sin patología psiquiátrica y personas que trabajan alternativamente de día y noche.

- Las benzodiazepinas no disminuyen la relajación de los músculos cervicales que se produce al iniciarse el sueño REM, pero si la intensidad de los estallidos de taquicardia que se producen durante el mismo y las fluctuaciones de la resistencia cutánea que tienen lugar en la etapa 2. No obstante, pese al aumento de ciclos REM, el número de desplazamientos a las primeras

etapas (0 y 1) del sueño y la cantidad de movimientos corporales están disminuidos. A pesar de lo anterior, el efecto neto de las benzodiazepinas es un aumento del tiempo total de sueño.

- Se admite que la disminución del sueño REM por las benzodiazepinas tiene correlación con un mayor confort del sueño, mientras que su disminución producirá inquietud e insomnio. Ello contrasta con lo que ocurre en el sueño natural, donde la sensación de sueño profundo se correlaciona con la cantidad de SWS. El aumento de la actividad beta rápida inducido por estos compuestos, puede correlacionarse con la sensación al despertar de no haber descansado.

- Con el uso repetido de benzodiazepinas, los efectos sobre las diversas etapas del sueño se atenúan a las pocas noches, pero no desaparecen. Esta tolerancia es más pronunciada sobre el sueño REM que sobre el sueño no REM.

- Si tras varias semanas de empleo como hipnótico, el fármaco se suspende bruscamente puede haber un rebote de la cantidad y duración del sueño REM. La suspensión brusca de cloracepato, loracepán o nitracepán, causa una disminución de la latencia del sueño REM y un aumento de la duración del mismo. Con fluracepán y triazolán, el efecto rebote es leve, no modificándose el número de sueños REM.

C) Anticonvulsivante y antiepiléptica

Las benzodiazepinas tienen acción anticonvulsivante frente a diferentes estímulos y además una acción antiepiléptica específica frente a distintas clases de epilepsia. En concreto, el diacepán es eficaz en crisis y status epilepticus, mientras que el clonacepán y el nitracepán se emplean específicamente en encefalopatías epileptógena en pediatría.

No actúan sobre el foco epileptógeno, sino sobre la propagación subcortical de la descarga. Es decir, inhiben la propagación de los impulsos desde el foco.

El mecanismo íntimo de acción es un estímulo de los receptores benzodiazepínicos tipo I, que provoca un incremento de la inhibición gabaérgica de las neuronas del foco epileptógeno, con descenso del GMPc intracelular. Aumentan también la inhibición pre y postsináptica, acortando las postdescargas inducidas por el estímulo de la amígdala y del sistema límbico. Producen además una disminución del "turnover" de las catecolaminas y aumentan el contenido cerebral de serotonina y ácido hidroxí-indol-acético sólo durante los primeros días de su administración (30, 62, 124, 144).

D) Relajante muscular

Todas las benzodiazepinas reducen el tono muscular y esta acción ha sido utilizada en clínica en el tratamiento de diversos cuadros de hipertonia muscular, tanto por lesiones neurológicas como secundarias a alteraciones articulares, óseas o musculares.

La relajación muscular se debe a la acción depresora de las benzodiazepinas en distintos niveles del sistema nervioso:

- Formación reticular activadora descendente del tronco cerebral.
- Médula (inhibición presináptica que disminuye los impulsos que llegan a las neuronas).
- Cerebelo (sin confirmación definitiva).

La acción sobre la formación reticular se produce con dosis altas, que deprimen los demás efectos de las benzodiazepinas. Por ello, en la práctica, sólo con dosis que producen somnolencia se obtiene miorrelajación, lo que limita su empleo en clínica (62, 94).

Se ha referido sin embargo, que algunas benzodiazepinas producen hipotonía muscular sin interferir en la locomoción; el clonacepán a dosis no sedantes causa relajación muscular en el hombre, cosa que no ocurre con el diacepán y la mayoría de las benzodiazepinas (6).

E) Respiración

Dosis hipnóticas de triazolán y fluracepán, no tienen efectos sobre la respiración de sujetos normales. Dosis preanestésicas de las mismas benzodiazepinas, deprimen ligeramente la ventilación alveolar como resultado de la disminución del impulso hipóxico y no del hipercápnico (la respuesta al CO_2 no está afectada). No obstante, en algunos casos la depresión de la ventilación alveolar puede llegar a causar acidosis respiratoria.

A pesar de la levedad de los efectos respiratorios, el nitracepán y diacepán disminuyen la ventilación alveolar y la PO_2 en sanos y pueden causar narcosis por CO_2 en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (79).

F) Sistema cardiovascular

Experimentalmente, el diacepán no potencia la capacidad arritmogénica de la ouabaina, pero acorta el tiempo de aparición de la fibrilación ventricular y el de supervivencia. Ello indica que el diacepán en tratamientos agudos incrementa la toxicidad cardíaca de la ouabaina y lo hace de forma dosis-dependiente. La infusión de propranolol o la adrenalectomía inhiben el efecto del diacepán referido anteriormente. Lo que sugiere que el diacepán incrementa el contenido de catecolaminas de las suprarrenales y aunque el mecanismo es desconocido, se cree que aumenta la síntesis local de tirosin-hidroxilasa o de fenil-etanol-amina-N-metiltransferasa (28).

El tratamiento crónico con diacepán, también pro-

duce un incremento en el contenido de las catecolaminas adrenales y la posterior administración de ouabaina, produce una gran liberación de catacolaminas que son las responsables de la alta incidencia de arritmias (68).

En el hombre los efectos cardiovasculares de las benzodicepinas son de poca entidad, salvo en la intoxicación severa y no son iguales con todos los compuestos.

Dosis hipnóticas de triazolán y fluracepán no afectan las funciones cardiovasculares. Las dosis anestésicas de diacepán y loracepán disminuyen moderadamente el trabajo sistólico ventricular izquierdo, el volumen sistólico y el gasto cardiaco. Ello conduce a un descenso de la presión arterial sistólica y a un aumento reflejo de las resistencias periféricas y de la frecuencia cardiaca. El flunitracepán produce vasodilatación periférica que disminuye la presión arterial, el trabajo cardiaco y la postcarga, desencadenando un taquicardia refleja (79).

G) Analgesia

En ratones, sólo el diacepán es analgésico y además potencia los efectos antinociceptivos de los analgésicos narcóticos. Esta acción es revertida por picrotoxina y bicuculina (antagonistas gabaérgicos), lo que indica que es secundaria a la acción de las benzodiazepinas sobre la transmisión gabaérgica. Corroborando lo anterior, el muscimol (agonista gabaérgico), inhibe la hipermotilidad por morfina en el ratón.

En el hombre, el diacepán por vía intravenosa, produce analgesia transitoria y a diferencia de los barbitúricos no produce hiperalgesia. Las dosis altas de diacepán, potencian la acción analgésica de los opiáceos y parece que esta acción está mediada a través de mecanismos ansiolíticos (6, 103).

H) Memoria

Las benzodiazepinas interfieren la transferencia de información de la memoria de corto plazo a la de largo plazo. Por otro lado las dosis pequeñas de diacepán, provocan fallos en la memoria y el loracepán produce más amnesia que otras benzodiazepinas. Las dosis preanestésicas de benzodiazepinas deterioran la memoria con la consecuente amnesia retrógrada (6, 48).

I) Benzodiazepinas y efectos sobre la coagulación sanguínea y hemostasis

El ácido acetil-salicílico, probenecid y aminopirina desplazan al diacepán de su unión a las proteínas plasmáticas, por lo que incrementan sus efectos (34).

La administración simultánea de heparina y benzodiazepinas en pacientes sanos, produce un gran (150-250 %) y rápido (30-45 min.) aumento en la fracción libre del diacepán, clordiazepóxido y oxacepán, pero no en el loracepán. En voluntarios sanos en ayunas, estos incrementos que aparecen a los 90 segundos de la administración de la heparina y se normalizan a los 30-45 minutos, son pequeños pero significativos. En pacientes hepatópatas la respuesta es variable (51, 52, 177).

En enfermos tratados con diacepán, la administración de heparina duplicó a los 15 minutos la fracción libre y la de su metabolito, el nordiazepán, sin variar la concentración total de fármaco en sangre. Este efecto, que no ocurre "in vitro", sugiere un desplazamiento de la unión de las benzodiazepinas a las proteínas plasmáticas por un mecanismo indirecto. Posiblemente la heparina activa la lipoproteinlipasa, que a su vez incrementa la concentración de ácidos grasos, que son los que finalmente desplazan a las benzodiazepinas de sus lugares de unión a la albúmina. Por tanto, en base a lo anterior, el uso de heparina debe evitarse en tratamientos con diacepán, clordiazepóxido y oxacepán. Una precaución similar debe tenerse en pacientes con hipalbuminemia, en los que se encuentran elevados tanto la fracción libre, como la cantidad total de fármaco (91, 140).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado

que las benzodiazepinas no modifican las concentraciones plasmáticas de warfarina, ni su metabolismo hepático. Tampoco existen modificaciones en los estudios de coagulación entre los pacientes tratados con benzodiazepinas y los controles. Todo ello permite la administración simultánea y sin riesgo de benzodiazepinas y anticoagulantes orales (27, 65, 111, 121, 139, 145).

IX INDICACIONES TERAPEUTICAS DE LAS BENZODIACEPINAS

A) Tratamiento de la ansiedad

Constituye la principal indicación de estos fármacos. En los pacientes que presentan ansiedad, las benzodiacepinas no sólo alivian la misma sino también los variados síntomas subjetivos y objetivos que la acompañan.

No existe correlación entre los niveles plasmáticos de las benzodiacepinas y sus efectos terapéuticos, dada la gran variabilidad de respuesta de un paciente a otro en relación a las concentraciones plasmáticas. De todos modos con algunas benzodiacepinas se han señalado algunas relaciones (120):

. Para el diacepán :

- De 80 a 150 ng/ml, comienza la aparición de los primeros efectos.
- Entre 400 y 500 ng/ml, desaparece la ansiedad.
- De 900 a 1000 ng/ml, aparecen efectos indeseables como vértigos, ataxia, alteraciones de la memoria, perturbación de la actividad motriz, etc.

. En cuanto al flunitracepán:

- De 6 a 8 ng/ml, aparece hipnosis y entre 18 y 20 ng/ml, alteraciones de la memoria.

La acción de las benzodiacepinas sobre la ansiedad es tanto mayor cuanto más intenso es el síntoma.

El médico general prescribe más benzodiacepinas que el psiquiatra, ya que es quien más frecuentemente recibe a pacientes afectados de "tensión nerviosa", que no siempre mejorará con ansiolíticos puesto que no toda tensión nerviosa presupone ansiedad.

En el tratamiento de la ansiedad se debe tener

en cuenta su curso. En caso de ansiedad episódica, sólo se deben prescribir las benzodiazepinas en las fases activas. Cuando la ansiedad es permanente, el tratamiento debe mantenerse con la mínima dosis posible.

Sabiendo que todas las benzodiazepinas son ansiolíticas, se debe elegir aquella cuyo índice ansiolisis/sedación sea más favorable. Con las de acción corta (bromacepán, loracepán, oxacepán), existe menos peligro de sedación y acumulación, pero es necesario administrarlas dos o tres veces en el transcurso del día. Con las de acción prolongada (clordiazepóxido, diacepán), es suficiente una sola dosis al día, pero existe un mayor riesgo de acumulación y sedación. En personas de edad es conveniente emplear benzodiazepinas de acción corta (2, 6, 60, 62).

En la ansiedad no neurótica, como la de la depresión, las benzodiazepinas son poco útiles. Una benzodiazepina nueva, el "alprazolán", de vida media intermedia (10 a 12 horas) y que no presenta metabolitos activos, además de su acción ansiolítica ha mostrado ser de eficacia similar a la imipramina en el tratamiento de la depresión unipolar, por lo que puede estar particularmente indicada en pacientes con síntomas ansiosos/depresivos. Aunque en la esquizofrenia las benzodiazepinas son ineficaces, existen indicaciones para su empleo cuando la ansiedad es un síntoma de la esquizofrenia o cuando traduce el stress que siente el paciente por sufrir dicha enfermedad (47).

B) Tratamiento del insomnio

Para el uso de medicamentos en el tratamiento del insomnio debe tenerse en cuenta que (49, 96):

- La prescripción de un hipnótico somete al paciente a un riesgo de abuso, puede enmascarar las señales y los síntomas de un proceso patológico pernicioso y exacerbar peligrosamente una apnea del sueño no reconocida.
- Los fármacos no hipnóticos pueden ser superiores a los hipnóticos cuando el insomnio tiene una causa específica, verbigracia, la dextroanfetamina mejora el sueño en pacientes hipercinéticos o con enfermedad de Parkinson, los antidepresivos mejoran el insomnio que acompaña a las depresiones endógenas, en los trastornos del sueño presentes en pacientes psicóticos e hipertiroideos el tratamiento específico (fenotiacinas o haloperidol y antitiroideos respectivamente), puede producir una mejoría suficiente.
- No todos los pacientes con insomnio son candidatos para la terapéutica con hipnóticos; ya que el insomnio puede deberse a otras causas como la ingestión de alimentos o café a la hora de acostarse, ambiente climático inadecuado, colchón o almohadas defectuosos, etc.
- Por tanto, una vez decidido el uso de un hipnótico para el tratamiento del insomnio los parámetros claves en su selección son:
 - Posibilidad de que se abuse de su empleo.
 - Efectos de la abstinencia.
 - Potencial de tolerancia.
 - Interacción con otros fármacos.
 - Duración de su actividad.
- Las benzodiacepinas han sustituido a los barbitúricos

como medicamentos hipnóticos, ya que su toxicidad, tolerancia y dependencia son muy inferiores y no tienen actividad inductora enzimática.

- Cualquier benzodiacepina , a dosis conveniente, tiene capacidad hipnótica; la clave de su elección será saber cual va a producir un sueño más fisiológico, con menor repercusión en la actividad normal del día siguiente.

- La elección del fármaco depende también de que el paciente tenga dificultad para conciliar el sueño o para seguir durmiendo. En la primera situación la benzodiacepina aconsejable es una de acción breve, por ejemplo el triazolán. Los pacientes que precisen un hipnótico que surta efecto durante toda la noche, deben tratarse con las benzodiacepinas de vida intermedia como lormetacepán. No son recomendables las benzodiacepinas nitradas (nitracepán, flunitracepán, etc.) que producen con gran intensidad síntomas residuales al despertar. En los pacientes que además de padecer insomnio tienen un gran componente de ansiedad durante todo el día, las benzodiacepinas de acción prolongada (diacepán) serían las más eficaces (123, 162, 179).

- En la apnea del sueño están indicadas las benzodiacepinas que no son depresoras respiratorias como triazolán y fluracepán (79).

- En el tratamiento crónico del insomnio debe evitarse la medicación nocturna continua; así tras una buena noche de sueño, debe suspenderse el fármaco durante dos o tres días para minimizar los inconvenientes de su empleo mantenido.

C) Tratamiento de la epilepsia y otros síndromes convulsivos

Las benzodiazepinas con mayor potencia anticonvulsiva son diacepán, nitracepán y clonacepán, investigado y sintetizado éste último para el tratamiento de la epilepsia.

Aunque las tres son anticonvulsivantes de amplio espectro y por vía intravenosa, en el tratamiento del status epilepticus; el diacepán es el más empleado en esta situación. El clonacepán que es más potente, presenta el inconveniente de producir mayor depresión respiratoria y sedación (30, 144).

En otros tipos de epilepsia, incluyendo los cuadros psicomotores y los espasmos mioclónicos infantiles que son difíciles de tratar, se pueden prescribir las benzodiazepinas por vía oral; aunque en los espasmos mioclónicos no suele emplearse el diacepán oral.

En la hipertonia y convulsiones del tétanos, la benzodiazepina más usada es el diacepán intravenoso a dosis elevadas y aunque produce depresión respiratoria y pérdida de conciencia, ello no suele ser un problema, ya que este tipo de pacientes suele estar ingresado en unidades de vigilancia intensiva. Una vez conseguido el control de las convulsiones, si se mantienen las elevadas dosis iniciales, dadas las características farmacocinéticas del diacepán existe el riesgo de que aumenten mucho sus niveles plasmáticos, por tanto si la crisis ha remitido se debe disminuir la posología (35, 62, 158).

En la preeclampsia se utiliza el diacepán a dosis relativamente altas, pero por vía oral, con el fin de conseguir una buena sedación. En la eclampsia, la

benzodiazepina indicada es el diazepam intravenoso, comenzando con 5 mg y repitiendo la dosis hasta conseguir el control de la crisis (48).

D) Tratamiento de los espasmos y distonias musculares

El efecto terapéutico de las benzodiazepinas en espasmos musculares secundarios a traumatismos, inflamación, esguinces, etc. es nulo si no se usan a dosis altas, 30 a 40 mg de diazepam por día repartidos en tres tomas, que producen sedación. Si la espasticidad es de origen neurológico las benzodiazepinas tienen una eficacia limitada y nula si existe lesión central. De

cualquier forma, para evitar la sedación, los tratamientos se inician con dosis bajas (2-4 mg/día) que se irán elevando progresivamente (10).

Conviene recordar que la eficacia antiespástica de las benzodiazepinas disminuye con el tiempo, por lo que conviene intercalar periodos de descanso en la terapéutica.

E) Indicación en la preanestesia y anestesia

El principal objetivo que se persigue con las benzodiazepinas en estas circunstancias es calmar la ansiedad preoperatoria, inducir un sueño preanestésico y sedar la agitación postquirúrgica.

La noche anterior a la operación se utilizan como hipnóticas, siendo el diacepán por vía oral la más utilizada.

Como inductor anestésico, también la más utilizada es el diacepán a dosis altas. Estos fármacos no son verdaderamente anestésicos, pues el paciente conserva el conocimiento y la relajación muscular suficiente para que la cirugía sea viable. No obstante existe una amnesia retrógrada que crea la ilusión de una anestesia previa.

Si se recurre a la vía intravenosa los efectos se manifiestan a los 1 ó 2 minutos de la administración, produciendo sedación, relajación del músculo esquelético y amnesia; la ventilación pulmonar desciende y se incrementa la frecuencia respiratoria, pero sin repercusión clínica. En el aparato cardiovascular producen pocos cambios y aunque puede aumentar el pulso no hay cambios del gasto cardíaco ni de la presión sanguínea.

Las últimas benzodiazepinas introducidas, flunitracepán y loracepán, también se emplean como inductores anestésicos. El loracepán se suele administrar por vía intramuscular, pues a diferencia del diacepán, su acción por esta vía es rápida y segura.

Se utilizan también en maniobras exploratorias de corta duración (laparoscopias, angiografías, broncoscopias, etc.). En tales casos el efecto amnésico de

las benzodiazepinas es muy importante, ya que evita al paciente el recuerdo de los aspectos negativos de estas exploraciones (35, 48, 62).

F) Tratamiento del alcoholismo crónico

En el síndrome de abstinencia alcohólica, las benzodiazepinas son muy eficaces para el tratamiento de la excitación excesiva, convulsiones, ansiedad etc.; además favorecen el sueño y reducen las perturbaciones psicológicas.

Hay varias razones que apoyan su empleo en esta indicación : tienen dependencia cruzada con el alcohol, son anticonvulsivantes y presentan mejor índice terapéutico que otros fármacos hipnótico-sedantes.

La benzodiazepina más utilizada es el diacepán, se inicia el tratamiento por vía intravenosa hasta controlar la crisis, pasando después a la vía oral con reducción progresiva de la posología.

Cuando se usan benzodiazepinas en éste síndrome, hay que tener en cuenta si los pacientes están tomando disulfirán, ya que éste puede modificar el metabolismo de las benzodiazepinas. En efecto, el disulfirán reduce la eliminación de las benzodiazepinas, sobre todo la de clordiazepóxido y diacepán, tanto en pacientes normales como en alcohólicos. Por tanto en estas circunstancias se puede producir acumulación, por lo que es conveniente reajustar la posología(35, 62, 149, 150).

La mayoría de estos pacientes padecen hepatopatía etílica que facilita la acumulación de las benzodiazepinas de vida media larga por reducir su biotransformación hepática. Por consiguiente en alcohólicos crónicos se deben utilizar benzodiazepinas de vida media corta.

G) Terapéutica coadyuvante con benzodiazepinas

Al utilizar las benzodiazepinas para tratar las alteraciones emocionales que acompañan a síndromes orgánicos (cardiovasculares, digestivos, endocrinos, ginecológicos, etc.), existe la posibilidad de que interaccionen con otros fármacos. El empleo sistemático de las benzodiazepinas como terapéutica coadyuvante no tiene justificación salvo que exista ansiedad sobreañadida. Naturalmente son criticables desde el punto de vista farmacológico, los medicamentos que incluyen una benzodiazepina junto a otros fármacos tales como protectores gástricos, fermentos digestivos, normotensores, antiarrítmicos, etc.

X OTROS APARTADOS.

A) Efectos indeseables y contraindicaciones.

Las benzodiacepinas son medicamentos que a pesar de tener un alto índice terapéutico, pueden producir reacciones adversas. La frecuencia aproximada de las mismas es del 10% de los pacientes tratados. Su DL50 es elevada, por lo que la intoxicación aguda no suele ser grave; también producen menos tolerancia y dependencia que otros fármacos similares (158).

El efecto indeseable más frecuente es la depresión del sistema nervioso central. La disminución de la vigilia, somnolencia, enlentecimiento del pensamiento, confusión (sobre todo en pacientes de edad), etc., son directamente proporcionales a las dosis empleadas.

Para una benzodiacepina determinada, la sensibilidad individual es variable, lo que justifica el ajuste de la posología, más fácil de realizar en función de los efectos indeseables que de los terapéuticos (48, 62).

En su uso como hipnóticos, la existencia de síntomas residuales a la mañana siguiente estará en función de la vida media del fármaco elegido. Con una sola dosis tales síntomas son más ostensibles con diacepán, loracepán y nitracepán que con fluracepán y triazolán. Durante la administración repetida, los efectos del nitracepán persisten casi 20 horas, los del fluracepán más de 10 horas, los del flunitracepán de 10 a 20 horas y los del triazolán menos de 16 horas, lo cual no concuerda con su vida media.

El nitracepán y el fluracepán, éste ocasionalmente, aumentan la frecuencia de pesadillas durante el

sueño, especialmente en la primera semana de uso (79).

Finalmente conviene señalar que incluso con benzodiazepinas de vida media breve, pueden observarse alteraciones de la vigilia en caso de despertar precoz.

La sedación es un ejemplo de que un mismo efecto puede ser terapéutico o indeseable; así en un paciente con ansiedad e insomnio, contribuirá a la eficacia del fármaco utilizado de primera intención como hipnótico.

La disminución del rendimiento físico y psíquico se debe a : descenso de la vigilia, efecto relajante muscular, cambios en la memoria, concentración y organización del pensamiento. Las consecuencias derivadas de ello son bien conocidas en lo concerniente a conductores de automoviles o a personas que manejan cualquier máquina o que precisan realizar movimientos muy finos. El efecto relajante explica la gran prudencia que es preciso tener en el uso de las benzodiazepinas en pacientes con miastenia gravis o insuficiencia respiratoria (42, 60, 61, 144).

Aunque los pacientes no lo detecten, el empleo de benzodiazepinas provoca una amnesia retrógrada. Sin embargo este efecto indeseable se puede convertir en terapéutico cuando, por ejemplo, tratamos de que un paciente olvide los efectos traumatizantes de un examen endoscópico.

También se han descrito trastornos del comportamiento de naturaleza depresiva, pero casi siempre estos pacientes padecían una afección somática grave, tomaban otros fármacos y/o presentaban algún trastorno emocional primario. Además, aunque las benzodiazepinas reducen la agresividad del paciente, en un 5-10% de los casos pueden aumentarla, posiblemente por el efecto desinhibidor que producen. El desconocimiento de tales reacciones puede mover al médico al aumento de la poso-

logía, cuando lo correcto sería reducirla o incluso suprimir las benzodiazepinas en estos pacientes. Se ha señalado que a dosis altas, por ejemplo 400 mg/diazepán/día en enfermos psiquiátricos (cuando no hay justificación clara o interés terapéutico demostrado), pueden aparecer alteraciones del comportamiento sexual y social por su efecto desinhibidor.

Ocasionalmente también se han descrito : reacciones dérmicas, hematológicas y hepáticas, vómitos, molestias epigástricas, diarreas, dolores articulares y torácicos, fiebre, vértigos, cefaleas, náuseas y otros efectos indeseables de incidencia mínima.

Es conveniente no administrar las benzodiazepinas en el primer trimestre del embarazo, pues se ha descrito la aparición de algún caso de labio leporino.

Su empleo en las proximidades del parto puede ocasionar el denominado síndrome del "floppy infant" (niño hipotónico o desmadejado), en el que el niño nace con hipotonía, hipotermia y depresión respiratoria (6, 62, 155, 187).

Contraindicaciones

Exceptuando los pacientes con alergia grave a ellas, las benzodiazepinas tienen pocas contraindicaciones absolutas.

Deben utilizarse con cuidado en pacientes asmáticos o con insuficiencia respiratoria grave y en los que padezcan miastenia gravis. Conviene recordar que en la insuficiencia hepática avanzada la vida media de algunas benzodiazepinas está aumentada, con el consiguiente riesgo de acumulación y sobredosificación relativa.

B) Dependencia

Las benzodiacepinas producen un síndrome de abstinencia del mismo tipo que el de los barbitúricos, aunque más leve. No obstante en la mayoría de los casos se pueden administrar sin grandes problemas y estos pueden surgir en pacientes que las tomaban a dosis elevadas y/o durante largo tiempo.

Los síntomas que más frecuentemente aparecen al retirar las benzodiacepinas son (6, 48, 62, 155, 158): ansiedad, irritabilidad, insomnio, pesadillas, etc., siendo excepcional la aparición de un verdadero síndrome de abstinencia con vómitos, temblores, convulsiones, etc.

Con las benzodiacepinas de vida media breve o corta estos signos aparecen antes de las 24 horas, mientras que con las de vida media prolongada tardan en aparecer varios días.

Cuando aparece dependencia es tanto física como psíquica. El grado de la misma es difícil de cuantificar, pues depende además de la benzodiacepina y del paciente, del entorno social del mismo. Así, en ambientes de drogaadición esta dependencia aparece más fácilmente que en su empleo terapéutico. El grado de incapacitación física, psíquica y social de un sujeto dependiente de benzodiacepinas, es inferior a la de un alcohólico o a la de un adicto a barbitúricos u otros sedantes. El riesgo de dependencia a las benzodiacepinas también se relaciona con la rapidez de la acción, ya que las de absorción rápida (diacepán) la presentan más rápidamente, puesto que el paciente asociará con más facilidad la sensación "placentera" con el medicamento que acaba de ingerir.

Ante un síndrome de abstinencia por benzodiacepinas se plantea la disyuntiva de continuar la medicación o retirarla. La primera opción, frecuentemente adoptada, resuelve el problema inmediato pero no es la solución real del mismo. La solución más racional es la retirada paulatina del fármaco.

Aunque existe un cierto grado de dependencia a las benzodiacepinas, no se puede hablar de una auténtica toxicomanía en caso de suprimirlas. Las benzodiacepinas son utilizadas a veces por los toxicómanos, pero siempre en asociación y nunca como una droga dura.

C) Tolerancia

A los efectos sedantes y antiepilépticos de las benzodiazepinas se establece cierto grado de tolerancia, ya que en pacientes crónicos es necesario utilizar dosis crecientes. Es difícil saber si con las dosis que se emplean normalmente como ansiolíticas o hipnóticas se establecerá también, aunque cabe esperarla si la administración es continuada o crónica.

Como las benzodiazepinas no presentan autoinducción enzimática, la tolerancia que se produce es de tipo celular; probablemente por la alteración progresiva del acoplamiento de los receptores benzodiazepínicos con los de Gaba, lo que explicaría la necesidad de concentraciones cerebrales cada vez mayores de estos fármacos para ejercer un mismo efecto.

Existe tolerancia cruzada con la metacualona, los barbitúricos y en cierto grado con el etanol, siendo conveniente suspender la benzodiazepina al primer indicio de tolerancia (aumento de la dosis requerida).

El efecto rebote que aparece al suspender las benzodiazepinas por tolerancia, genera ansiedad y hace creer, incluso al médico en ocasiones, que son necesarias dosis cada vez mayores, originándose un círculo vicioso de mayor uso y tolerancia que facilitará el desarrollo de abuso y tolerancia (6, 35, 62, 79, 144, 155, 158).

D) Intoxicaciones agudas

La toxicidad aguda de las benzodiazepinas es reducida y los accidentes mortales son excepcionales, salvo que se asocien otros medicamentos o tóxicos; haciendo la salvedad de los casos de ingestión de benzodiazepinas por niños, en los cuales el cuadro de intoxicación se ve agravado por las peculiaridades del sujeto.

En un estudio de los ingresos psiquiátricos en el Hospital Universitario de Sevilla (HUS) a causa de intento de suicidio por medicamentos, comprobamos que el Valium (diazepam) ocupaba el segundo lugar de los fármacos causales con un 16% (1976 y 1978) y el tercer lugar con un 12% considerando el periodo 1976-1979 (193).

En los casos más graves, la intoxicación cursa con coma, dificultad respiratoria por la relajación muscular y depresión del centro respiratorio, que es el principal problema terapéutico en estos casos. Hasta el momento no se dispone de ningún antagonista específico de benzodiazepinas, aunque se están estudiando los antagonistas de sus receptores como el Ro-15-1788 y el FG-7142 que ya referimos (35, 88).

E) Interacciones

Las más importantes son de naturaleza farmacodinámica con los depresores del Sistema Nervioso Central. Es una interacción ambivalente ya que puede considerarse, según las circunstancias, como un efecto terapéutico o indeseable. En el segundo caso, no sólo aumenta la toxicidad aguda, sino que el empleo simultáneo con antihistamínicos, barbitúricos, neurolépticos, etc., repercute en el comportamiento social y laboral de estos sujetos, ya que se modifica el estado de conciencia y se altera la capacidad de conducir vehículos o manejar maquinaria. Especial interés tiene la interacción con alcohol, por el elevado consumo de este producto y su alta concentración en algunas bebidas (anis, brandy, ron, whisky, etc.).

Las benzodiacepinas disminuyen la eficacia de los antidepresivos tricíclicos, lo que conviene recordar ya que la asociación de ambos tipos de fármacos es frecuente (los enfermos depresivos presentan ansiedad y/o insomnio con frecuencia).

Existe unanimidad en admitir que las interacciones de naturaleza farmacocinéticas son de menor trascendencia que las anteriores, al contrario de lo que ocurre con otros psicofármacos. En efecto, apenas producen inhibición ni inducción enzimática hepática, ni modifican la respuesta o los niveles de los anticoagulantes orales. No obstante el diacepán puede disminuir la actividad de los anticonceptivos orales, lo que se ha atribuido a cierto grado de inducción enzimática en este caso concreto. También el diacepán y clordiacepóxido aumentan leve e inconstantemente los niveles plasmáticos de la difenilhidantoína (35, 155, 158).

Otra interacción farmacocinética ocurre cuando las benzodiazepinas son desplazadas de su unión a proteínas plasmáticas por otros fármacos. En general, cuando el porcentaje de dicha unión es alto y por ello la fracción libre, que es la farmacológicamente activa, es baja, si ocurre un desplazamiento por otros fármacos, se incrementa la fracción libre y consecuentemente aumentan los efectos farmacológicos. Con las benzodiazepinas puede ocurrir desplazamiento de su unión a proteínas plasmáticas, pero este efecto se amortigua porque tienen un volumen de distribución alto, que se traduce por una rápida redistribución del medicamento desplazado hacia los tejidos (6, 48).

XI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se admite que el Gaba interviene en la producción de las acciones centrales de las benzodiazepinas, a través de la inclusión del receptor benzodiazepínico (RBDZ) en el complejo:

RBDZ---receptor Gabaérgico---Ionóforo del cloro

El papel que juegan los diversos subtipos de receptores benzodiazepínicos (I y II), en los mecanismos de producción de los efectos centrales de las benzodiazepinas (ansiolítico, anticonvulsivante, relajante muscular, hipnótico, etc) es complejo y no se conoce exactamente; incluso se ha sugerido, que no todos los receptores benzodiazepínicos están acoplados al receptor gabaérgico (22, 58, 105).

Por otra parte, también se ha demostrado la existencia de receptores de benzodiazepinas en la periferia : células cebadas, corazón, hígado, pulmón, riñón y plaquetas, cuya significación fisiológica se desconoce (165, 168, 184).

Nos hemos planteado si una función plaquetaria de importancia fisiológica y patológica como es el fenómeno de agregación plaquetaria, puede ser afectada por los receptores benzodiazepínicos presentes en las plaquetas.

En los cuadros de ansiedad hay una modificación de los receptores benzodiazepínicos, cuyo número aumenta (25). Un objetivo de este estudio ha sido también investigar si ésta modificación de la población de receptores repercute sobre la agregación plaquetaria.

El presente trabajo está estructurado en dos partes:

A) Revisión y actualización bibliográfica sobre las

benzodiazepinas, con especial detalle de los receptores benzodiazepínicos (centrales y periféricos) y del mecanismo de acción de estos fármacos.

B) El estudio de la agregación plaquetaria inducida por ADP en animales normales y ansiosos tratados con benzodiazepinas. El estudio experimental se desarrolla en dos fases:

1. Estudio de la agregación plaquetaria inducida en ratas por diferentes dosis de ADP y las variaciones de la misma según el sexo de los animales.

2. Estudio de las modificaciones de la agregación plaquetaria por ADP en ratas normales y ansiosas, pretratadas con diferentes dosis de diazepam y triazolam. Los controles correspondientes a ambas fases, nos proporcionan información sobre la agregación plaquetaria en ratas normales y ansiosas.

XII MATERIAL Y METODOS

A) Material

- Animal de experimentación

Se ha utilizado un total de 104 ratas Wistar de ambos sexos, elegidas al azar y con un peso medio total de 295 ± 6 gramos.

- Compuestos utilizados

. Benzodiazepinas : Diacepán (Roche) y Triazolán (Upjohn).

. Citrato sódico (D'Hemio)

. ADP (Boehringer Mannheim)

. Eter dietílico (D'Hemio)

. Etanol (Panreac)

. Agua destilada y desmineralizada

- Utillaje

. Centrifuga P-Selecta Mixtasel, de 0-5000 r.p.m. aproximadamente.

. Agregómetro: Aggro-meter Chrono-Log Corporation modelo 330.

Su fundamento consiste en la detección de las modificaciones en la densidad óptica de una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), cuando se está produciendo la agregación. Una célula fotosensible de selenuro de cadmio, recibe las variaciones de un haz luminoso procedente de una lámpara de tungsteno cuando atraviesa la muestra de plasma. Los cambios detectados por la fotocélula son posteriormente transformados en voltaje y amplificados para permitir su registro (102).

. Registrador: Recorder 1011 W + W electronic.

- Material diverso

. Jeringas, pipetas y tubos de plástico desechables pa-

ra la extracción y recogida de muestras.

- . Cubetas de vidrio para la agregación
- . Micropipetas automáticas (30-100 y 100-500 μ l)

B) Métodos

- Clasificación de animales

Los animales hasta la realización de las experiencias se mantenían en condiciones standard de temperatura, nutrición y limpieza.

Para estudiar la influencia del factor sexo, en todos los grupos formados se estudiaron por separado los animales machos de las hembras, siendo igual el número estudiado en ambos sexos. Se formaron dos lotes:

I. Animales sin ansiedad, con dos grupos:

a. Testigos (n = 20), en el que se realiza un estudio de la agregación plaquetaria con diferentes dosis de ADP (1.25, 2.5 y 5 μ M), valorando la relación dosis respuesta.

b. Agregación plaquetaria en muestras tratadas con benzodiacepinas (n = 32), en estas muestras se provocó la agregación con la dosis intermedia de ADP (2.5 μ M) y se estudió el efecto del pretratamiento de la muestra con:

b-1. Diacepán (n = 16), a dosis de 0, 100, 500 y 1000 ng/ml (143, 148).

b-2. Triazolán (n = 16), a dosis de 0, 1, 5, y 10 ng/ml (143, 148).

II. Animales ansiosos, con subgrupos comparables a los de los animales sin ansiedad:

a. Testigos (n = 20), en el que se estudió la agregación con distintas concentraciones de ADP (1.25, 2.5 y 5 μ M).

b. Agregación plaquetaria en muestras pretratadas con benzodiazepinas (n = 32). En estas muestras se indujo la agregación con ADP 2.5 μ M y se estudió el efecto del pretratamiento de la muestra con:

b-1. Diacepán (n = 16), a dosis de 0, 100, 500 y 1000 ng/ml.

b-2. Triazolán (n = 16), a dosis de 0, 1, 5 y 10 ng/ml.

Un resumen de estos protocolos se expone en la Tabla 8 y un resumen de los valores promedios de los pesos de los animales de los distintos grupos en la Tabla 9 .

En el lote de animales con ansiedad, ésta se provocaba aislando al animal, inmovilizándolo en una malla metálica y sometiéndole a ayuno absoluto durante 24 horas.

- Realización del ensayo

Trás anestesiar al animal con éter dietílico, se realiza la extracción de la sangre (7 ml) mediante punción cardiaca. La obtención de plasma rico en plaquetas (PRP), se consigue mediante centrifugación durante 10 minutos a 1.000 r.p.m.; la del plasma pobre en plaquetas (PPP), precisa una centrifugación más prolongada (20 minutos) a mayor número de revoluciones (3.000 por minuto).

De ambos tipos de plasma se obtienen muestras de 0.3 ml, que se depositan en cubetas de vidrio siliconado transparente adaptables al portacubetas del agregómetro. La homogeneización de plasma se consigue por la introducción en las cubetas de un pequeño cilindro de acero siliconado, que gira magnéticamente a una veloci-

GRUPO EXPERIMENTAL		PRP (μ l)	H ₂ O (ul)	ADP (μ l)	FARMACO (ng/ml)	
I sin ansiedad n = 52	a. animales testigos n = 20		300	---	1.25 2.5 5	---
	b. muestras pretrata- das con	b-1 diacepán n = 16	270	30	2.5	0, 100, 500 y 1000
		b-2 triazolán n = 16	270	30	2.5	0, 1, 5 y 10
II con ansiedad provocada n = 52	a. animales testigos n = 20		300	---	1.25 2.5 5	---
	b. muestras pretrata- das con	b-1 diacepán n = 16	270	30	2.5	0, 100, 500 y 1000
		b-2 triazolán n = 16	270	30	2.5	0, 1, 5 y 10

Tabla 8.- Clasificación y dosificación de los grupos experimentales empleados en las distintas fases del estudio.

GRUPO EXPERIMENTAL		MACHOS	HEMBRAS	
I sin ansiedad n = 52	a. animales testigos n = 20	333 ± 9	247 ± 7	
	b. muestras pretratadas con	b-1 diacepán n = 16	341 ± 13	
		b-2 triazolán n = 16	341 ± 12	239 ± 9
II con ansiedad provocada n = 52	a. animales testigos n = 20	329 ± 10	251 ± 9	
	b. muestras pretratadas con	b-1 diacepán n = 16	339 ± 10	260 ± 9
		b-2 triazolán n = 16	346 ± 10	262 ± 10

Tabla 9.- Se reseña el valor promedio ($\bar{x} \pm ES$) del peso de los distintos grupos de animales estudiados.

dad de 1.100-1.200 r.p.m.

La calibración del aparato se realiza con el PRP y el PPP, con los que se obtienen los valores 90 y 10 respectivamente en el registrador adaptado al agregómetro. Dicho registrador está ajustado a unas condiciones iguales en todas las experiencias: velocidad 2 cm/min. y sensibilidad de 2.5 mV.

La agregación se realiza siempre a la misma temperatura (37° C), en un volumen de PRP de 300 ul en los animales testigos y de 270 ul de PRP más 30 ul de solución del fármaco en el grupo de muestras pretratadas.

Tanto en los estudios con relación dosis-respuesta (controles normales y ansiosos), como en las muestras pretratadas con benzodiazepinas (animal normal y ansioso), se obtiene la agregación con las correspondientes dosis de ADP diluidas hasta 100 μ l.

- Agregación plaquetaria. Valoración numérica de los registros.

Los parámetros estudiados en cada curva de agregación son los siguientes (102):

. Altura máxima (h), expresada en milímetros, con la que medimos la intensidad de la agregación en cada experimento.

. Tiempo (t), nos indica el número de segundos que tarda en alcanzarse h.

. Una vez que alcanzamos la agregación máxima, ésta tenderá a mantenerse unos momentos o bien irá disminuyendo lenta o bruscamente hasta alcanzar la posición inicial. Un índice de la velocidad con que las plaquetas se desagregan, es el que denominamos ángulo de desagregación inicial (α), formado por la intersección de una tangente a la curva en el inicio de su rama de desagregación y la recta que une el punto de agregación

máxima con el tiempo (t) en que se alcanzó ésta (Fig. 27).

- Estudio hematológico de la rata Wistar

Aunque los parámetros fisiológicos de la rata se han analizado en otros trabajos, hemos realizado un estudio con las técnicas habituales, de algunos de los valores hematológicos de los animales empleados en el presente estudio, en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Sevillano. Los valores encontrados se exponen en los resultados (179).

- Análisis estadístico de los resultados

Se realizó una comparación de grupo en las distintas fases de los lotes de animales estudiados. Para ello hallamos el promedio (\bar{x}) y el error standard (E.S.) de los parámetros (\bar{h} , \bar{t} y \bar{v}) utilizados para medir la agregación plaquetaria, aplicando posteriormente el test de Student y eligiendo como nivel de significación estadística el valor $p < 0.05$ (157).

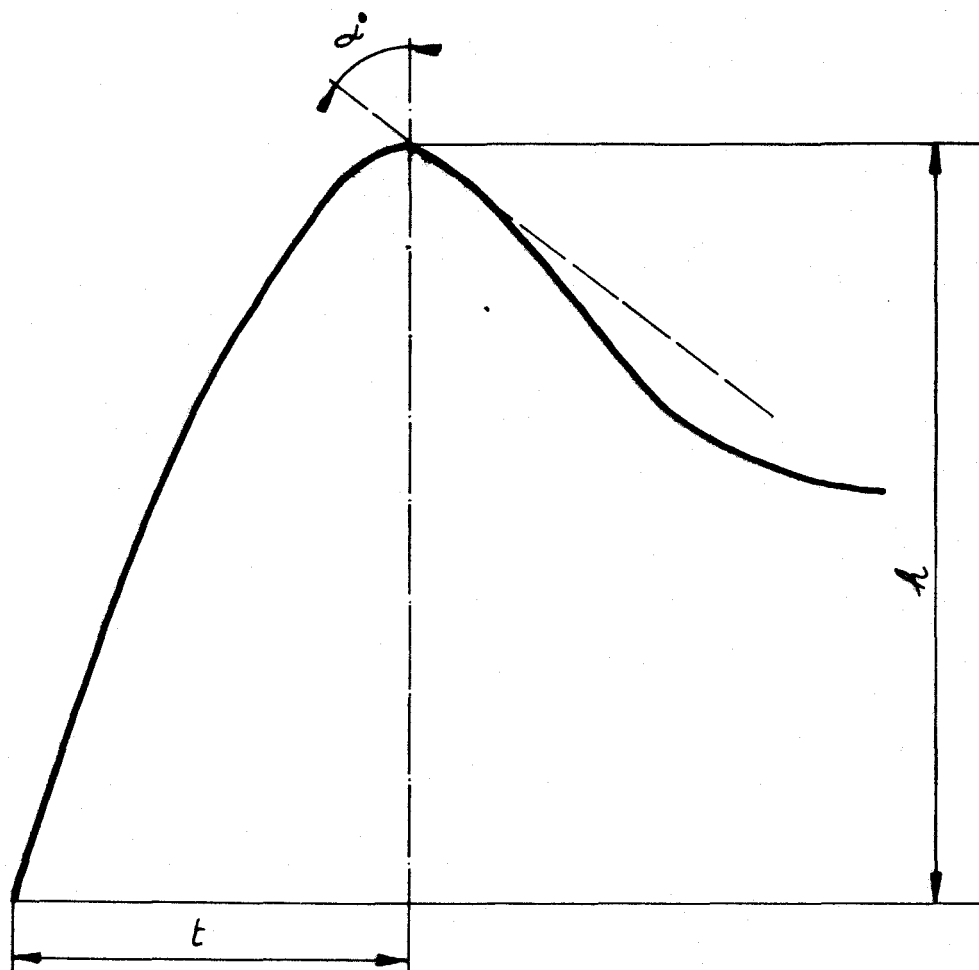


Fig. 27.- Parámetros medidos en las curvas de agregación plaquetaria.
(Explicación en texto)

XIII. RESULTADOS

1) Estudio hematológico de los animales experimentales

En la Tabla 10 se reseñan los valores hematológicos determinados en los animales experimentales. El estudio microscópico de sus células sanguíneas arrojó los siguientes datos diferenciales en relación con la citología hemática humana:

- Serie roja

Microcítica. Normocrómica. Sin presencia de formas nucleadas inmaduras en sangre periférica. Policromasia (+ 2/4).

- Serie blanca

Linfocitosis absoluta con neutropenia. Morfología normal.

- Serie plaquetaria

Hipogranulación por ausencia de cuerpos densos y/o gránulos alfa.

Tabla 10.- Valores hematológicos medios en la rata Wistar (n = 20).

Hematíes (/mm ³)	7.82 ± 0.19 x 10 ⁶
Hemoglobina (g)	14.37 ± 0.25
Hematocrito (%)	38.97 ± 0.46
Leucocitos (/mm ³)	8.50 ± 0.39 x 10 ³
VCM (μ ³)	52.08 ± 0.72
Plaquetas (/mm ³)	716.00 ± 54.00 x 10 ³
T. Protrombina (segs.)	43.6 ± 3.16
T. Tromboplastina (segs.)	16.6 ± 1.12
T. Tromboplastina parcial (cefalina)	No coagula la sangre (déficit de VIII, IX, XI ó XII)

2) Agregación plaquetaria en animales sin ansiedad

a. Testigos

Los valores obtenidos para los parámetros de la agregación plaquetaria (AGP) \bar{h} , \bar{t} y α , con diferentes dosis de ADP (1.25, 2.5 y 5 μM) en los animales machos se recogen en la Tabla 11. Idénticos valores, referidos a hembras se encuentran en la Tabla 12.

En la Fig. 28 se incluye un registro experimental, como modelo del tipo de agregación obtenida con ADP en la rata en situación control.

En la Tabla 13 se exponen los valores de la AGP ($\bar{x} + \text{E.S.}$) inducida por las distintas dosis de ADP, mientras que en la 14 se comparan los valores de "t" Student obtenidos en machos y hembras.

b. Agregación plaquetaria en muestras pretratadas

b.1. Con diacepán

Los valores de \bar{h} , \bar{t} y α obtenidos en los registros de AGP inducida por 2.5 μM de ADP, en muestras pretratadas con diferentes dosis de diacepán (0, 100, 500 y 1000 ng/ml), se recogen en las Tablas 15 y 16 para ambos sexos.

La Fig. 29 incluye un registro experimental como ejemplo de la AGP en las muestras pretratadas con diacepán.

Los datos de la AGP ($\bar{x} + \text{E.S.}$) para las muestras pretratadas con diacepán, figuran en la Tabla 17.

En la Tabla 18 se recogen los valores de "t" (Student), resultantes de comparar las distintas dosis con el correspondiente control.

Los valores de "t" (Student) resultantes de efectuar la comparación entre ambos sexos figuran en la Tabla 19.

Tabla 11.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas testigos machos con diferentes dosis de ADP (μM)*

Rata	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5 μM
1	102	107	124	39	46	60	30	36	46
2	92	102	139	37	48	78	47	51	61
3	111	134	126	39	75	90	33	40	67
4	112	121	123	42	72	84	34	48	63
5	46	82	92	36	66	84	64	52	54
6	95	98	137	35	48	68	51	45	61
7	85	101	105	33	42	57	42	32	41
8	79	114	111	42	60	86	64	69	62
9	127	135	152	42	57	72	37	42	54
10	120	141	147	39	78	84	30	44	54

* En esta tabla y las siguientes los valores \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$, corresponden respectivamente a la intensidad de la agregación plaquetaria, tiempo de agregación máxima y ángulo de desagregación inicial, según se describe en la sección de métodos.

Tabla 12.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas testigos hembras con diferentes dosis de ADP (μM).

Rata	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5 μM
1	80	102	124	42	60	78	40	48	57
2	90	102	119	40	45	60	43	43	51
3	132	145	150	45	78	120	54	70	77
4	114	103	135	38	42	60	38	38	49
5	136	134	160	45	62	78	28	55	78
6	60	83	94	33	36	45	54	43	43
7	143	152	141	57	84	105	41	51	60
8	127	139	130	42	51	72	29	33	50
9	89	101	118	34	48	54	32	33	45
10	92	119	135	40	58	85	33	41	52

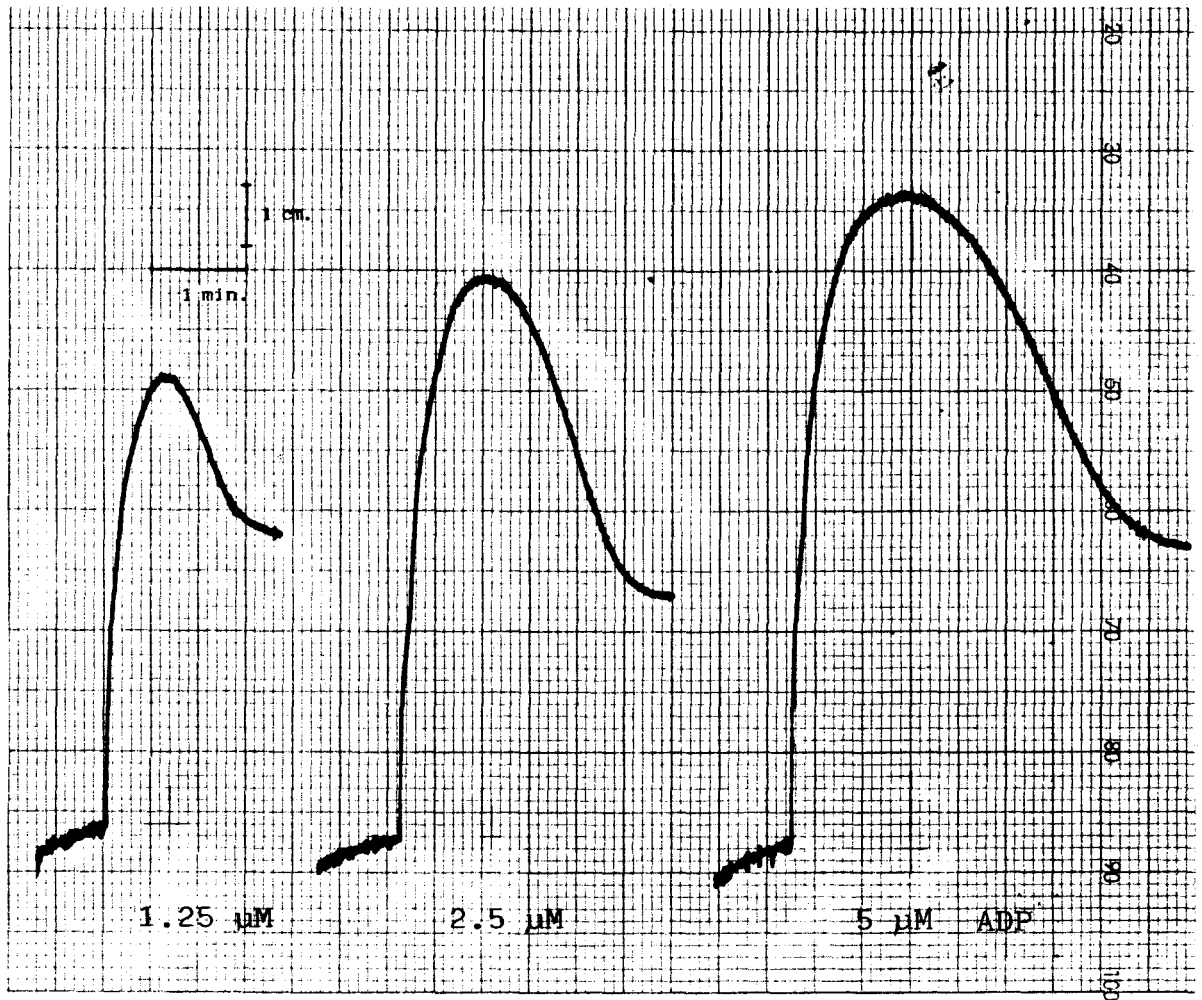


Fig. 28.- Agregación plaquetaria inducida por ADP en la rata.

Tabla 13.- Valores promedio de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas testigos de ambos sexos con diferentes dosis de ADP(μM).

	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5 μM
HEMBRAS	106	118	131	43	57	76	38	46	56
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	9	7	6	3	5	7	3	4	4
MACHOS	97	114	126	38	59	76	43	46	55
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	8	6	6	1	4	4	4	3	3

Tabla 14.- Valores "t" (Student) para los distintos parametros de la agregación plaquetaria, obtenidos de comparar ratas testigos machos y hembras.*

	1.25	2.5	5	(ADP μM)
<u>h</u>	0.82	0.47	0.60	
<u>t</u>	1.55	0.44	0.07	
<u>α</u>	0.98	0.08	0.19	

* En todos los casos $p > 0.05$

Tabla 15.- Valores de h , t y α obtenidos con ADP (2.5 μ M), en muestras de ratas (machos) pretratadas con diferentes dosis de diacepán (ng/ml).

Rata	h (mm)				t (seg)				α (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
1	123	124	125	127	48	43	44	51	43	50	40	39
2	91	123	82	87	46	64	45	45	41	50	39	43
3	120	112	118	112	51	50	60	54	38	39	45	46
4	140	157	138	155	60	66	60	66	57	59	58	57
5	146	134	122	119	48	50	45	45	40	44	37	36
6	91	92	90	103	42	45	42	44	41	42	44	44
7	144	99	114	112	66	54	54	54	46	40	39	36
8	136	129	100	119	51	48	60	51	48	46	37	44

Tabla 16.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μ M), en muestras de ratas (hembras) pretratadas con distintas dosis de diacepán (ng/ml).

Rata	\underline{h} (mm)				\underline{t} (seg)				$\underline{\alpha}$ (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
1	113	110	105	110	35	45	36	50	43	43	43	44
2	94	116	118	116	56	60	51	54	46	45	40	41
3	142	133	147	147	48	60	64	56	56	53	58	60
4	94	114	117	123	45	38	45	46	41	46	49	40
5	145	154	137	140	66	60	60	57	54	59	60	60
6	103	75	61	63	72	36	40	57	56	62	60	60
7	88	134	112	127	48	50	45	44	43	49	49	49
8	114	105	91	102	48	58	48	48	49	46	36	47

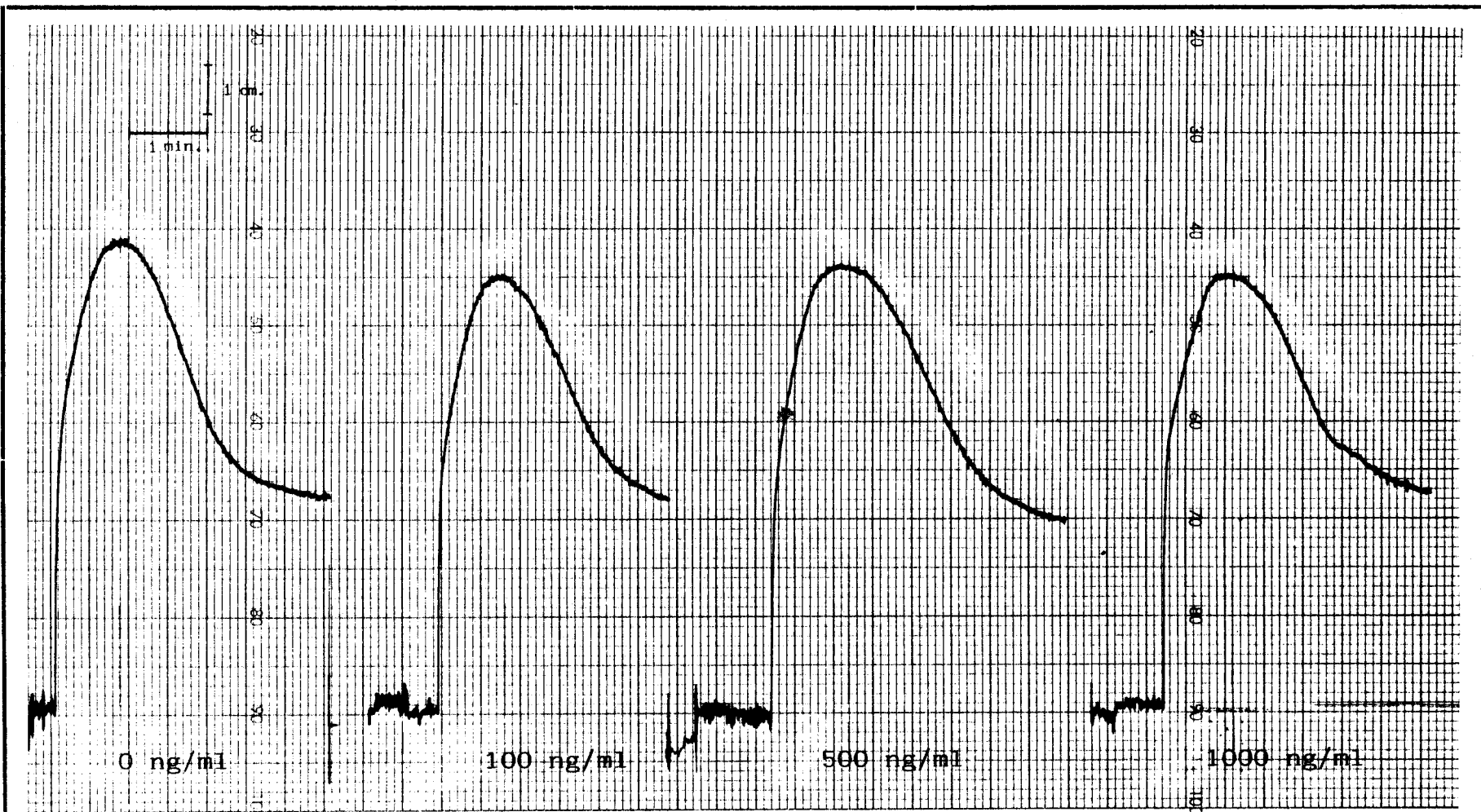


Fig. 29.- Agregación plaquetaria inducida por ADP ($2.5 \mu\text{M}$) en ratas cuyas muestras se pretrataron con diferentes dosis de diazepam (ng/ml).

Tabla 17.- Valores promedio de h , t y α obtenidos con ADP(2.5 μ M), en muestras de ratas de ambos sexos pretratadas con diferentes dosis de diacepán (ng/ml).

	h (mm)				t (seg)				α (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
HEMBRAS	112	118	111	116	52	51	49	52	49	50	49	50
($\bar{x} \pm ES$)	8	8	9	9	4	7	3	2	2	3	3	3
MACHOS	120	121	111	117	52	53	51	51	45	50	42	43
($\bar{x} \pm ES$)	7	8	7	7	3	3	3	3	2	5	2	2

Tabla 18.- Valores "t" (Student) para los distintos parámetros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar la dosis 0 con las demás dosis estudiadas de diacepán (ng/ml), en ratas sin ansiedad.*

	<u>h</u>			<u>t</u>			<u>α</u>		
	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000 ng/ml
HEMBRAS	0.47	0.10	0.31	0.25	0.67	0.16	0.57	0.22	0.43
MACHOS	0.11	0.90	0.33	0.25	0.06	0.07	0.88	0.74	0.51

* En todos los casos $p > 0.05$

Tabla 19.- Valores de "t" (Student) para los distintos parámetros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar machos y hembras sin ansiedad, cuyas muestras se pretrataron con distintas dosis de diacepán (ng/ml).*

	0	100	500	1000	ng/ml
<u>h</u>	0.74	0.31	0.01	0.07	
<u>t</u>	0.15	0.35	0.59	0.08	
<u>α</u>	1.25	0.16	1.70	1.80	

* En todos los casos $p > 0.05$

b-2. Con triazolán:

Los datos de los parametros de la AGP con ADP 2.5 μ M, en ratas machos pretratadas con distintas dosis de triazolán (0, 1, 5 y 10 ng/ml), se encuentran en la Tabla 20. Los mismos valores referidos a las hembras se recogen en la Tabla 21.

Como ejemplo del tipo de agregación obtenida en esta situación, se incluye un registro experimental en la Fig. 30.

En la Tabla 22 se muestran los valores promedio de la AGP ($\bar{x} \pm E.S.$), en ésta situación experimental.

Los valores de "t" (Student) obtenidos de comparar los controles con el resto de las dosis de triazolán se expresan en la Tabla 23 y en la Tabla 24 se incluyen dichos valores de "t" (Student) derivados de la comparación entre machos y hembras.

Tabla 20.- Valores de h , t y α obtenidos con ADP (2.5 μ M), en muestras de ratas (machos) pretratadas con diferentes dosis de triazolán (ng/ml).

Rata	h (mm)				t (seg)				α ($^{\circ}$)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
1	141	119	123	126	48	39	42	45	53	50	51	47
2	106	104	117	120	54	54	52	56	42	41	44	43
3	92	150	132	133	54	58	50	56	48	62	58	61
4	95	95	86	77	40	34	36	33	38	37	39	40
5	138	124	119	136	52	52	44	48	43	51	40	51
6	109	73	88	95	42	48	46	45	43	44	48	45
7	85	85	85	66	39	27	42	42	48	57	58	57
8	88	99	105	117	48	48	47	50	50	45	43	41

Tabla 21.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas (hembras) pretratadas con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

Rata	\underline{h} (mm)				\underline{t} (seg)				$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
1	84	95	127	90	50	48	60	44	39	43	41	42
2	134	116	139	118	48	48	42	42	52	54	51	55
3	114	133	99	94	38	45	42	40	39	41	35	40
4	101	87	112	84	48	48	54	48	35	42	51	52
5	138	141	132	132	47	60	60	54	52	49	48	52
6	141	139	145	135	72	72	68	70	68	62	63	64
7	114	116	152	126	48	46	56	42	54	52	52	54
8	125	142	124	123	48	48	48	48	63	70	62	64

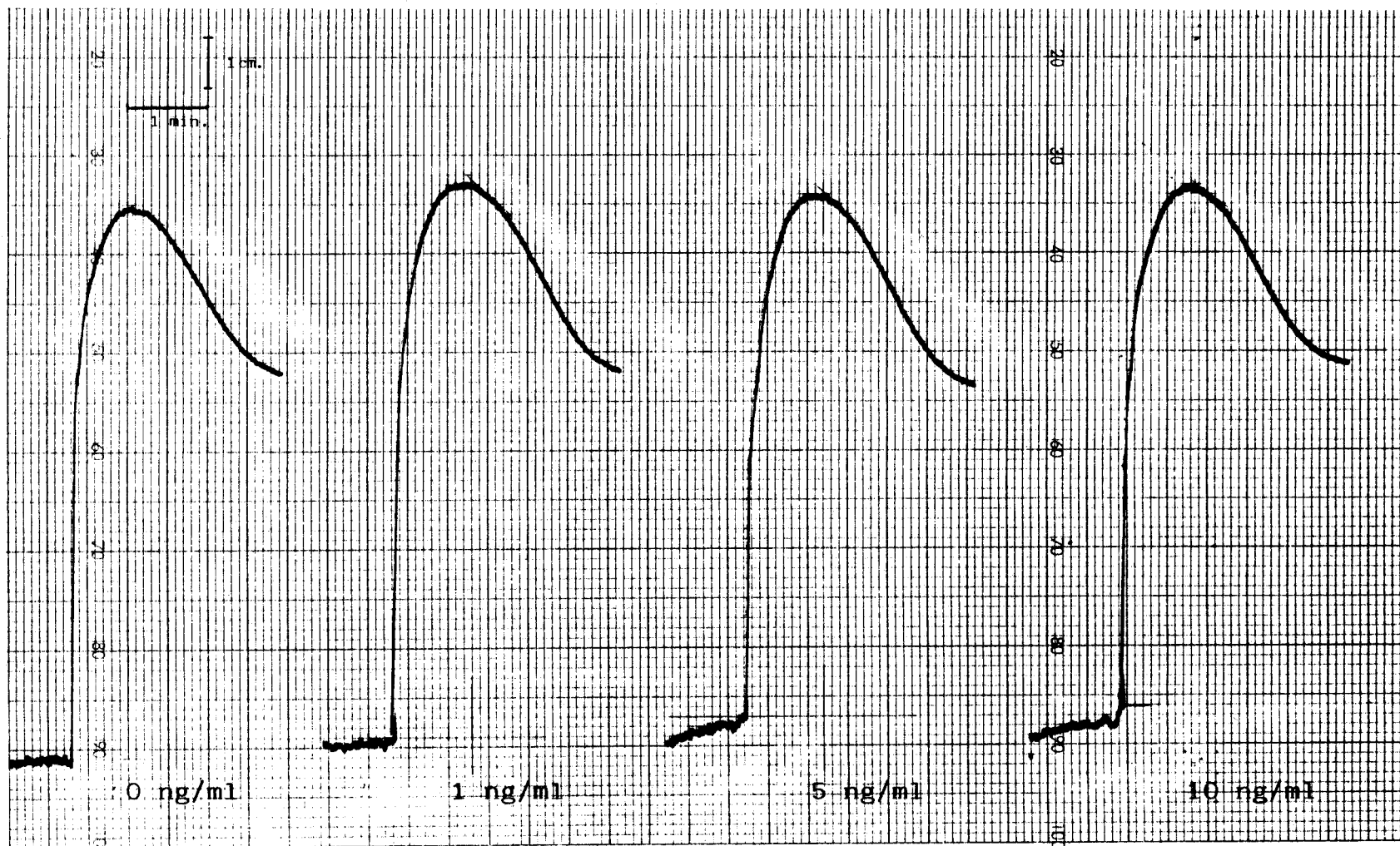


Fig. 30.- Agregación plaquetaria inducida por ADP ($2.5 \mu\text{M}$) en ratas cuyas muestras se pretrataron con diferentes dosis de triazolán (ng/ml).

Tabla 22.- Valores promedio de \bar{h} , \bar{t} y $\bar{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas de ambos sexos pretratadas con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

	\bar{h} (mm)				\bar{t} (seg)				$\bar{\alpha}$ (°)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
HEMBRAS	119	121	129	113	50	52	54	49	50	52	50	53
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	7	8	6	7	3	3	3	4	4	4	3	3
MACHOS	107	103	107	109	47	45	45	47	46	48	48	48
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	8	10	7	9	2	4	2	3	2	3	3	3

Tabla 23.- Valores de "t" (Student) para los distintos parametros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar la dosis 0 con las demás dosis estudiadas de triazolán (ng/ml), en ratas sin ansiedad. *

	<u>h</u>			<u>t</u>			<u>α</u>		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10 ng/ml
HEMBRAS	0.22	1.06	0.61	0.42	0.88	0.29	0.25	0.02	0.50
MACHOS	0.33	0.01	0.17	0.49	0.80	0.07	0.80	0.63	0.78

* En todos los casos $p > 0.05$

Tabla 24.- Valores de "t" (Student) para los diferentes parámetros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar ratas machos y hembras sin ansiedad, cuyas muestras se pretratarón con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

	0	1	5	10 ng/ml
<u>h</u>	1.17	1.47	2.43*	0.34
<u>t</u>	0.68	1.37	2.38*	0.37
<u>κ</u>	1.02	0.70	0.64	1.16

* $p < 0.05$

3) Agregación plaquetaria en animales con ansiedad

a) Testigos

La Tabla 25 expresa los valores de la AGP obtenidos con distintas dosis de ADP (1.25, 2.5 y 5 μM) en los animales machos, mientras que la 26 expone los referidos a las hembras.

Un registro de las curvas de agregación obtenidas experimentalmente se representa en la Fig. 31, como ejemplo.

Los datos de la AGP ($\bar{x} \pm \text{E.S.}$) inducida por las diversas dosis de ADP se recogen en la Tabla 27, mientras que los valores de "t" (Student) resultantes de la comparación entre sexos se exponen en la Tabla 28.

La valoración estadística "t" (Student) de los parámetros de la AGP entre ratas normales y ansiosas de ambos sexos, se detalla en la Tabla 29. La representación gráfica de estos parámetros se observa en las Figs. 32, 33 y 34.

b. Agregación plaquetaria en muestras pretratadas

b.1. Con diacepán

Los datos de h , t y α obtenidos con la dosis 2.5 μM de ADP, en ratas machos y hembras pretratadas con distintas dosis de diacepán (0, 100, 500 y 1000 ng/ml), se muestran en las Tablas 30 y 31 respectivamente.

La representación gráfica de uno de estos experimentos aparece en la Fig. 35.

Los datos promedio de la AGP ($\bar{x} \pm \text{E.S.}$) figuran en la Tabla 32.

Los resultados de "t" (Student) derivados de estudiar la influencia de la dosificación en los parámetros medidos en la AGP, se expresan en la Tabla 33,

Tabla 25.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas ansiosas machos, con diferentes dosis de ADP (μM).

Rata	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.6	5 μM
1	82	146	131	32	54	68	32	35	38
2	118	127	110	24	42	56	42	58	65
3	92	108	150	27	36	48	38	34	47
4	96	121	136	30	46	62	43	37	52
5	83	116	139	30	36	56	39	54	55
6	80	131	151	24	54	78	32	38	48
7	124	118	128	27	36	60	27	32	44
8	114	125	132	30	46	72	60	52	58
9	129	116	137	54	66	80	60	47	63
10	99	136	161	33	48	66	46	53	77

Tabla 26.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas ansiosas hembras con diferentes dosis de ADP(μM).

Rata	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5 μM
1	115	150	172	30	36	54	32	29	38
2	132	140	144	38	66	84	50	60	72
3	92	103	145	26	40	52	68	41	44
4	80	99	114	24	34	48	46	38	49
5	92	105	122	36	42	57	45	42	60
6	75	130	120	30	42	60	50	42	43
7	118	128	120	30	30	60	54	43	49
8	131	148	163	44	64	84	35	53	77
9	103	125	142	23	38	44	26	32	48
10	105	131	147	36	45	66	40	46	50



Fig. 31.- Agregación plaquetaria inducida por ADP en la rata ansiosa.

Tabla 27.- Valores promedio de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ en ratas testigos ansiosas de ambos sexos con diferentes dosis de ADP (μM).

	\underline{h} (mm)			\underline{t} (seg)			$\underline{\alpha}$ ($^{\circ}$)		
	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5	1.25	2.5	5 μM
HEMBRAS	104	129	136	32	45	61	41	46	53
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	6	6	7	2	4	4	3	4	4
MACHOS	106	124	138	31	46	65	42	49	55
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	4	4	8	3	3	3	4	3	4

Tabla 28.- Valores de "t" (Student) para los distintos parametros de la agregación plaquetaria, obtenidos de comparar ratas testigos ansiosas machos y hembras.*

	1.25	2.5	5	(ADP μ M)
<u>h</u>	0.21	0.70	0.14	
<u>t</u>	0.69	0.40	0.17	
<u>α</u>	0.31	0.33	0.53	

* En todos los casos $p > 0.05$

Tabla 29.- Valores de "t" (Student) para los distintos parámetros de la agregación plaquetaria, obtenidos de comparar ratas testigos de ambos sexos normales y ansiosas.

		1.25	2.5	5	(ADP μ M)
\bar{h}	HEMBRAS	0.57	1.20	0.18	
	MACHOS	1.59	1.57	0.82	
\bar{t}	HEMBRAS	1.74	1.99	3.32*	
	MACHOS	2.41*	2.49*	2.15*	
\bar{x}	HEMBRAS	0.57	0.62	1.37	
	MACHOS	0.14	0.41	0.21	

* $p < 0.05$

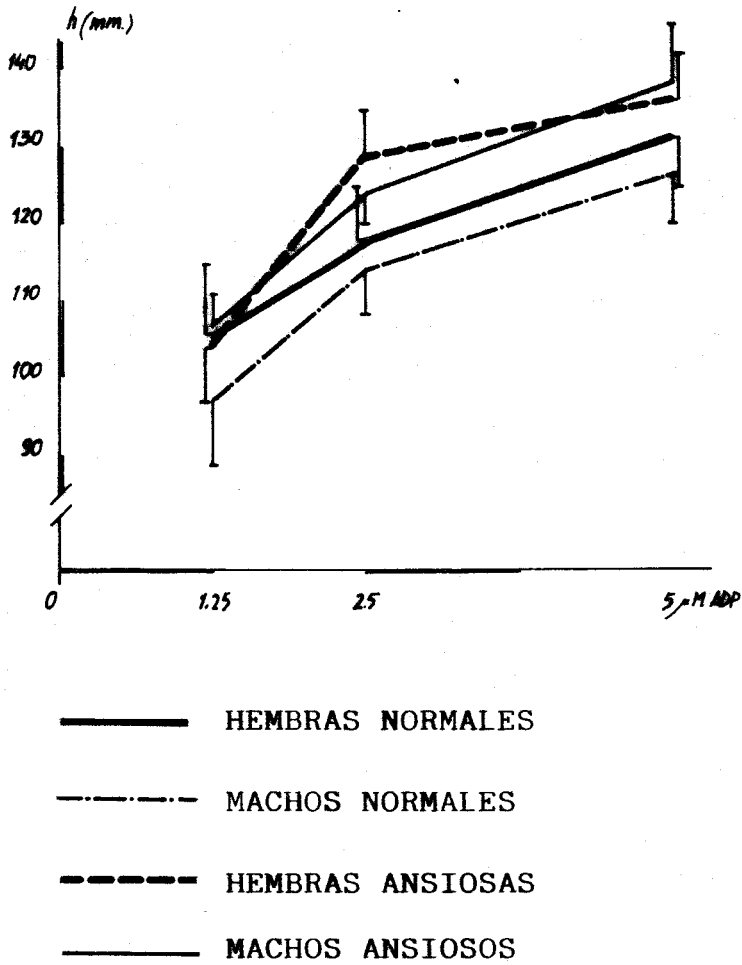


Fig. 32.- Valores de h en la agregación inducida con diferentes dosis de ADP, en ratas de ambos sexos normales y ansiosas.

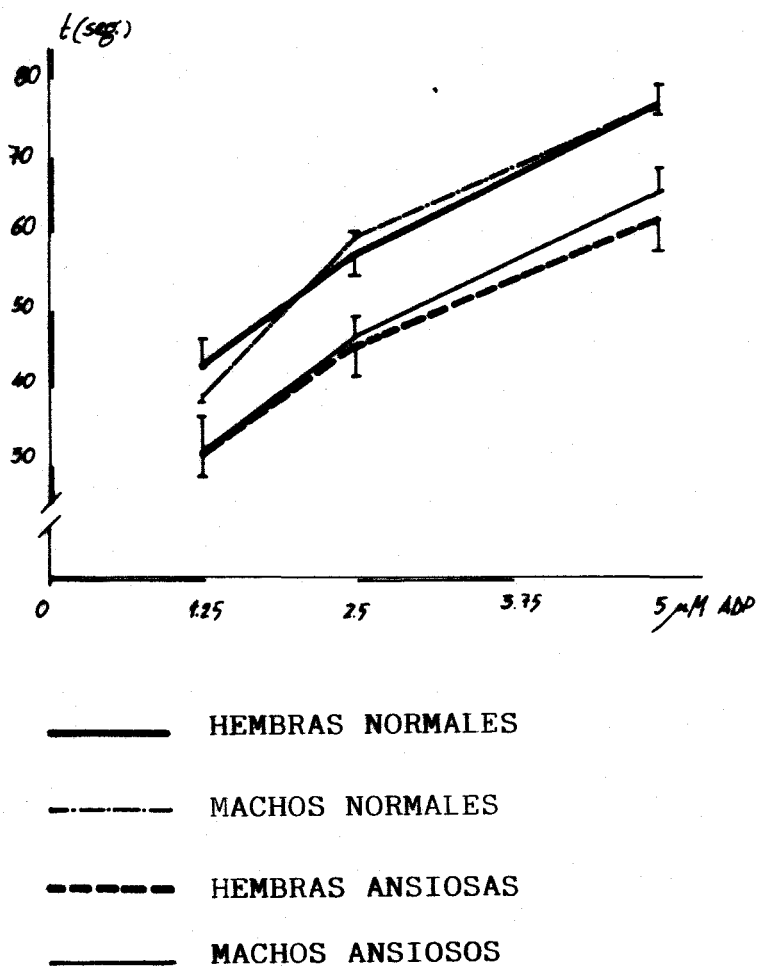


Fig. 33.- Valores de t en la agregación inducida con diferentes dosis de ADP, en ratas de ambos sexos normales y ansiosas.

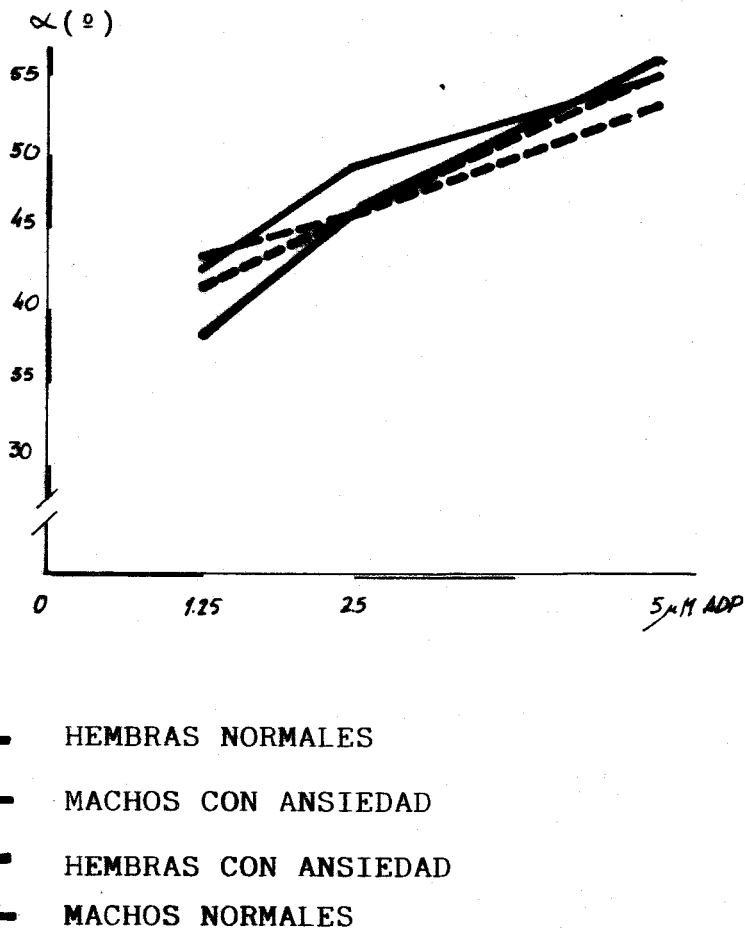


Fig. 34.- Valores de α en la agregación inducida con diferentes dosis de ADP, en ratas de ambos sexos normales y ansiosas. (Para mayor claridad de la figura no se representan los E.S.).

Tabla 30.- Valores de \bar{h} , \bar{t} y $\bar{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas ansiosas (machos) pretratadas con diferentes dosis de diacepán (ng/ml).

Rata	\bar{h} (mm)				\bar{t} (seg)				$\bar{\alpha}$ (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
1	117	117	95	134	46	48	48	48	53	59	57	60
2	119	95	88	127	76	36	42	45	43	38	44	35
3	110	97	123	117	36	48	48	42	40	37	40	41
4	110	140	127	123	30	36	30	38	55	71	60	64
5	146	156	167	147	36	39	30	30	52	58	59	53
6	143	144	138	134	33	30	30	30	50	43	56	61
7	154	153	146	138	34	32	33	36	44	43	43	39
8	150	120	142	152	54	54	48	60	50	45	45	51

Tabla 31.- Valores de \underline{h} , \underline{t} y $\underline{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μ M), en muestras de ratas ansiosas (hembras) pretratadas con distintas dosis de diacepán (ng/ml).

Rata	\underline{h} (mm)				\underline{t} (seg)				$\underline{\alpha}$ (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
1	122	142	159	146	36	36	42	39	40	49	50	45
2	155	162	155	148	48	60	48	48	48	60	50	45
3	85	87	91	130	48	46	52	60	46	55	48	53
4	128	120	120	151	54	60	50	54	47	58	51	63
5	138	147	117	88	42	38	30	30	58	50	33	43
6	115	124	110	136	56	48	58	60	38	35	44	45
7	142	105	100	111	52	48	48	54	46	47	43	48
8	150	137	142	155	54	57	57	60	45	45	45	55

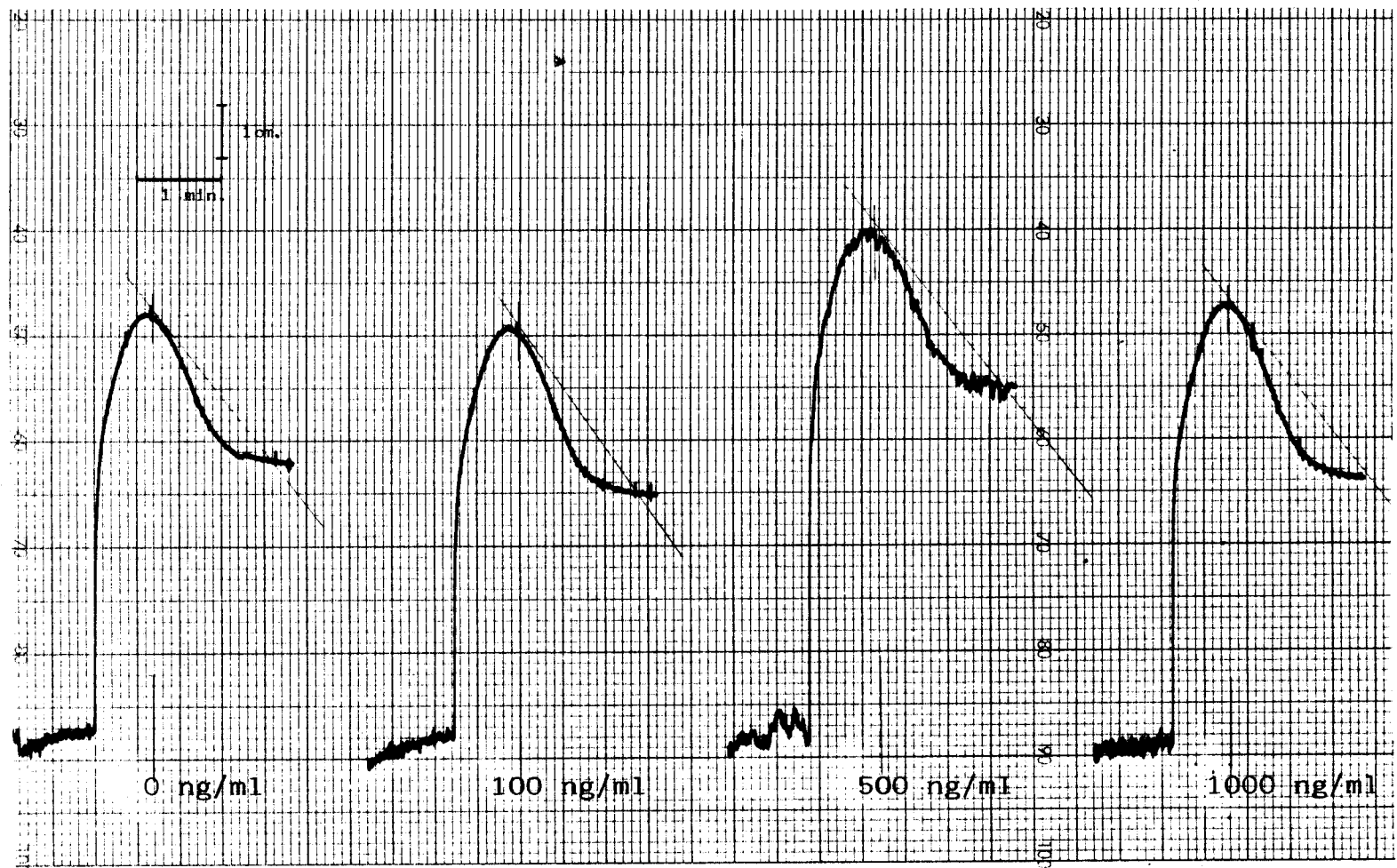


Fig. 35.- Agregación plaquetaria inducida por ADP ($2.5 \mu\text{M}$) en ratas ansiosas cuyas muestras se pretrataron con diferentes dosis de diazepam (ng/ml).

Tabla 32.- Valores promedio de \bar{h} , \bar{t} y $\bar{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas ansiosas de ambos sexos pretratadas con diferentes dosis de diacepán (ng/ml).

	\bar{h} (mm)				\bar{t} (seg)				$\bar{\alpha}$ (°)			
	0	100	500	1000	0	100	500	1000	0	100	500	1000 ng/ml
HEMBRAS	129	128	124	133	49	49	48	51	46	50	46	50
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	8	9	9	8	2	3	3	4	2	3	2	2
MACHOS	131	128	128	134	43	40	39	41	48	49	51	50
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	7	7	9	4	5	3	3	4	2	4	3	4

Tabla 33.- Valores de "t" (Student) para los distintos parametros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar la dosis 0 con las demás dosis estudiadas de diacepán (ng/ml), en ratas ansiosas.*

	<u>h</u>			<u>t</u>			<u>α</u>		
	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000 ng/ml
HEMBRAS	0.12	0.43	0.33	0.10	0.16	0.41	1.10	0.51	1.13
MACHOS	0.31	0.25	0.37	0.44	0.72	0.31	0.19	0.61	0.49

* En todos los casos $p > 0.05$

mientras que los valores de "t" (Student) resultantes de la comparación entre ambos sexos figuran en la Tabla 34.

b-2. Con triazolán

Los valores de los parámetros de la AGP con ADP 2.5 μM , en ratas machos pretratadas con varias dosis de triazolán (0, 1, 5 y 10 ng/ml), se encuentran en la Tabla 35, mientras que los relativos a las hembras figuran en la 36.

Un registro de agregación en uno de los sujetos experimentales se incluye a modo de ejemplo en la Fig. 36.

En la Tabla 37 se muestran los valores promedio de la AGP ($\bar{x} + \text{E.S.}$)

La valoración estadística del análisis dosis-respuesta y de los resultados en ambos sexos, se recogen respectivamente en las Tablas 38 y 39.

Tabla 34.- Valores de "t" (Student) para los distintos parámetros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar ratas machos y hembras ansiosas, cuyas muestras se pretrataron con diferentes dosis de diacepán (ng/ml).

	0	100	500	1000 ng/ml
\bar{h}	0.17	0.02	0.31	0.09
\bar{t}	0.94	1.95	2.15*	1.80
\bar{x}	0.84	0.12	1.40	0.19

* $p < 0.05$

Tabla 35.- Valores de \bar{h} , \bar{t} y $\bar{\alpha}$ obtenidos con ADP(2.5 μM), en muestras de ratas ansiosas (machos) pretratadas con diferentes dosis de triazolán (ng/ml).

Rata	\bar{h} (mm)				\bar{t} (seg)				$\bar{\alpha}$ ($^{\circ}$)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
1	111	150	113	131	45	39	45	42	61	67	53	60
2	125	123	153	115	45	42	42	42	35	27	33	32
3	120	138	148	87	48	48	50	48	46	48	57	38
4	119	115	100	116	36	36	30	36	39	35	36	37
5	99	150	114	130	42	45	42	42	40	52	33	41
6	156	146	95	120	45	50	52	53	50	61	44	47
7	164	127	131	122	63	69	68	69	55	43	53	43
8	110	95	125	114	44	45	48	48	34	36	29	30

Tabla 36.- Valores de h , t y α obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas ansiosas (hembras) pretratadas con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

Rata	h (mm)				t (seg)				α ($^{\circ}$)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
1	129	135	120	146	53	55	48	56	30	37	37	40
2	115	88	118	124	48	44	48	48	40	35	35	37
3	118	110	131	159	48	44	48	49	52	42	47	33
4	128	95	134	125	39	42	42	42	69	70	68	47
5	162	134	128	162	42	42	42	39	40	36	26	43
6	123	112	134	133	62	57	48	55	40	40	32	37
7	110	121	125	148	54	45	46	51	32	39	40	41
8	132	157	128	122	42	42	40	51	51	37	41	49

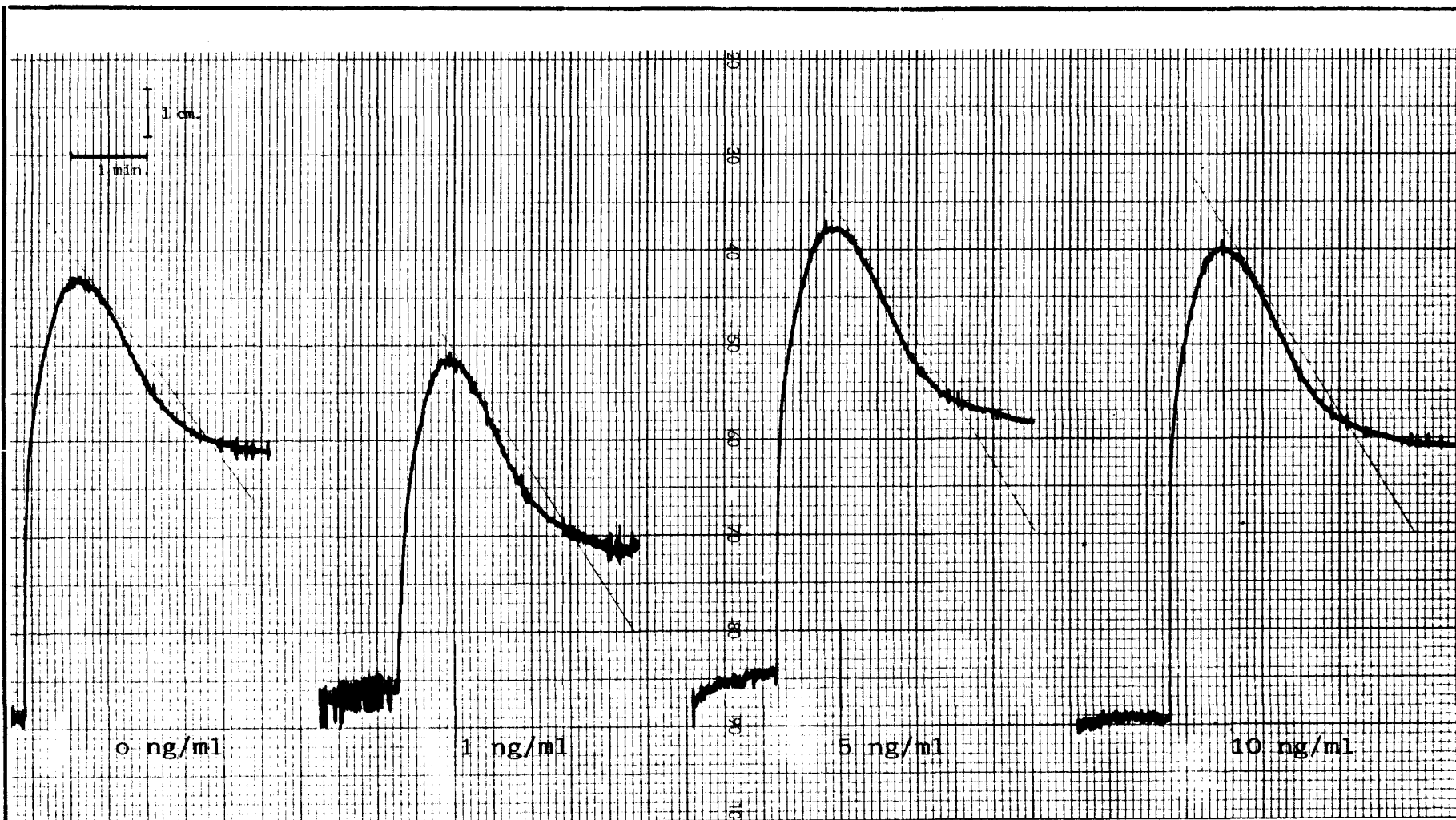


Fig. 36.- Agregación plaquetaria inducida por ADP ($2.5 \mu\text{M}$) en ratas ansiosas cuyas muestras se pretrataron con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

Tabla 37.- Valores promedio de \bar{h} , \bar{t} y $\bar{\alpha}$ obtenidos con ADP (2.5 μM), en muestras de ratas ansiosas de ambos sexos pretratadas con distintas dosis de triazolán (ng/ml).

	\bar{h} (mm)				\bar{t} (seg)				$\bar{\alpha}$ (°)			
	0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10 ng/ml
HEMBRAS	127	119	127	140	49	43	46	47	45	42	42	41
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	6	8	2	6	3	2	1	2	4	4	4	2
MACHOS	126	131	122	117	46	47	47	48	45	46	42	41
($\bar{x} \pm \text{ES}$)	8	7	7	5	3	4	4	4	3	5	4	3

Tabla 38.- Valores de "t" (Student) para los distintos parametros de la agregación (ADP 2.5 μ M), obtenidos de comparar la dosis 0 con las demás dosis estudiadas de triazolán (ng/ml), en ratas ansiosas.*

	<u>h</u>			<u>t</u>			<u>α</u>		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10 ng/ml
HEMBRAS	0.83	0.02	1.59	0.61	1.03	0.32	0.25	0.24	0.73
MACHOS	0.47	0.28	0.92	0.17	0.25	0.33	0.19	0.63	0.83

* En todos los casos $p > 0.05$

Tabla 39.- Valores de "t" (Student) para los distintos parámetros de la agregación (ADP 2.5 μM), obtenidos de comparar ratas machos y hembras ansiosas, cuyas muestras se pretrataron con diferentes dosis de triazolán (ng/ml).

	0	1	5	10 ng/ml
\bar{h}	0.17	1.09	0.63	3.09*
\bar{t}	0.65	0.09	0.41	0.03
\bar{r}	0.09	0.03	0.04	0.65

* $p < 0.05$

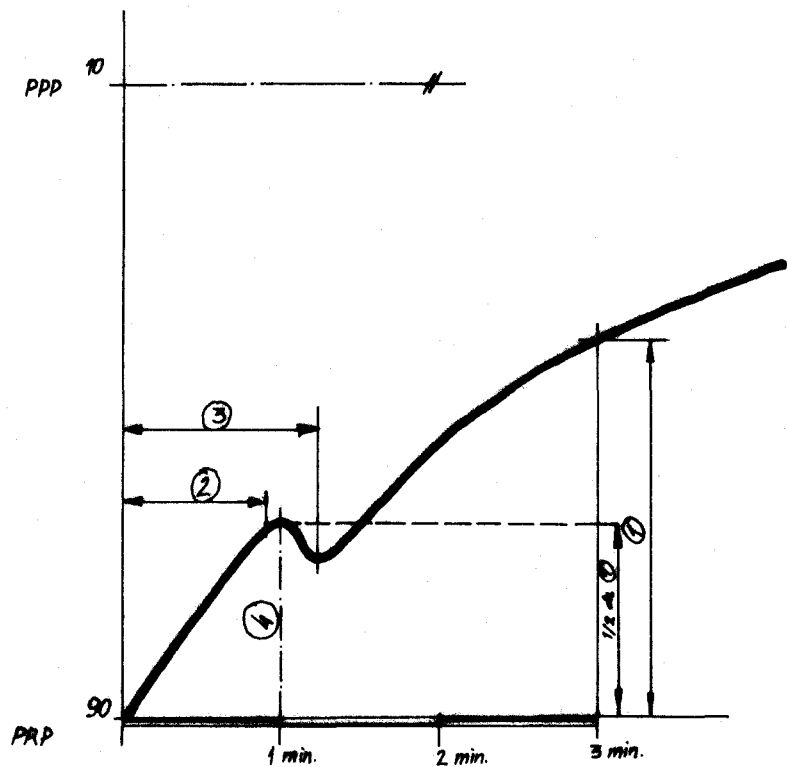
XV. DISCUSION

En este trabajo hemos utilizado ratas albinas Wistar, ya que en ésta especie se han descrito receptores benzodiazepínicos periféricos de localización plaquetaria, además de los ya conocidos receptores centrales (184). Esta especie presenta también la ventaja añadida de su facilidad de obtención, manejo y adaptación a la técnica empleada en el estudio.

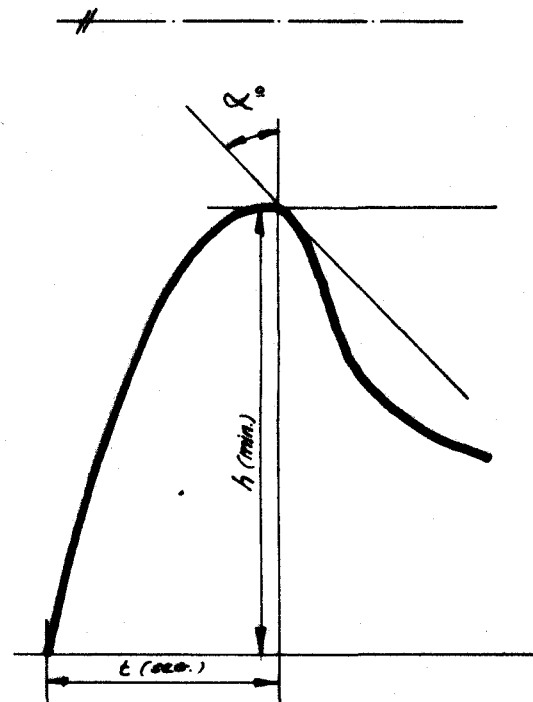
Como la función de los receptores benzodiazepínicos plaquetarios es desconocida, planteamos si la activación de dichos receptores por agonistas específicos, podía afectar a una función plaquetaria importante como es el fenómeno de agregación. Para la resolución experimental del problema planteado comenzamos estudiando la agregación plaquetaria en condiciones control en las ratas, ya que esta función plaquetaria ha sido estudiada por técnicas diversas y presenta variaciones según la técnica y dificultades de valoración objetivas que estimamos necesario revisar.

En estos estudios preliminares, pudimos comprobar algunas diferencias de especie que no suelen valorarse en estos trabajos experimentales. El registro de agregación plaquetaria de la rata Wistar ante la estimulación proagregante del ADP, difiere del obtenido en condiciones fisiológicas en humanos y es por el contrario comparable al tipo de agregación hallada en el conejo (102). Por tanto las técnicas de medición del fenómeno que se emplean en la agregación plaquetaria humana no eran totalmente adecuadas para la cuantificación de nuestros registros experimentales.

En la Figura 37, se representan esquemáticamente ambos tipos de registros y los parámetros que se eva-



(a)



(b)

Fig. 37.- Registros de agregación plaquetaria humana (a) y de rata (b) junto con los parámetros que se evalúan en las mismas. (Explicación en texto).

lúan en los mismos. La agregación plaquetaria en humanos presenta una doble onda de agregación y en ella se pueden medir los siguientes parámetros, según la técnica seguida por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de Sevilla:

- 1.- Amplitud máxima en un tiempo determinado (3 minutos), que es proporcional al porcentaje de plaquetas agregadas en el tiempo dado y se expresa como porcentaje de la amplitud máxima posible, que es la que viene dada por el valor que se extiende desde la señal 90 del papel de registro hasta la 10, que corresponden respectivamente a la calibración con el plasma rico en plaquetas (PRP) donde la totalidad de las plaquetas están libres y con el plasma pobre en plaquetas (PPP) donde se supone que se han agregado la totalidad de las plaquetas.
- 2.- T_{50} es el tiempo que la agregación tarda en alcanzar la mitad del valor que se obtiene a los 3 minutos. Este parámetro mide la reactividad de la plaqueta o rapidez de respuesta agregante ante una estimulación por ADP.
- 3.- Tiempo de aparición de la doble onda, que corresponde a la liberación del contenido presente en los cuerpos densos y gránulos alfa de la plaqueta.
- 4.- El porcentaje de agregación obtenida en un minuto que expresará el porcentaje de plaquetas agregadas en ese tiempo, indica la pendiente de la curva de agregación y por ello suele referirse como "slope".

Refiriéndonos a la agregación plaquetaria de la rata Wistar, cabe hacer una serie de consideraciones que se deducen de la morfología de su registro:

- a) La agregación es reversible, al contrario de lo que ocurre en la especie humana, por tanto la plaqueta no tiene cuerpos densos y/o gránulos alfa o no libera su contenido; estos datos son concordantes con los hallazgos microscópicos expuestos en los resultados.
- b) Después de ensayar dosis crecientes de ADP, se comprobó que no aparecía la doble onda que está provocada por la liberación interna del contenido de los gránulos plaquetarios, como ya comentábamos antes. Por tanto la única agregación que aparece es la inducida por el estímulo del factor agregante, en este caso el ADP. Esta agregación debe por tanto ser dependiente de la dosis del compuesto utilizado como agente proagregante, hecho que se confirma con los resultados obtenidos en los que se comprueba que la agregación plaquetaria de la rata es dosis-dependiente.

Por tanto, a la vista de estos hallazgos y teniendo en cuenta el método utilizado para medir la agregación plaquetaria en conejos (muy similar a la de la rata Wistar), optamos por utilizar los siguientes parámetros que ya se comentaron en Material y Métodos:

- h, que representa el porcentaje máximo de plaquetas agregadas en cada experimento y que nos indicará la intensidad máxima de agregación en cada caso.
- t, que indica el tiempo en que se alcanza esta máxima agregación.
- α o ángulo de desagregación inicial, que al ser la agregación reversible nos indicará la velocidad con que las plaquetas se desagregan una vez que ha cesado la actividad agregante de ADP.

La rapidez de respuesta agregante, indicada indirectamente por el valor T_{50} en la agregación humana, va directamente evaluada en nuestra técnica en el valor t . El tiempo de aparición de la doble onda no se mide al no existir ésta y el "slope" referido no es una medida real; en nuestros experimentos medimos la agregación máxima y el tiempo en que se produce, cuya relación sí sería una medida real de la pendiente si la gráfica fuera una línea recta.

Por tanto el tipo de medición que hemos elegido, creemos que nos aporta datos más precisos sobre el desarrollo de la agregación plaquetaria de la rata Wistar, que la técnica de medida utilizada para la agregación humana.

En los animales sin ansiedad, ninguna de las dosis de las benzodiazepinas ensayadas modifica la agregación, lo que obliga a pensar que los receptores benzodiazepínicos de las plaquetas no intervienen en dicha agregación. Sin embargo, no podemos descartar su intervención y ella podría evidenciarse de manera indirecta. Una posibilidad de demostrarlo sería la provocación de ansiedad en los animales en experiencia, ya que esta circunstancia incrementa la población de receptores benzodiazepínicos por la liberación de posibles ligandos benzodiazepínicos endógenos (26).

En nuestros resultados la ansiedad solo modifica el valor t de la agregación, al que acorta. Dicho parámetro no se normaliza tras la administración posterior de benzodiazepinas, lo que permite descartar un papel de los receptores benzodiazepínicos plaquetarios en la génesis del fenómeno de agregación, a pesar de que en la ansiedad se modifica la agregación y aumenta el número de receptores benzodiazepínicos.

Distintas razones podrían explicar la falta de

correlación entre ambos fenómenos:

- a) Los lugares de fijación en la plaqueta podrían ser receptores silenciosos, sin función fisiológica específica, como se ha descrito para algunos receptores hormonales.
- b) La unión de las benzodiazepinas a las plaquetas sólo se evidenciarían, al menos en las ratas Wistar, a dosis mayores que las utilizadas en este estudio; conviene recordar que las dosis de diazepam propuestas para observar cambios conductuales en las ratas están muy por encima de las comúnmente utilizadas en el género humano y algo similar podría ocurrir en la agregación plaquetaria. En este caso el empleo del Ro-5-4868 (4'-clordiazepam), ligando específico del receptor benzodiazepínico periférico, con mayor afinidad y actividad intrínseca hacia dicho receptor que el diazepam (hasta diez veces superior), podría obviar este inconveniente y evidenciar efectos sobre la agregación plaquetaria si la unión de las benzodiazepinas al receptor plaquetario fuese muy débil (8, 146, 188).
- c) La continua agitación de las plaquetas en las cubetas del agregómetro, podría desplazar a las benzodiazepinas de sus lugares de unión al receptor.
- d) La temperatura óptima "in vitro" de unión de las benzodiazepinas a sus receptores es de 0° C, lejos de la fisiológica y de la existente en la cubeta donde se realiza la agregación (37° C).
- e) Aunque se ha descrito que la ansiedad aumenta los receptores benzodiazepínicos, un aumento de la afinidad podría aparecer como un aumento del número si se está determinando en función de la acción farma-

cológica (26).

- f) Aunque los receptores benzodiazepínicos aumenten en la situación de ansiedad que hemos provocado, no tenemos certeza de que la población plaquetaria de receptores también aumente paralelamente.
- g) Puede ocurrir que la unión de las benzodiazepinas a su receptor plaquetario no se evidencie "in vitro" sino "in vivo".
- h) Dicha fijación puede precisar el ser facilitada mediante el pretratamiento de las muestras o de los animales, con ligandos que eleven la afinidad del receptor benzodiazepínico como Gaba, sus agonistas (muscimol, baclofén), pirazolopiridinas (etazolato, cartazolato, tracazolato), o con la asociación de ambos tipos de compuestos (Gaba o sus agonistas y pirazolopiridinas) en la que existe un sinergismo de potenciación (95, 127, 171).
- i) Podría ocurrir que se precisaran condiciones experimentales diferentes de las del estudio para que las benzodiazepinas se unan a sus receptores plaquetarios (por ejemplo, una incubación más prolongada).

En resumen, los datos obtenidos no nos permiten confirmar indirectamente la existencia de receptores benzodiazepínicos plaquetarios, ni su papel fisiológico en la agregación, ni su participación en los cambios que en la ansiedad experimental se producen en la agregación plaquetaria, aunque tampoco permite excluir la existencia de dichos receptores o su participación en los fenómenos citados.

El presente estudio nos evidencia la necesidad de ampliar la investigación teniendo en cuenta los factores analizados en la discusión. Un protocolo experi-

mental así enriquecido podría proporcionar información sobre los intrigantes aspectos de la funcionalidad de los receptores benzodiazepínicos periféricos, tan pobremente identificados hasta el presente. La reciente obtención de algunos antagonistas específicos de los receptores benzodiazepínicos, permitiría si previamente se han delimitado las funciones en plaquetas del receptor benzodiazepínico plaquetario, completar el estudio farmacológico.

XIV. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la agregación plaquetaria (AGP) inducida por ADP en ratas control (testigos) y con ansiedad provocada por aislamiento, inmovilización y ayuno. El posible efecto de dos benzodiazepinas, diacepán y triazolán con las que las muestras de sangre se incubaron in vitro, se ha estudiado asimismo en ratas normales y en el modelo experimental de ratas ansiosas. De los resultados experimentales proponemos las siguientes conclusiones:

Animales sin ansiedad

1. En los animales testigos la AGP inducida por ADP es dosis-dependiente para los parámetros estudiados: intensidad de agregación (h), tiempo de agregación máxima (t) e índice de desagregación inicial (α).
2. No hay diferencias significativas entre machos y hembras para los parámetros estudiados. Dentro del rango de peso abarcado en el estudio, tampoco influye el factor peso en los citados parámetros.
3. Ninguna de las dosis de diacepán y triazolán ensayadas en el pretratamiento de las muestras, modifica significativamente la AGP comparada con los controles.
4. Sin embargo en las muestras pretratadas con 5 ng/ml de triazolán, se detectó una diferencia entre ambos sexos. Los valores de h y t resultaron inferiores en los machos con respecto a las hembras. Aunque el efecto no se confirmó para otras dosis, indicaría una AGP más rápida y menos intensa en los machos.

Animales ansiosos

5. En los animales testigos la AGP inducida por ADP es dosis-dependiente para los parámetros estudiados (h,

\bar{t} y α).

6. No hay diferencias significativas entre machos y hembras para los parámetros estudiados. Dentro del rango de peso abarcado en el estudio, tampoco influye el peso en los citados parámetros.

7. La AGP en animales con ansiedad provocada, se modifica en el sentido de producirse más rápidamente la agregación plaquetaria máxima (t), que es significativamente inferior en comparación con los testigos sin ansiedad.

8. Ninguna de las dosis de diacepán y triazolán ensayadas en el pretratamiento de las muestras, modifica significativamente la AGP comparada con los controles.

9. La intensidad de la AGP inducida por ADP en muestras pretratadas con 10 ng/ml de triazolán, muestra una diferencia significativa entre ambos sexos. Su valor (h) es significativamente inferior en los machos.

10. En las muestras pretratadas con 500 ng/ml de diacepán, la agregación plaquetaria máxima se induce en los machos en un tiempo significativamente inferior que en las hembras.

XVI. RESUMEN

La descripción reciente de receptores benzodiazepínicos periféricos, con funciones poco conocidas todavía, justifica los trabajos cuya finalidad sea dilucidar tales cuestiones. Como es posible que los receptores benzodiazepínicos plaquetarios jueguen algún papel en la agregación, se ha estudiado experimentalmente las posibles modificaciones de la agregación plaquetaria tras el pretratamiento *in vitro* con estos fármacos. El presente trabajo comprende:

1) Revisión y actualización bibliográfica sobre las benzodiazepinas, con especial detalle de su mecanismo de acción y de los receptores benzodiazepínicos (centrales y periféricos).

2) Relación entre la agregación plaquetaria y el receptor benzodiazepínico plaquetario. El estudio de la misma se desarrolla en tres fases:

a) estudio de la agregación plaquetaria en ratas inducida por diferentes dosis de ADP (1.25, 2.5 y 5 μM) y las variaciones de la misma según el sexo de los animales.

b) modificaciones de la agregación plaquetaria por ADP (2.5 μM) en ratas, tras el pretratamiento *in vitro* con diacepán (0, 100, 500 y 1000 ng/ml) y triazolán (0, 1, 5 y 10 ng/ml).

c) Igual que en la fase anterior, pero utilizando para el estudio ratas en las que se provocó ansiedad experimental mediante aislamiento, inmovilización y ayuno.

Los parámetros medidos en cada agregación han sido la intensidad de la agregación máxima, el tiempo que tarda ésta en alcanzarse y el ángulo de desagregación

inicial, que mide indirectamente la rapidez de reversibilidad del fenómeno.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

- La agregación plaquetaria inducida por ADP en la rata, es dosis-dependiente en ambos sexos para los tres parámetros estudiados, tanto en animales sin ansiedad como en ansiosos.
- La ansiedad acorta significativamente el tiempo que tarda en alcanzarse la agregación máxima.
- Las dosis de diacepán y triazolán ensayadas no modifican significativamente la agregación plaquetaria.
- Tanto el diacepán como el triazolán, parecen modificar de forma no consistente la intensidad y el tiempo de agregación máxima en las muestras de animales machos.

Los resultados obtenidos no nos permiten precisar el papel del receptor benzodiazepínico plaquetario en la génesis y modificaciones de la agregación plaquetaria, aunque ello no excluye su participación.

XVII BIBLIOGRAFIA

1. ALLY, A.I.; Thromboxane A₂ as a posible natural ligand for benzodiazepine receptors. *Neurosci. Lett.*, 7: 31-34, 1981.
2. AMEER, B. Y GREENBLATT, D.J.; Lorazepam: A review of its clinical pharmacological properties and therapeutics uses. *Drugs*, 21: 161-200, 1981.
3. ANDO, J.; ISHIJ, K.; MAKINO, M.; AKUTAGAWA, M. TANAKA, T.; Mechanism of peripheral action of benzodiazepines. *Abstr. 8th Int. Congress Pharmacol.*, pp 950, 1981.
4. ASANO, T. Y OGASAWARA, N.; Chloride-dependent stimulation of GABA and benzodiazepine receptor binding by pentobarbital. *Brain Res.*, 225: 212-216, 1981.
5. ASANO, T. Y OGASAWARA, N.; Stimulation of GABA receptor binding by barbiturates. *Eur. J. Pharmacol.*, 77: 355-357, 1982.
6. BALDESSARINI, R.J.; Drogas usadas en el tratamiento de la ansiedad, pp: 437-442, en: Goodman, A.; Goodman, L.S. y Gilman, A., eds Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 6ª edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 1981.
7. BARKER; J. y Mc BURNEY, R.; GABA and glycine may share the same conductance channel on cultured mammalian neurons. *Nature*, 277: 234-236, 1979.
8. BARNES, C. Y ELTHERINGTON, L.G.; Drug usage in laboratory animal. 2ª ed. University California Press, Los Angeles, 1973.

9. BEER, B.; KLEPNER; C.A.; LIPPA, A.S. Y SQUIRES, R.; Enhancement of ^3H -diazepam binding by SQ 65396: A novel antianxiety agent. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9: 849-851, 1978.
10. BELMONTE, A.; Relajantes musculares centrales. pp: 281-289, en: Espluges, J., ed. Espluges J. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Sistema Nervioso Central. Edit. Saber, Valencia, 1981.
11. BELLANTUONO, C.; REGGI, V.; TOGNONI, G. Y GARATTINI, S.; Benzodiazepine: Clinical Pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, 19: 195-219, 1980.
12. BENAVIDES, J.; GUILLOUX, F. Y RUFAT, P.; In vivo labelling in several rat tissues of peripheral types benzodiazepine binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 99: 1-7, 1984.
13. BOND; A.J.; HAILEY, D.M. Y LADER, M.H.; Plasma concentrations of benzodiazepines. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4: 51-56, 1977.
14. BONETTI, E.P.; PIERI, I. Y CUMIN, R.; Benzodiazepine Antagonist Ro 15-1788: Neurological and Behavioral effects. *Psychopharmacology.* 78: 8-18, 1982.
15. BORN, G.V.R. Y CROSS, N.J.; The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 168: 179-191, 1963.
16. BOURNE, R.C.; ROBINSON, J.D. Y TEALE, J.D.; A simple radioimmunoassay for plasma diazepam and its

- application to single dose studies in man. *Br. J. Pharmacol.*, 63: 371, 1978.
17. BRAESTRUP, C.; ALBRECHTSEN, R. Y SQUIRES, R.F.; High densities of benzodiazepines receptors in human cortical areas. *Nature*, 269: 702-704, 1977.
 18. BRAESTRUP, C. Y SQUIRES, R.F.; Specific benzodiazepines receptors in rat brain characterized by high-affinity (3-H)-diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3805-3809, 1977.
 19. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Ontogenic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain Res.*, 147: 170-173, 1978.
 20. BRAESTRUP, C. Y SQUIRES, R.F.; Brain Specific Benzodiazepine Receptors. *Br. J. Psychiat.*, 133: 249-260, 1978.
 21. BRAESTRUP, C. Y SQUIRES R.F.; Pharmacological characterization of benzodiazepine receptors in the brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 48: 263-270, 1978.
 22. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Multiple benzodiazepine receptors. *TINS* 3: 301-303, 1980.
 23. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Benzodiazepine Receptors. *Arzeim-Forsch/Drugs Res.*, 30: 852-857, 1980.
 24. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Searding for endogenous benzodiazepine receptor ligands. *TIPS* 1: 424-427, 1980.

25. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Gaba reduces binding of H-methyl-betha-carboline-3-carboxylate to brain benzodiazepine receptors. *Nature*, 294: 472-474, 1981.
26. BRAESTRUP, C. Y NIELSEN, M.; Ansiedad. *Lancet*, 2: 192-197, Ed. Esp., 1983.
27. BRECKENRINDGE, A. Y ORME, M.; Interaction of benzodiazepine with oral anticoagulants. pp: 647-654. En: *The Benzodiazepines*, Raven Press, New York, 1973.
28. BRISSETTE, Y. Y GASCON, A.I.; Increase in cardiac toxicity of Ouabain in Dogs after repetitive treatment with diazepam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44: 127-135, 1978.
29. BROGDEM, R.N.; HELL, R.C.; SPEIGHT, T.M. Y AVERY, G.S.; Clobazam: A Review of its pharmacological properties and therapeutic use in anxiety. *Drugs*, 20: 161-178, 1980.
30. BRUGGER, A.J.; Antiepilépticos. pp: 220-245, en Esplugues, J. Ed. Esplugues, J. *Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Sistema Nervioso Central*. Edit. Saber, Valencia, 1981.
31. BURCH, T.P. Y TICKU, M.K.; Histidine modification with diethyl pirocarbonate shows heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Neurobiology* 78: 3945-3949, 1981.

32. CALDERINI, G.; BONETTI, A.C.; ALDINIO, A.; Functional interaction between benzodiazepine y Gaba recognition sites in aged rats. *Neurobiol. Aging*, 2: 309-313, 1981.
33. CASTILLO, J.R.; CARRASCO, A. Y TORRES, F.; Effects of benzodiazepines on digoxin tissue concentrations and plasma protein binding. *J. Pharm. Pharmacol.*, 35: 462-463, 1983.
34. CERSKUS, I. Y PHIL, R.B.; Relationship of inhibition of prostaglandin synthesis in platelets to anti-agregatory and antiinflammatory activity of some benzoic acid-derivates. *Agent Action*, 11: 281-286, 1981.
35. CONSEJO GENERAL DE COLEGIO OFICIALES DE FARMACEUTICOS; Benzodiacepinas. *Panorama Actual Medicamento.*, 60: 5-14, 1983.
36. COSTA, E. Y GUIDOTTI, R.; Molecular mechanisms in receptor action of benzodiacepinas. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19: 531-545, 1979.
37. COSTA, T.; RODBARD, D. Y PERT, C.; Is the benzodiazepine receptor coupled to a chloride ion channel. *Nature*, 277: 315-317, 1979.
38. COWEN, P.J.; GREEN, A.R.; NUTT, D.J. Y MARTIN, I.; Ethyl-betacarboline carboxylate lowers seizure threshold and antagonizes flurazepam-induced sedation in rats. *Nature*, 290: 54-55, 1981.

39. CRIPPEN, G.D.; Distance geometry analysis of the benzodiazepine binding site. *Mol. Pharmacol.*, 22: 11-19, 1982.
40. CHANG, R.S.L. Y SNYDER, S.H.; Benzodiazepine receptors: Labelling in intact animals with (3-H)-Flunitrazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 48: 213-218, 1978.
41. Choice of benzodiazepines. *Med. Lett. Drugs Ther.*, 3: 63-65, 1981.
42. DANGOUMAN, J. Y BEGAND, B. Imputabilité des effets indésirables des médicaments. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2995-2998, 1982.
43. DAVIES, L.P.; Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. *Eur. J. Pharmacol.*, 73: 209, 1981.
44. DAVIES, L.P., CHOW, S.C.; JOHNSTON, G.A.R.; Interaction of purines and related compounds with photoaffinity-labelled benzodiazepine receptors in rat brain membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, 97: 325-329, 1984.
45. DAVIS, W.C. Y TICKU, M.K.; Ethanol enhances (3-H)-diazepam binding at the benzodiazepine-GABA-receptor-Ionophore complex. *Mol. Pharmacol.*, 20: 287-294, 1981.
46. DAVIS, W.C. Y TICKU, M.K.; Picrotoxin and diazepam bind to two distinct proteins: Further evidence that pentobarbital may act at the picrotoxinin site. *J. Neurosci.*, 1: 1036-1042, 1981.

47. DAWSON, G.W., JUE, S.G. Y BROGDEN, R.N.; Alprazolam: A Review of its pharmacodynamic properties and efficacy in the treatment of anxiety and depression. *Drugs* 27: 132-147, 1984.
48. DE ANDRES, R. Y TRELLEN, F.; Fármacos ansiolíticos. pp: 417-425, en: Lorenzo Velázquez, B. edit. Lorenzo Velázquez, B. *Farmacología y su proyección a la clínica*, 14ª edic., Oteo, Madrid, 1979.
49. DEMENT, W.C.; Les troubles des sommeil et ce qui le sous-tend. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2967-2980, 1982.
50. DEPARTEMENT OF EXPERIMENTAL PSYCHOLOGY UNIVERSITY OF CAMBRIDGE; Animal models of anxiety and benzodiazepine actions. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 30: 862-868, 1980.
51. DESMOND, P.; ROBERT, R.; WILKINSON, G.; WOOD, A.; DUNN, D. Y SCHENKER, S. The effect of heparin on benzodiazepine binding in plasma. *Drug Disposition* 3: 743, 1980.
52. DESMOND, P.; ROBERT, R.; WOOD, A.; DUNN, D.; WILKINSON, G. Y SCHENKER, S.; Effect of heparin administration on plasma binding of benzodiazepines. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 9: 171-175, 1980.
53. DINGEMAUSE, J. Y BREIMER, D.D.; Benzodiazepine receptors. *Pharm. Int.*, 5: 33-36, 1984.
54. DOBLE, A. Y IVERSEN, L.L.; Molecular size of benzo-

- diazepine receptor in rat brain in situ: evidence for a functional dimer?. *Nature*, 295: 522-523, 1982.
55. DOBLE, A.; IVERSEN, L.L. Y MARTIN, I.L.; The benzodiazepine binding site: one receptor or two?. *Br. J. Pharmacol.*, 75: 42-44, 1982.
56. DOROW, R.G., SEIDLER, J. Y SCHNEIDER, H.; A radio-receptor assay to study the affinity of benzodiazepine and their receptor binding activity in human plasma including their active metabolites. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 13: 561-565, 1982.
57. DRAY, A. Y STRAUGHAN, D.W.; Benzodiazepine: GABA and glycine receptors on single neurons in the rat medulla. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28: 314-315, 1976.
58. EHLERT, F.J.; ROESKE, W.R. Y YAMAMURA, H.I.; Multiple benzodiazepine receptor and their regulation by GABA. *Life Sci.*, 29: 235-248, 1981.
59. FILE, S.E. Y SIMMONDS, M.A.; Interactions of two phenylquinolines with picrotoxin and benzodiazepine in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, 97: 295-299, 1984.
60. FLOREZ, J.; ARMIJO, J.A. Y MEDIAVILLA, A. Fármacos ansiolíticos, pp: 266-273. En: *Compendio de Farmacología Humana*. Edit. Eunsa, Pamplona, 1980.
61. FLOREZ, J.; ARMIJO, J.A. Y MEDIAVILLA, A.; Farmacología del sueño. Hipnóticos, pp: 280-281; En: *Compendio de Farmacología Humana*, Edit. Eunsa, Pamplona,

na, 1980.

62. FLOREZ, J.; Fármacos ansiolíticos, pp: 102-125; En: Esplugues, J. Edit. Espluges, J. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Sistema Nervioso Central. Ed. Saber, Valencia, 1981.
63. FOSTER, P.; LLOYD, H.G.E.; MORGAN, P.; PARKER, M.; PERKINS, M.N. Y STONE, T.W.; Ethylendiamine acts upon GABA receptors and uptake sites. Br. J. Pharmacol., 74: 274, 1981.
64. FUJIMOTO, M.; HIRAI, K. Y OKABAYASHI, T.; Comparison of the effects of GABA and chloride ion on the affinities of ligands for the benzodiazepine receptor. Life Sci., 30: 51-57, 1982.
65. FUJIMOTO, M.; TAKAYOSHI, K. Y HAWIGER, J.; Adenosine diphosphate induce binding of Von Willebrand factor to human platelets. Nature, 297: 154-156, 1982.
66. GALLAGER, D.W.; Benzodiazepine and gamma-aminobutyric acid. Sleep, 5: S3-S11, 1982.
67. GALLAGER, D.W.; RANCH, S.L. Y MALCOLM, A.B.; Alterations in a low affinity GABA recognition site following chronic benzodiazepine treatment. Eur. J. Pharmacol., 98: 159, 1984.
68. GASCONS, A.L.; Effect of acute stress and ouabain administration on adrenal catecholamine content and cardiac function of rats pretreated with diazepam. Can. J. Physiol. Pharmacol., 55: 65-71, 1977.

69. GEE, K.W.; EHLERT, F.J. Y YAMAMURA, H.I.; Differential effect of gamma aminobutyric acid on benzodiazepine receptor subtypes labeled by 3-H-Propyl-B-Carboline-3-Carboxylate in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 132-137, 1983.
70. GRAEFF, F.G.; Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 14: 239-265, 1981.
71. GREENBLAT, D.J. Y SHADER, R.I.; Benzodiazepine in clinical practice. Raven Press, New York, 1974.
72. GREENBLAT, D.J.; SHADER, R.I.; DIVOLL, M. Y HARMAT, J.S.; Benzodiazepine: A summary of pharmacokinetic properties. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 11: 11s-16s, 1981.
73. GREENBLAT, D.J.; DIVOLL, M.; ABERNATHY, D.R.; OCHS, H.R. Y SHADER, R.I.; Clinical pharmacokinetics of the newer benzodiazepine. *Clin. Pharmacokinet.*, 8: 233-252, 1983.
74. GRIANRDE, M.L.; CHEN, E.H. Y RADULOVACKI, M.; Effects of Diazepam on sleep, Temperature 5-Hydroxindoleacetic and homovainillic acids in cisternal fluid of cats. *Pharmacology*, 19: 149-155, 1979.
75. GUIFFITHS, R.R.; BIGELOW, G.E.; LIEBSON, I. Y KALIR ZAK, J.E.; Drug preference in humans: Double-blind choice comparison of pentobarbital. Diazepam and placebo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215: 649-661, 1980.

76. GUIDOTTI, A.; EBSTEIN, B. Y COSTA, E.; Benzodiazepine gamma aminobutyric acid recognition sites and their endogenous modulators as functional units of gaba receptors. Abstr. 8th Int. Congress Pharmacol., pp 664, 1981.
77. HAEFELY, W. Y MOHLER, H.; El mecanismo de acción de las benzodiazepinas. Edit. Lab. Roche. Nutley, 1981.
78. HAEFELY, W. Y MOHLER, H.; Investigación sobre las benzodiazepinas en los años ochenta. VII Congreso InternationalPsiquiatría. Viena, 1983.
79. HARVEY, S.C.; Hipnóticos y Sedantes. Benzodiazepinas, pp.: 345-354, en: Goodman, A.; Goodman, L.S.; Gilman, A.; eds. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1981.
80. HEEL, R.C.; BROGDEM, R.N.; SPRIGHT, T.M. Y AVERY, G.S.; Temazepam: A Review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an hipnotic. Drugs, 21: 321-340, 1981.
81. HENN, F.A.; ANDERSON, D.J. Y SELLTOM, A.; Possible relationship between gliad cells, dopamine and the effects of antipsychotic drugs. Nature, 266: 637-638, 1977.
82. HIRSCH, J.D. Y LYDIGSEN, J.L.; Binding of bethacarboline-3-carboxylic acid ethyl ester to mouse in benzodiazepine receptor in vivo. Eur. J. Pharmacol.,

723: 357-360, 1981.

83. HIRSCH, J.D.; KOCHMAN, L. Y SUMNER, P.R.; Heterogeneity of brain benzodiazepine receptors demonstrated by (3-H) Propyl- β -Carboline-3-carboxylate binding, 21: 618-628, 1982.
84. HOWELLS, R.D. Y SIMON, E.J.; Benzodiazepine binding in chicken retina and its interaction with γ -amino-butyric acid. Eur. J. Pharmacol., 67: 133-137, 1980.
85. HUMPEL, M.; NIENWEBOER, B.; MILNIS, W.; HANKE, M. Y WENDT, H.; Kinetics and biotransformation of lor-metazepam. Clin. Pharmacol. Ther., 28: 673-679, 1980.
86. HUNKEBER, W.; MOHLER, H. Y PIERI, L.; Selective antagonists of benzodiazepines. Nature, 290: 514-516, 1981.
87. Interacciones adversas de los medicamentos. Med. Lett. Drugs Ther., 3: 37-49, 1981.
88. JOCHENSEN, R.; VAN BOXTEL, C.J. Y BREIMER, D.D.; Pharmacocinétique comparée de cinq benzodiazepines hipnotiques chez le volontaire sain. Nouv. Press Med., 40: 2965-2966, 1982.
89. KANTO, J.H.; Use of benzodiazepines during pregnancy labour and lactation, with particular reference to pharmacokinetics considerations. Drugs, 23: 354-380. 1982.

90. KLEPNER, C.A.; LIPPA, A.S.; BENSON, D.I.; SARRO, M.C. Y BEER, B.; Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11: 457-462, 1979.
91. KLOTZ, N.; ANTONIN, K.H. Y BIECK, P.; Food intake and plasma binding of diazepam. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 4: 85, 1977.
92. KOCHMAN, R.L. Y HISCH, R.D.; Thermodynamic changer associated with benzodiazepines and alkyl β -carboline-3-carboxylate binding to rat brain homogenates. *Pharmacology*, 22: 335-341, 1982.
93. LADER, M. Y PETTURSON, H.; Rational use of anxiolytic sedative drugs. *Drugs*, 25: 514-528, 1983.
94. LAURENCE, D.R. Y BENNET, P.N.; *Clinical Pharmacology*, Fifth edit., Edit. Churchill Livingstone Edinburgh, 1980.
95. LEEB-LUNDBERG, F.; SNOWMAN, A. Y OLSEN, R.W.; Perturbation of benzodiazepine receptors binding by pyrazolopyridines involves picrotoxinin barbiturate receptor sites. *J. Neurosci.*, 1: 471-477, 1981.
96. LEMPERIERE, T. Y ADES, J.; Comment s'inscrit l'insomnie dans les cadres de la nosographie psychiatrique. *Nouv. Presse Med.*: 2981-86, 1983.
97. LEONARD, B.E.; Neuropharmacology of anxiolytic drugs: A selected review of the field. *Drug Develop. Res. Suppl.*, 1: 1-11, 1982.

98. LIPPA, A.S.; Benzodiazepine receptors: cellular and behavioral characteristics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 10: 831-843, 1979.
99. LO, M.M.S.; STITTMATER, S.M. Y SNYDER, S.H.; Physical separation and characterization of two types of benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Neurobiol.*, 79: 680-684, 1982.
100. MARANGOS, P. Y CRAWLEY, J.N.; Chronic benzodiazepine treatment increases muscimol binding in mouse brain. *Neuropharmacology*, 21: 81-84, 1982.
101. MARKS, J.; Las benzodiacepinas. Uso, uso excesivo, uso indebido y abuso. Edit. MTP Press Limited Lancaster, 1979.
102. MARTINEZ ORTIZ, L.; Tesis Doctoral: Contribución al estudio del mecanismo de acción hemostático de algunos fármacos antifibrinolíticos. Facultad Farmacia. Barcelona, 1976.
103. MATLA, J. Y LANGWINSKI, R.; Effect of benzodiazepines on the central action of narcotic analgesics. *Pol. J. Pharmacol.*, 34: 135-144, 1982.
104. MATSUMOTO, R. Y FUKUFA, H.; Stimulatory and protective effects of benzodiazepines on gaba receptors labeled with (3-H) muscimol. *Life Sci.*, 30: 935-943, 1982.
105. MCCARTHY, K.D. Y HARDEN, K.; Identification of two benzodiazepine binding sites on cells cultured

- from rat cerebral cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216: 183-191, 1981.
106. MENNINI, T.; COLECCHIA, S.; CACCIA, S. Y GARATTI-NI, S.; Benzodiazepines: Relationship between pharmacological activity in the rat and in vivo receptor binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 529-532, 1980.
107. MIÑANO SANCHEZ, F.J.; Tesis de Licenciatura: Fisiología y Farmacología del GABA. Acción antiarrítmica in vitro e in vivo. Facultad de Medicina. Sevilla, 1982.
108. MOHLER, H. Y OKADA, T.; Benzodiazepine Receptor: Demonstration in the CNS. *Science*, 198: 849-851, 1977.
109. MOHLER, H. Y OKADA, T.; Properties of 3-H-diazepam binding to benzodiazepine-receptor in rat cerebral cortex. *Life Sci.*, 20: 2101-2110, 1977.
110. MOHLER, H. Y OKADA, T.; Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by 3H-Diazepam binding. *Life Sci.*, 22: 985-996, 1978.
111. MOHLER, H.; Benzodiazepine receptors: are these endogenous ligands in the brain may. *TIPS*, 2: 116-119, 1981.
112. MORCILLO, E. Y ESPLUGUES, J.; Hipnóticos. pp: 128-155. En: Esplugues, J. ed. Esplugues, J. En: Pers-

pectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Sistema Nervioso Central. Edit. Saber. Valencia, 1981.

113. MULLER, W.E.; The benzodiazepine-receptor. *Pharmacology*, 22: 153-161, 1981.
114. MURAKI, T.; YAMAZOL, Y. Y KATO, R.; Inhibitor of benzodiazepine and GABA receptor binding by amino-carbolines and other amino acid pyrolysates mutagens. *Eur. J. Pharmacol.*, 98: 35-43, 1984.
115. NICHOLSON, A.N. Y STONE, M.B.; Hypnotic activity and effects on performance of lormetazepam and camazepam-analogues of temazepam. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 13: 433-439, 1982.
116. NIELSEN, M. Y BRAESTRUP, C.; Ethyl B carboline-3-carboxylate show differential interaction. *Nature*, 286: 606-607, 1980.
117. NIELSEN, M.; BRAESTRUP, C. Y SQUIRES, R.F.; Evidence for a late evolutionary appearance of brain-specific benzodiazepine receptors: an investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species. *Brain. Res.*, 141: 342-346, 1977.
118. NIELSEN, M.; SCHON, H. Y BRAESTRUP, C.; 3-H-Propyl-beta carbolines-3-carboxylate in as specifically to brain benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.*, 36: 276-285, 1981.
119. OAKNY, N.R. Y JONES, B.J.; The pro-convulsant and

- diazepan-reversing effects of ethyl-beta-carboline-3-carboxylate. *Eur. J. Pharmacol.*, 68: 381-382, 1980.
120. OLIVE, G. Y REY, E.; Pharmacocinétique comparée des benzodiazepines. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2957-2964, 1982.
121. ORME, M.; BRECKENRIDGE, A. Y BROOKS, R.V.; Interactions of benzodiazepines with warfarine. *Br. Med. J.*, 3: 611-614, 1972.
122. OWEN, R.T. Y TYRER, P.; Benzodiazepine dependence: A review of the evidence. *Drugs*, 25: 385-398, 1983.
123. PAKU, G.E.; BRODGEN, R.N.; HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M. Y AVERY, G.S.; Triazolam: A review of its pharmacological properties and Therapeutic efficacy in Patients with insomnia. *Drugs*, 22: 81-110, 1981.
124. PATAY, M.; Mecanismo de acción de las benzodiacepi nas. *Tiempos Médicos*, 244: 68-70, 1983.
125. PABEL, J.; MARANGOS, P.J. Y GOODWIN, F.K.; 3-H-ethyl-betha carboline-3 carboxylate binding to the benzodiazepine receptor is not affected by GABA. *Eur. J. Pharmacol.*, 72: 131-138, 1981.
126. PAUL, S.M.; ZATS, M. Y SKOLNICK, P.; Demonstration of brain-specific benzodiazepine receptor in rat retina. *Brain. Res.*, 187: 243, 1980.

127. PAUL, S.M.; MARANGOS, P. Y SKOLNICK, P.; The benzodiazepine-GABA-chloride-ionophore receptor complex: Common site of minor tranquilizer action. *Biol. Psychiat.*, 16: 213-229, 1981.
128. PAUL, S.M. Y SKOLNICK, P.; Comparative neuropharmacology of antianxiety drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17: 37-41, 1982.
129. PEREZ, C. Y RUBIO, M.C.; Effects of chronic treatment of rats with diazepam on gabaergic system. *Gen. Pharmacol.*, 2: 489-492, 1981.
130. PIERI, L.; SCHAFFER, R. Y SCHERSDILICHT, R.; Pharmacology of midazolam. *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 31: 2180-2201, 1982.
131. POLE, P. Y HAEFELY, W.; Benzodiazepines enhances the bicuculine-sensitive part of recurrent renshaw inhibition in the cat spinal cord. *Neurosc. Lett.*, 28: 193-197, 1982.
132. PUECH, A.J. Y LANDRAGON, L.; Pharmacodynamie des benzodiazepines. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2953-2955, 1982.
133. QUAIST, U.; MAHLMAN, H. Y VOLLURER, K.O.; Temperature dependence of the benzodiazepine-receptor interaction. *Mol. Pharmacol.*, 22: 20-25, 1982.
134. RAMAYANEYULU, R. Y TICKU, M.K.; Interactions of pentametylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine

- GABA receptor ionophore complex. *Eur. J. Pharmacol.*, 98: 337-345, 1984.
135. REGAN, J.W.; ROESKE, W.R. Y YAMARURA, H.I.; The benzodiazepine receptor: Its developement and its modulation by gamma-aminobutiric acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 212: 137-143, 1980.
136. REGAN, J.W.; ROESKE, W.R. Y YAMAMURA, H.I.; (3-H)-Flunitrazepam binding to bovine retina and the effect of GABA, thereon. *Neuropharmacology*, 19: 413, 1980.
137. REGAN, J.W.; ROESKE, W.R. Y YAMAMURA, H.I.; Renal benzodiazepine binding increases during deoxycorticosterone salt hypertension in rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 67: 167-169, 1980.
138. REGAN, J.W.; ROESKE, W.R.; DESHMUK, H. Y YAMAMURA, H.I.; Alterations in central and peripheral benzodiazepine receptors by monosodium glutamate (MSG) and by experimental hypertension, respectively. *Abstr. 8th Int. Congress Pharmacol.* pp 663, 1981.
139. ROBINSON, D.G. Y AMIDON, E.L.; Interaction of benzodiazepine with warfarin in man. pp: 641-646. *En: The Benzodiazepine.* Edit. Raven Press, New York, 1973.
140. ROUTLEDGE, P.A.; KITCHELL, B.B.; BJRUSSON; T.D.; SKINNER, B.S.; LINNOILA, M. Y SHAUD, D.G.; Diazepam and N-desmethyldiazepam redistribution after heparine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 27: 528-532,

1980.

141. RUTHERFORD, D.M.; OKOKO, A. Y TYRER, P.J.; Plasma concentration of diazepam and desmethyldiazepam during chronic diazepam therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 6: 69-74, 1978.
142. SABATO, U.C.; AGUILAR, J.S. Y ROBERTIN, E.; Benzodiazepine receptor in rat brain: Action of Triton X-100 and localization in relation to the synaptic region. *J. Recept. Res.*, 2: 119-133, 1981.
143. SADEE, W. Y BEELEN, G.C.M.; Drug level monitoring. Analytical, techniques, metabolism and pharmacokinetics. Edit. John Wilry and Sons, San Francisco, 1980.
144. SCHELEIFOR, I.S. Y RALL, W.T.; Drogas efectivas en el tratamiento de la epilepsia. Benzodiazepinas. pp. 466-467, en: Goodman, A.; Goodman, I.S. y Gilman's. Ed. Goodman y Gilman's. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6ª ed., edit. Panamericana, Buenos Aires, 1981.
145. SCHNEIDER, J. Y KAMM, G.; Beeinflusst oxacepam (Adumbram) die antikoagulanzen-therapie mit phenprocoumon. *Med. Klin.* 73: 153-156, 1982.
146. SCHOEMABER, H.; BOLES, R.G.; HORST, W.D. Y YAMAMURA, H.I.; Specific high-affinity binding sites for (3-H)-Ro-5-4864 in rat brain and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 61-69, 1983.

147. SCHWERI, M.; CAIN, M.; COOK, J.; PAUL, S. Y SKOLNIK, P.; Blockade of 3-carbomethoxy- β -carboline induced seizures by diazepam and the benzodiazepines antagonist, Ro-15-1788 and CGS8216. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17: 457-460, 1982.
148. SCHUTZ, H.; *Benzodiazepines*. Edit. Springer-Verlag Heidelberg. Berlin, 1982.
149. SHADER, R.I. Y GREENBLATT, D.J.; The use of benzodiazepines in clinical practice. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 11: 5S-9S, 1981.
150. SHADER, R.I.; *Benzodiazepines in clinical medicine*. Discussion. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 11: 55S-59S, 1981.
151. SKERRITT, J.H.; WILLOW, M. Y JOHNSTON, G.; Diazepam affinity gaba binding to rat brain membranes. *Neurosci. Lett.*, 29: 63-66, 1982.
152. SKOLNICK, P.H.; Increase benzodiazepine receptor number elicited in vitro by a novel purine. EMD 28422. *Eur. J. Pharmacol.*, 67: 179-186, 1980.
153. SIMASKO, S. Y HORITA, A.; Chlordiazepoxide displaces Thyrotropin-releasing hormone (TRH) binding. *Eur. J. Pharmacol.*, 98: 419-423, 1984.
154. SIMMONDS, M.A.; Distinction between the effects of barbiturates, benzodiazepines and phenytoin in responses to aminobutyric acid receptor activation and antagonism by bicuculine and picrotoxin. *Br.*

- J. Pharmacol., 73: 739-747, 1981.
155. SIMON, P. Y LECRUBIR, Y.; Effects secondaires et dangers des benzodiazepines. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2999-3002, 1982.
156. SKOLNICK, P.; SCHEWERI, M.; KUTTER, E.; WILLIAMS, E. Y PAUL, S.; Inhibition of (3-H)-Diazepan and (3-H)-3-carboethoxy- β -carboline binding by irazepine: Evidence for multiple "Domains" of the benzodiazepine-receptor. *Neurochem.*, 39: 1142-1146, 1983.
157. SNEDECOR, G.W.; *Statistical Methods*. The Iowa State University Press. Ames. Iowa, 1967.
158. SOCIAS, S.; RODRIGUEZ, A. Y SELLES, E.; Benzodiazepínicos: estudio galénico y uso clínico. *Farmacia Clínica*, 1: 167-177, 1983.
159. SQUIRES, R.F. Y BRAESTRUP, C.; Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, 266: 732-734, 1977.
160. STEIN, L.; Behavioral Neurochemisty of benzodiazepines. *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 30: 868-874, 1980.
161. STEINER, F.A. Y FELIX, D.; Antagonistic effects of GABA and Benzodiazepines on vestibular and cerebellar neurones. *Nature*, 260: 346-347, 1976.
162. STEPAUSKI, E.; ZORICK, F.; KAFFEMAN, M.; SICKLESTEEL, J. Y ROTH, T.; Effects de l'administration

- chronique de triazolam 0'50 mg sur le sommeil des insomniaques. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2987-2990, 1982.
163. STADER, R.I. Y GREENBLATT, D.; Implicaciones clínicas de la farmacocinética benzodiazepínica. *Am. J. Psych.*, 134: 6, 1977.
164. TALLMAN, J.F.; THOMAS, J.W. Y GALLAGER, D.W.; Gabaergic modulation of benzodiazepine binding sensitivity. *Nature*, 274: 383-385, 1978.
165. TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T. Y SPECTOR, S.; Properties of (3-H)-diazepam binding to rat peritoneal mast cells. *Life Sci.*, 27: 171-178, 1980.
166. TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T. Y SPECTOR, S.; Alteration of benzodiazepine binding to platelet and kidney in spontaneously hypertensive rats. *Abstr. 8th. Int. Congress Pharmacol.*, pp 663, 1981.
167. TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T. Y SPECTOR, S.; Changes in platelet and renal benzodiazepine binding in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 587-588, 1981.
168. TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T. Y SPECTOR, S.; (3-H)-Diazepam binding sites on rat heart and kidney. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 589-590, 1982.
169. TENEN, S.E. Y HIRSCH, J.D.; Betha carboline-3-carboxylic acid ethyl ester antagonizes diazepam activity. *Nature*, 288: 609-610, 1980.

170. TICKU, M.K. Y DAVIS, W.C.; Evidence that ethanol and pentobarbital enhance (3-H)-diazepam binding at the benzodiazepine-GABA receptor ionophore complex indirectly. *Eur. J. Pharmacol.*, 75: 521-522, 1981.
171. TICKU, M.K. Y DAVIS, W.C.; Molecular interaction of Etazolate with benzodiazepine and picrotoxinin binding sites. *J. Neurochem.*, 38: 1180-1182, 1982.
172. TOLL, L.; KEYS, C.; SPANGLER, D. Y LOEW, G.; Computer-assisted determination of benzodiazepine receptor heterogeneity. *Eur. J. Pharmacol.* 99: 203-209, 1984.
173. TURMEL, A. Y DE MONTIGNY, C.; Sensitization of oral forebrain neurons to serotonin by adinazolam, an antidepressant triazolobenzodiazepine. *Eur. J. Pharmacol.*, 99: 241-243, 1984.
174. TURSKI, W.A.; SCHWARZ, M.; TURSKI, I. Y SONTAG, K.H.; A specific benzodiazepine antagonist CGS-8216 reverses the muscle relaxant effect of diazepam but not that of phenobarbitone. *Eur. J. Pharmacol.*, 98: 441-444, 1984.
175. UENO, E.; Y KURIYAMA, K.; Phospholipids and benzodiazepine recognition sites of brain synaptic membranes. *Neuropharmacology*, 20: 1169-1176, 1981.
176. UNNERSTALL, J.R.; KUCHAR, M.J.; NIEHOFF, D.L. Y PALACIOS, J.M.; Benzodiazepine-Receptors are coupled to a subpopulation of gamma aminobutyric acid (GA-

- BA) receptors: Evidence from a quantitative autoradiographic study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218: 797-804, 1981.
177. VANNCCHI, S.; FIBBI, G.; PASQUALI, F.; ROSSO, M.; CAPELLETI, R. Y CHIANGI, V.; Adhesion-dependant heparin production by platelets. *Nature*, 296: 352-353, 1982.
178. VETEL, J.M.; L'essai therapeutique en ville. A propos de l'essai du triazolan. *Nouv. Presse Med.*, 40: 2991-2994, 1982.
179. VERICAT, F.; Tesis de Licenciatura: Estudio de algunos parámetros fisiológicos en la rata. Facultad de Farmacia, Barcelona, 1970.
180. VILLIGER, J.W.; TAYLOR, M. Y GLUCKMAN, P.D.; Characteristics of type 1 and type 2 benzodiazepine receptors in the ovine brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16: 373-375, 1982.
181. VOLICE, L.; BIAGIONI, T.M.; Presence of two benzodiazepine-binding sites in the rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 38: 591-593, 1982.
182. WALKER, C.R. Y PEACOCK, J.H.; Diazepam binding of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Develop. Brain Res.*, 1: 565-578, 1980.
183. WALKER, C.R. Y PEACOCK, J.H.; Development of gammaergic function of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Develop. Brain Res.*, 2: 541-

- 555, 1982.
184. WANG, J.K.T.; TANIGUCHI, T. Y SPECTOR, S.; Properties of (3-H)-diazepam binding sites on rat blood platelets. *Life Sci.*, 27: 1881-1888, 1980.
 185. WANG, R.I.H.; *Practical Drug Therapy*. J.B. Lippincot Company, Filadelfia, 1979.
 186. WASTEK, G.; SPETH, R.; REISINE, T. Y YAMAMURA, H. I.; The effect of GABA on (3-H)-flunitrazepan binding in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 50: 445-447, 1978.
 187. WEINTIANB, M.; Difficultie et biais dans l'attribution des effets indeseables des medicaments. *Nouv. Presse Med.*, 40: 3003-3005, 1982.
 188. WISSMAN; B.A.; COOT, J.; HOMMER, D.; PAUL, S. Y SKOLNICK, P.; Electrophysiological and pharmacological actions of the convulsant benzodiazepine, Ro-5-4864. *Eur. J. Pharmacol.*, 97: 257-263, 1984.
 189. WOOD, P.L.; ETIENNE, P.; LAL, S. Y VASANANAI, N. P.; Gabaergic regulation of nigrostriatal neurons: coupling of benzodiazepine and GABA receptors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*, 6: 471-474, 1982.
 190. WU, J.Y.; SU, Y.Y.T.; LAM, D.M.K. Y WANG, W.M.; Characterization of benzodiazepine receptor. *Abstr. 8th. Int. Congress Pharmacol.*, pp 664, 1981.

191. YAMAMURA, H.I.; MIMAKI, T.; YAMAMURA, S.H.; HORST, W.D.; MORELLI, M.; BAUTZ, G. Y OBRIEN, R.A.; 3-H-Cl 218872, A novel triazolopyridazine which labels the benzodiazepine receptor in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 77: 351-354, 1982.
192. YOUNG, W.S.; NIEHOFF, D.; KUCHAR, M.J.; BEER, B. Y LIPP, S.A.; Multiple benzodiazepine receptor localization by light microscopic radiohistochemistry. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216: 425-530, 1981.
193. GARCIA-LEON, F.J.; Intento de suicidio por medicamentos HUS 1976-1979. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina. Sevilla, 1981.
194. CASTILLO-FERRANDO, J.R.; RUEDA, T.; SERRANO, J.S. Y PEREZ-OJEDA, E.; Papel de los receptores benzodiazepínicos en el inotropismo cardiaco. *Rev. Esp. Cardiol.*, 37: 27, 1984.