

R. 14929 0

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

T. D.
M/81

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA

SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 133 número 22 del libro
correspondiente.

Sevilla, 12 MAYO 1987

El Jefe del Negociado de Tesis,

H. Yolanda Diaz Roldán



PAPEL DE LOS RECEPTORES BENZODIACEPINICOS PERIFERICOS
EN EL CORAZON AISLADO DE RATA.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la

de esta Universidad desde el día

hasta el día

Sevilla de

EL DIRECTOR DE

TESIS DOCTORAL presentada por:
de 19

Guillermo Machuca Portillo

Sevilla, 1.987



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
41009 - SEVILLA

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


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

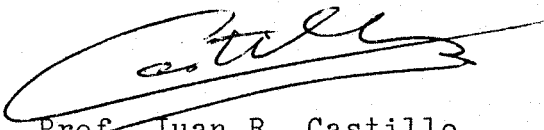
JUAN R. CASTILLO FERRANDO, Doctor en Medicina y
Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Far-
macología y Terapéutica de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que D. Guillermo Machuca Portillo, Licenciado -
en Medicina y Cirugía ha realizado bajo su tutela
y dirección el trabajo: Papel de los receptores --
benzodiazepínicos periféricos en el corazón aisla-
do de rata, que consideramos satisfactorio para --
optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Sevilla, de Mayo de 1.987


Prof. José S. Serrano


Prof. Juan R. Castillo



A mis padres,

A mis amigos Angel y Hugo y
a sus respectivas familias,

A Chemi,

A Angeles.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y de una manera especial agradecer a los directores de esta Tesis, Prof. Dr. José S. Serrano Molina y Prof. Dr. Juan R. Castillo Ferrando su orientación, consejo y apoyo a lo largo de la misma, habiendo empleado para ello incluso su tiempo de descanso personal.

A los componentes del Departamento de Farmacología, y especialmente al alumno interno D. Francisco Federero y al Dr. Manuel Romero González, así como a todo el personal que trabajando en líneas de investigación afines me ofrecieron su consejo desinteresado y amistad.

Al estudiante de quinto año de esta licenciatura D. José M. Martínez-Sahuquillo y a Dña. Teresa Soto, por su inestimable y eficaz colaboración en el tratamiento informático del texto y en la realización de las fotografías que lo ilustran.

A D. Julio Moreno por el diseño del tratamiento estadístico de los resultados.

A Dña. Angeles Rufino Charlo, por su esmerado trabajo en la realización de tablas y figuras.

A los Laboratorios Pharmuka, de París por el diligente suministro de los fármacos utilizados en el trabajo experimental.

INDICE

"PAPEL DE LOS RECEPTORES BENZODIACEPINICOS PERIFERICOS EN EL CORAZON AISLADO DE RATA".

INTRODUCCION	6
1) Introducción histórica.....	7
2) Química.....	9
3) Farmacocinética.....	12
3.a. Absorción.....	12
3.a.1. Liposolubles.....	12
3.a.2. Hidrosolubles.....	13
3.b. Distribución.....	14
3.b.1. Fijación a proteínas	14
3.b.1. Volumen de distribnución.....	15
4) Propiedades farmacodinámicas.....	21
4.a.El receptor benzodiacépinico.....	22
4.a.1. Evolución ontogénica.....	23
4.a.2. Estructura.....	23
4.a.3. Localización.....	24
4.a.3.I. Receptores benzo-	
diacepínicos centrales.....	24
4.a.3.II Receptores benzo-	
diacepínicos periféricos....	29
4.b. Mecanismo de acción de las benzodia-	
cepinas.....	32
4.b.1. Sobre la acción gabaérgica...	41
4.b.2. Sobre canales iónicos.....	46
4.b.3. Sobre receptores periféricos.	47
5) Efectos farmacológicos.....	51

5.a. Acción ansiolítica.....	51
5.a.1. Estudios en animales.....	51
5.a.2. Estudios en humanos.....	52
5.a.3. Estudios neurofarmacológicos	52
5.b. Efectos sedantes e hipnóticos.....	54
5.c. Efecto sobre la memoria.....	55
5.d. Acción anticonvulsivante.....	55
5.e. Acción antiepiléptica.....	55
5.f. Acción miorrelajante.....	56
5.g. Otros efectos.....	57
5.g.1. Cardiovasculares.....	57
5.g.2. Respiración.....	58
5.g.3. Gastrointestinales.....	59
5.g.4. Obstétricos y ginecológicos.	59
5.g.5. Dismorfogénesis.....	60
5.g.6. Oftalmológicos.....	60
5.g.7. Metabólicos.....	61
6) Indicaciones terapéuticas.....	62
6.a. Ansiolítico.....	62
6.a.1. Neurosis ansiosa.....	62
6.a.2. Depresión ansiosa.....	63
6.a.3. Ansiedad de tipo reactivo...	63
6.a.4. Neurosis fóbicas.....	63
6.a.5. Fármacos más usados y dosis.	64
6.b. Psicosis.....	64
6.c. Tratamiento del alcoholismo.....	64

6.c.1. Abstinencia al alcohol.....	65
6.c.2. Alcoholismo crónico.....	65
6.d. Tratamiento de alteraciones musculares....	66
6.d.1. Uso en espasticidad muscular.	66
6.d.2. Uso en convulsiones repetidas	67
6.e. Uso como hipnótico y anestésico.....	68
7) Efectos indeseables.....	70
7.a. Tolerancia.....	70
7.b. Dependencia física.....	71
7.c. Interacciones.....	74
7.d. Toxicidad en el SNC.....	75
7.e. Otros.....	75
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	77
MATERIAL Y METODOS.....	82
RESULTADOS.....	89
DISCUSION.....	98
CONCLUSIONES.....	109
RESUMEN.....	113

TABLAS	118
FIGURAS	154
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	200

INTRODUCCION.



1 Introducción histórica.

La historia de las benzodiazepinas se inicia a mediados de 1.930, cuando Leo H. Sternbach sintetiza varios compuestos, que se denominaron heptoxidiacinas (7 anillos) mientras trabajaba sobre la estructura de las benzofenonas en Cracovia (Polonia). Su descubridor no pareció mostrar demasiado interés por estos compuestos, hasta que en 1.954, asociado a los laboratorios Roche, que deseaban encontrar drogas psicofarmacológicamente activas, comenzó a estudiar en profundidad estos compuestos, viendo como en realidad no se trataba de 7 sino de 6 anillos.

El propio Sternbach sintetizó 40 derivados de esta molécula, todos ellos inertes, hasta que se le ocurrió tratar a uno de ellos con metilamina, surgiendo un compuesto denominado R05-0690, que sería el nuevo clordiazepóxido. Su síntesis puede ser atribuida, al menos en parte, al azar, ya que la síntesis de esta primera benzodiazepina fue el resultado de un esfuerzo desafortunado por sintetizar una quinazolona (metacualona).

Pero no fué hasta 1.957 cuando se descubre (Randall también en los laboratorios Roche) que tiene un interesante efecto relajante muscular, antiestricnínico, hipnótico y bloqueante de los reflejos medulares en animales de experimentación (ratones y gatos).

Más tarde, en 1.960, el mismo Randall y cols. informaron que producía un efecto de "amansamiento" en

varias especies de animales a dosis mucho más bajas de las que producía ataxia o hipnosis mensurable, siendo el estudio de esta propiedad en monos lo que hizo que se probara el fármaco en humanos para tratar la ansiedad. Estos estudios, y otros para determinar la actividad farmacológica, fueron llevados a cabo por Randall y Kappel en ese mismo año.

El 24 de febrero de 1.960 se comercializa en los Estados Unidos el clordiacepóxido, bajo el nombre de Librium, y a partir de ese momento se dispara el interés y la producción de estos compuestos, siendo un hito importante en el desarrollo de estas drogas la aparición del diacepán (Valium) en diciembre de 1.963 (sintetizado por Randall en 1,959), que aunque tenía la misma capacidad tóxica que el clordiacepóxido, tenía 10 veces más potencia como relajante muscular y anticonvulsivante. Este fármaco se sitúa hoy día en el número 1 del consumo mundial de ansiolíticos.

Hasta nuestros días, la síntesis de nuevas benzodiacepinas, y el estudio de las propiedades y mecanismos de acción de las ya existentes, ha sido una constante por permanecer oscuros muchos de estos procesos, lo que justifica nuestro estudio para esclarecerlos (1, 2, 3, 4, 5).

2. Química.

Las benzodiazepinas son fármacos que derivan del núcleo fundamental 1,4 benzodiazepina. El conocimiento de su estructura lo justifica el hecho de que aunque muchas de ellas poseen propiedades idénticas, la potencia farmacológica, las propiedades farmacocinéticas o la selectividad de algunas acciones se ven modificadas por algunos determinantes de su estructura (6).

Su nombre deriva del hecho de poseer un anillo benzénico, otro del tipo "diazepina" (heterociclo heptagonal) y átomos de nitrógeno en los carbonos 1 y 4 (3).

Estructuralmente las benzodiazepinas se pueden dividir en dos subcategorías (Fig. 1):

- Las 2-amino-4-oxidadas.
- Las 1,3-dihidro-2-cetonas.

Entre las primeras se encuentra el clordiazepóxido (que está entre las más activas). Dentro de este grupo, la sustitución en el carbono 2 por un grupo metilamina es la óptima para reducir la actividad. Algunas sustituciones en el carbono 3 también pueden restarles potencia. Para la actividad psicofarmacológica es fundamental un grupo electro-negativo en el carbono 7 (las sustituciones en este punto por un átomo de cloro, de bromo o de nitrógeno aumentan la actividad farmacológica, sobre todo en el primer caso; la sustitución por un grupo trifluorometil aumenta las propiedades anticonvulsivantes). También es fundamental para su óptima

actividad sustitución fenil en el carbono 5.

Dentro del segundo grupo, generalmente de potencia mayor que el primero, son fundamentales también las sustituciones en el carbono 7 : nitrógeno, cloro, bromo y flúor disminuyen su potencia farmacológica en el orden indicado; la sustitución trifluorometil produce un gran aumento de la potencia, grupos fenilo y sustituyentes de larga cadena parecen reducir su actividad. Las sustituciones por grupos fenilo en el carbono 5 mejora la actividad, que puede ser reducida por otras sustituciones en este punto. La reducción del doble enlace entre los átomos 4 y 5 también puede reducir su actividad. En N-1 la mejor sustitución es un grupo metilo, ya que otros átomos o sustituyentes de larga cadena reducen su actividad significativamente. La sustitución en este lugar por grupos acetamida deprimen su actividad relajante muscular (2).

La estructura del diacepán (la benzodiazepina más generalizada) y de dos de sus derivados se encuentra en la figura 2. Clonacepán es un fármaco anticonvulsivante activo en el receptor benzodiazepínico de tipo central, al que se une con afinidad nanomolecular (7,8).

En contraste, la benzodiazepina utilizada en el presente trabajo es la denominada RO5-4864, que se diferencia del diacepán, de la que deriva, tan sólo en una sustitución del 4-p cloro, siendo por esto inactiva en los sitios clásicos de fijación en el SNC. Por otro lado es un

potente agonista de los receptores benzodiazepínicos periféricos, a los cuales se une con afinidad nanomolecular, lo que nos ha motivado para su uso (Fig.2) (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

3. Farmacocinética.

3.a. Absorción:

Las benzodiazepinas por regla general se absorben con facilidad por vía oral, rectal y parenteral, siendo la primera vía la más aceptable en clínica, ya que su absorción en tracto digestivo es muy rápida, apareciendo rápidamente en sangre (18). Muchas veces se obtienen niveles superiores por esta vía que por la intramuscular. Además, la vía intramuscular tiende a evitarse, ya que el solvente que se suele utilizar es muy irritante. Algunas benzodiazepinas pueden utilizarse por vía endovenosa, pero su administración debe ser lenta (19).

Aunque por regla general son muy liposolubles (3, 6, 19), podemos clasificarlas de la siguiente forma(20):

3.a.1. Liposolubles:

Entre estas podemos enumerar principalmente al diacepán (uno de los más liposolubles, además de ser relativamente insoluble en agua), flunitracepán, nitracepán, estazolán y triazolán.

Se absorben rápidamente en el tubo digestivo (e incluso en el diacepán esta absorción es más rápida que por vía im., aunque depende de la composición de las tabletas con las que comparemos y del tipo de solvente en el segundo caso), alcanzándose concentracio-

nes máximas en 0.5-2 horas por término medio tras la administración.

La administración de las benzodiazepinas de este subgrupo por vía intramuscular y rectal presenta una menor absorción, si bien se ha observado que el diacepán presenta buenos niveles tras su administración en forma de supositorios (2, 20, 21).

3.a.2. Hidrosolubles:

Entre estas podemos destacar el clordiazepóxido, oxacepán (que por sí mismo es insoluble en agua, pero que es hidrosoluble como el succinato sódico), loracepán, lormetacepán y cloracepato. Su absorción oral es más lenta que la de las liposolubles, y las concentraciones máximas no se alcanzan hasta las 3-6 horas. Por el contrario, por vía im. se absorben bien y rápidamente (2, 20).

3.b. Distribución.

3.b.1. Fijación a proteínas:

Las benzodiazepinas se unen a las proteínas plasmáticas (particularmente a la albúmina) en proporción elevada (19).

El clordiazepóxido se une a la albúmina en una proporción del 87-88%, el diacepán en un 97%, y el oxacepán entre el 87-90%. La benzodiazepina que menor grado de unión a proteínas parece presentar es el

fluracepán.

El grado de unión parece estar relacionado con la liposolubilidad del compuesto, siendo esta unión de tipo estereoespecífico (2, 19, 20).

3.b.2. Volumen de distribución:

Por su liposolubilidad, la distribución de las benzodiazepinas es muy amplia y rápida, atravesando las barreras hematoencefálica y placentaria fácilmente, por lo que se encuentran en el feto niveles comparables con los maternos. El paso es rápido y se localizan en el feto a los 5-10 minutos tras la inyección endovenosa (3, 6, 19, 22, 23).

Cuando alcanzan la circulación son rápidamente captados por la sustancia gris encefálica, a lo que sigue posteriormente una fase más lenta de redistribución en la sustancia blanca y en el tejido adiposo. El volumen de distribución es mayor en obesos y en mujeres (20, 24).

Lo anteriormente expuesto nos indica que la distribución se ajusta a un modelo bicompartimental en la mayoría de los casos (diazepán, sobre todo tras administración iv.), aunque puede ser tricompartmental en algunos muy liposolubles, e incluso monocompartmental en casos como el del triazolán.

La observación del modelo es fácil tras la inyección intravenosa de benzodiazepina, ya que puede

verse:

- Una primera fase de distribución en los tejidos (cuya constante de eliminación se denomina alfa). Mientras más rápida sea esta fase, más corta es la duración del efecto farmacológico.
- Una segunda de eliminación (cuya constante de eliminación se denomina beta). Define la vida media y posibilidades de acumulación del fármaco.

El volumen de distribución del diacepán es de 1'1 l/Kg., y el del clordiacepóxido de 0'3-0'6 l/Kg. (2, 3, 6, 20).

3.c. Biotransformación.

La biotransformación varía para las distintas benzodiazepinas. Su metabolismo es fundamentalmente hepático, mediante uno o dos mecanismos generales, cuales son oxidación o conjugación. La oxidación está mediada por enzimas microsomales hepáticos, implicando tanto la hidroxilación alifática, como la N-desmetilación. La mayoría de las benzodiazepinas son transformadas por este mecanismo.

Entre las transformadas por conjugación se incluyen el oxacepán, loracepán, temacepán o lormetacepán. Estas poseen también una hidroxisustitución y son directamente conjugadas con ácido glucurónico, excretándose metabolitos solubles en agua, que son farmacológicamente inactivos y que aparecen en orina (22).

Otras benzodiazepinas como el cloracepato o el fluracepán se metabolizan además en la pared gástrica y en el intestino delgado (20).

En resumen, los procesos metabólicos más importantes son:

- N-desmetilación.
- Hidroxilación.
- Glucuronoconjugación.
- Oxidación (6).

Los derivados conjugados inactivos se excretan por riñón, pero la mayoría han de sufrir modificaciones en su molécula antes de poder ser conjugados, dando lugar a metabolitos intermedios activos, utilizándose como tales algunos de ellos en terapéutica (oxacepán). Ello explica la larga duración de la acción, que no coincide con los niveles plasmáticos del fármaco original (Fig. 3) (19).

El metabolito que podemos considerar más importante dentro de la biotransformación de estos fármacos es el desmetildiazepán o nordiazepán. Su vida media es mayor que la del fármaco de origen (60-90 horas), por tanto su actividad farmacológica se prolonga más allá de la del compuesto primitivo. Podemos dividir a las benzodiazepinas en dos grupos, según su biotransformación:

- I) Aquellas productoras de nordiazepán, de acción duradera y cuya administración repetitiva hace que se acumu-



len fármaco y metabolito, siendo lenta su desaparición del organismo.

II) Las no productoras de esta sustancia, que tienen acción corta, menor riesgo de acumulación y mayor rapidez para equilibrarse y eliminarse. (3, 6, 20).

Las propiedades farmacocinéticas de las principales benzodiazepinas se encuentran en la tabla 1. Las de algunas de las más nuevas benzodiazepinas se recogen en la tabla 2 (22).

Creemos interesante recoger aquí las propiedades de una imidobenzodiazepina, denominada R0-15-1788, estructuralmente relacionada con el midazolam y triazolam y que se comporta como antagonista de receptores benzodiazepínicos. Su distribución es rápida por todo el cuerpo tras una absorción rápida (pico a los 20-90 minutos). La eliminación es rápida, por metabolismo hepático y con un elevado aclaramiento plasmático que resultaba de una corta vida media (menos de 1 hora) (27).

3.d. Eliminación.

Las benzodiazepinas y sus metabolitos se excretan en su mayor parte por orina (70-90%) y el resto en heces (18), excretándose una pequeña fracción por secreción biliar (20). Esta excreción no es muy rápida (18).

El clordiazepóxido es excretado en 7 días,

apareciendo un 60-64% de la dosis total en orina y un 12-18% en heces. Un 15% de los metabolitos urinarios están conjugados con ácido glucurónico. El diacepán se excreta en un 33% como oxacepán, presentándose el 70% de sus metabolitos en orina. El oxacepán se excreta en orina conjugado con ácido glucurónico. El nitracepán aparece en un 65-71% en orina y en un 14-20% en heces (3, 6, 19, 21, 22, 25, 26). La vida media de eliminación es en general muy variable (por ejemplo para triazolam muy corta y quazepam - nueva benzodiazepina con efecto hipnótico-muy larga) (28).

3.e. Modificaciones farmacocinéticas en función de la edad y del estado fisiológico.

Los resultados de numerosos estudios sugieren que todas las benzodiazepinas pasan la barrera placentaria, produciéndose una exposición importante del feto, que depende de la vida media de estos fármacos, de la edad y del grado de madurez enzimática hepática fetal. Se suelen concentrar sobre todo en el corazón (6, 19, 20, 23).

Si son administrados a la madre próximo al momento del parto pueden producir el llamado "síndrome de hipotonía del niño", caracterizado por hipotonía, hipotermia y depresión respiratoria. Al pasar a la leche materna, el lactante presenta pereza al mamar y conviene suspender el tratamiento (20).

Ha sido evaluado extensamente el efecto de la edad, disfunciones hepáticas (cirrosis) y coadministración

de inductores enzimáticos (fenobarbital). En particular la oxidación aparece modificada en ancianos (sobre todo en varones), cirróticos (los estudios con diacepán y diazelmus, una nueva benzodiazepina, denotan un tiempo de recuperación significativamente prolongado tras su administración en estos enfermos) y pacientes en tratamiento con fármacos como la cimetidina, isoniacida, etanol, disulfirán o anticonceptivos estrogénicos (se comprobó que estas mujeres eran más sensibles a los efectos psicomotores tras dosis orales terapéuticas). La conjugación parece estar mucho menos influida (22, 29, 30). Todo esto hace que pueda aumentar la vida media de alguna de estos fármacos, tales como el diacepán o el clordiazepóxido (20, 31).

En un estudio realizado con nitrazepam, entre los hombres de edad había un aumento del volumen de distribución de la droga mayor que en los jóvenes, siendo esto causado por la mayor vida media del fármaco en los primeros, ya que se ha comprobado que el metabolismo del fármaco (estudiado con pruebas referidas al aclaramiento particularmente) no se altera con la edad. Entre las mujeres ancianas y jóvenes no había diferencias de volumen de distribución, vida media o aclaramiento total. En general, podemos afirmar que la fracción libre de nitrazepam en el plasma no se alteró con relación con la edad o el sexo (32).

En la obesidad aparece aumentado el volu-

men de distribución y la vida media. En estudios con alprazolán, triazolán y otros fármacos en sujetos obesos, se ha comprobado que aumenta el volumen de distribución y la vida media(24, 25, 33).

4. Propiedades farmacodinámicas.

La ansiedad es un sintoma importante de la neurosis, consistente en una emoción compleja en la que coexisten en diversa proporción sentimientos personales de temor y angustia, irritabilidad y pérdida de la capacidad de concentración, junto con algunos síntomas somáticos (sudor, náusea, palpitaciones, ...). Con todo, se desconoce la base neurofisiológica o bioquímica de la enfermedad, si bien últimamente se especula que pueda ser la causa de este síndrome una alteración del metabolismo del neurotransmisor 5HT.

Otros estudios han sugerido que la existencia de un péptido ansiógeno endógeno, por lo que no bastaría una disminución del GABA (ver más adelante) para producir ansiedad. Aún así estos mecanismos continúan oscuros (31, 35, 36).

Todo lo referido anteriormente tiene como consecuencia que el mecanismo fundamental de acción de las benzodiazepinas no esté aún perfectamente aclarado, si bien a partir de 1.977, cuando se descubren los receptores para este tipo de fármacos a nivel de SNC, el esclarecimiento de sus propiedades farmacodinámicas da un importante paso adelante (37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

Hoy día la base del mecanismo por el que las benzodiazepinas ejercen su acción se asienta en dos pilares fundamentales:

- El estudio de los receptores específicos para estos fármacos, descubiertos primeramente en el SNC, aunque se han comprobado sus localizaciones a nivel periférico.

- Su relación con algunos neurotransmisores de las sinapsis neuronales, especialmente con el ácido gamma-amino-butírico (GABA) (6, 34, 44, 45).

Sobre estos puntos comenzaremos a tratar a continuación.

4.a. El receptor benzodiazepínico.

4.a.1. Evolución ontogénica.

La aparición de este tipo de receptores en el cerebro de los animales es evolutivamente tardía, ya que en un estudio en 18 especies vertebradas y 5 invertebradas se comprueba que en los primeros animales en que aparecen es en los peces (47,48). De todas formas, en la evolución, la aparición de los receptores benzodiazepínicos periféricos es más tardía que los de tipo central (8).

Ontogénicamente, en estudios realizados en cerebros de ratas y ratones se ha observado como el receptor aparece precozmente en ambas especies, ya que en los primeros por ejemplo se ha observado como el flunitrazepam, isotópicamente marcado (H^3) se puede detectar en preparaciones cerebrales de 17 días de gestación,

aumentando el número de preparaciones rápidamente tras el nacimiento, llegándose a tener la máxima capacidad a los 21 días en el ratón y a los 7 en la rata, de manera que en estos primeros se incrementa la afinidad por el flunitracepán marcado aproximadamente al doble, desde el feto al adulto (48, 49).

Los receptores de tipo periférico, son sólo detectables en mamíferos, y en ratas sólo pueden detectarse uniones al ^3H RO5-4864, lo más temprano una semana antes del nacimiento (8).

Experiencias muy recientes hacen ver la existencia de receptores benzodiazepínicos en invertebrados incluso, pero esto ha de ser investigado en profundidad (50).

4.a.2. Estructura:

Aunque se pensó en un principio que los lugares de reconocimiento de GABA y benzodiazepinas eran los mismos, se ha visto que residen en dos moléculas proteicas de características estructurales diferentes aunque con regulación alostérica ejercida por los segundos sobre la función de los primeros (34, 51). La purificación cromatográfica de estas proteínas en membranas neuronales ha dado como resultado la diferenciación de una proteína de PM de unos 15 Kd. para el receptor gabaérgico a la que no se unió el ^3H -diazepán (52) y otra de 200 Kd. correspondiente al receptor benzodiazepínico.

El modelo de receptor indica la presencia de al menos dos sitios de fijación independientes (53). Según esto, se comprueba la existencia de dos componentes proteínicos solubilizados diferencialmente por varios detergentes: El componente I de 45.000+5.000 daltons y el componente II de 10.000+2.000 daltons.

Se comprobó que el componente I se convierte en el II, de lo que se deduce que la subunidad básica del receptor benzodiazepínico es el componente II. La proporción entre I y II era de 1:3 (20, 53).

Estudios realizados recientemente con zolpidem (hipnótico no benzodiazepínico que se une específicamente al receptor benzodiazepínico tipo I), permiten intuir que el receptor tipo I es el que está unido de una manera particular al receptor GABA (44).

Es interesante reseñar aquí que ha sido demostrado el hecho de que el receptor benzodiazepínico muestra estereoespecificidad para los dos enantiómeros (3S y 3R) del 3-metil-diazepán (54).

4.a.3. Localización:

Podemos distinguir dos localizaciones típicas: Los receptores benzodiazepínicos centrales y los receptores benzodiazepínicos periféricos.

4.a.3.I. Receptores benzodiazepínicos centrales.

Tal como se descubrió para la morfina y

sus derivados (hecho que fué definitivo para el descubrimiento de las endorfinas), estos fármacos se unen también a receptores específicos de las membranas del cerebro de la rata (55, 56).

Una vez establecida la presencia de estos receptores en el cerebro de la rata, se demostró también su existencia en el cerebro humano, en estudios postmortem (15).

Se establecen zonas más o menos densamente pobladas por los receptores, dándose el caso de que entre humanos y ratas se podían establecer perfectas similitudes:

- Zonas de alta densidad: cortex frontal y occipital, cortex cerebelar, lugar fundamental de la acción anticonvulsivante (57, 58), e hipocampo.
- Zonas de densidad intermedia: cuerpo estriado, globus pallidum, hipotálamo, núcleo dentado y retina.
- Zonas de baja densidad: cuerpo calloso, puente, bulbo y médula. En la epifisis también se han demostrado receptores para estos fármacos (59).

Algunos de estos lugares de ligadura han sido autorradiografiados "in vivo" (por ejemplo para globus pallidum y substantia nigra).

Modificaciones de producidas mediante fármacos o situaciones experimentales de ansiedad pueden

alterar la distribución de estos receptores, siendo los lugares más afectados la amígdala o la substancia nigra, y el que menos se afecta por la disregulación el hipotálamo lateral (38, 60, 61, 62, 63, 64, 65). Todo esto parece estar relacionado con la presencia de ligandos endógenos, aislados también en corazón y músculo esquelético (52), de manera que es posible que este modulador endógeno actúe en las membranas neuronales, con un efecto alostérico endógeno para el sitio de reconocimiento del receptor de GABA. De acuerdo con esta hipótesis el modulador puede cambiar su afinidad para el GABA mediante el cambio de conformación del lugar de reconocimiento, activando o inhibiendo un proceso que se ocupa del índice de funcionalidad de los receptores benzodiazepínicos. Esto puede ser importante en el vivo, ya que el rango de orden de potencia de un número pequeño de benzodiazepinas que compiten con la proteína moduladora es similar a aquellas que causan una remisión en el cuadro de la ansiedad, aunque no se sabe si esto expresa una deficiencia de moduladores proteínicos endógenos en dicho cuadro (34, 66, 67, 68). No obstante esto no ha podido, en general, ser completamente ratificado "in vivo" (52).

Estudios recientes han detectado, al menos, 2 especies moleculares distintas de receptores



(51.000 y 55.000 daltons respectivamente).

La población uniforme de receptores benzodiazepínicos que pueden coexistir con más de una conformación es estabilizada por agonistas de estos fármacos, mientras que otra población es estabilizada por los antagonistas (como las beta-carbolinas) (46, 69). Estos datos, unidos a otros basados en la solubilización por varios detergentes, ha establecido la presencia de dos tipos de receptores a nivel central:

- Tipo I, que resisten la solubilización, y mayormente concentrados en córtex cerebelar, cerebro y cuerpo estriado.
- Tipo II, más lentamente solubilizados, que se encuentran fundamentalmente en el hipocampo, aunque también hay cierta densidad en los núcleos putamen y dentado. No obstante, bastantes benzodiazepinas no diferencian entre los dos tipos de receptores (70).

Además, basándose en la afinidad del ^3H -flunitrazepán por el receptor benzodiazepínico, se ha fotografiado en cerebro y córtex cerebelar una proteína de PM 50.000, que se visualizó por autorradiografía y microscopía electrónica. Era un lugar de alta densidad en sinapsis de neuronas gabaérgicas (71).

Según este trabajo y otros (20) se ha propuesto que los efectos anticonvulsivantes y sedantes de las benzodiazepinas serían mediados por GABA, a través

de los receptores tipo II (que son clorodependientes), mientras que los receptores tipo I mediarían efectos ansiolíticos y serían GABA independientes, aunque esto no está en esclarecido totalmente (44, 72, 73).

Se ha demostrado que en el SNC la fijación a los sitios específicos de las membranas de los sinaptosomas de ^3H -diazepam es máxima a temperaturas de 0-4 grados centígrados y se reduce al 95% a la temperatura fisiológica (74). Este efecto de la temperatura tiene gran relación con la heterogenicidad del receptor, y parece deberse a la existencia de distintos estados de conformación de un único receptor. Es admisible, por tanto, que el acoplamiento entre GABA y receptor benzodiazepínico influya en la conformación de éste último receptor, posiblemente por cambios de conformación inducidos alostéricamente, modulados por las conductancias iónicas de cloro y sodio, ya que se ha visto que particularmente el primero interviene de una manera importante en la acción neurofisiológica del receptor GABA, además de que también se ha observado como el efecto del anión es máximo a 0° C y se abole a 37° C (50, 75, 76, 77).

No obstante, la posibilidad de que a 37°C se desnaturalice uno de estos subtipos de receptores no puede excluirse. Para el estudio del efecto de la

temperatura en el mecanismo de acción de las benzodiazepinas tiene también gran relevancia el uso del antagonista de receptores de tipo central RO15-1788 (78, 79, 80, 81).

Por tanto, la baja afinidad de los receptores del tipo II en córtex cerebelar e hipocampo los hace más sensibles que los del tipo I a la influencia del GABA (82), aunque hay quien opine lo contrario (44).

Otros estudios que confirman la presencia de dos tipos de receptores benzodiazepínicos a nivel central son aquellos que demuestran como el diazepam marcado isotópicamente se une con una afinidad 4 veces mayor que el flunitrazepam a los receptores de córtex cerebral y cerebelo, mientras que en hipocampo también el número de receptores era mayor para el diazepam pero con afinidad 17 veces menor que el caso anterior (82).

4.a.3.II. Receptores benzodiazepínicos periféricos.

Casi simultáneamente con el descubrimiento de los receptores centrales para las benzodiazepinas, Braestrup y cols. (15) descubren como en los lugares específicos de fijación cerebral de H^3 -diazepam es característica su baja afinidad para una determinada benzodiazepina, para ellos farmacológicamente inactiva, denominada RO5-4864, cloro-7(p.clorofenil)-5 dihidro-1,3 metil-12H 1,4-benzodiazepina-2-ona, (Fig. 2). En contraste, algunos receptores específicos de H^3 -diazepam en homoge-

neizados de pulmón y riñón de ratas mostraban una baja afinidad por este fármaco (diacepán, 5-30 veces menor que al central), pero gran afinidad para el R05-4864.

En principio no se logró dar explicación a la posible función de estos lugares de fijación periféricos, y no se les atribuyeron efectos clínicos o farmacológicos, aunque estudiando sus patrones de distribución en los tejidos y su localización subcelular (poco usual) se ha llegado a la conclusión de que pueden tener significación en los procesos de crecimiento y diferenciación celulares (8, 12, 37, 61, 83).

No se tardó en demostrar que estos receptores que se podían localizar tanto en cerebro (donde parecen tener una distribución distinta del tipo central) como en riñón presentaban ciertos efectos al actuar el fármaco sobre el receptor de tipo periférico, mientras que los receptores de tipo central permanecían inalterables (8, 12, 84); e incluso se podían producir efectos proconvulsivantes y ansiogénicos en el ratón contrarios a los que cabría esperar de un fármaco de éste grupo (8, 11, 85). Los efectos centrales de los agentes periféricos parecían estar mediados por receptores específicos en las células gliales distribuidas por todo el cerebro, sobre todo en bulbo olfatorio, ventrículos cerebrales (plexo coroidal), así como en todo el sistema visual, olfatorio,

los núcleos de regulación de la presión arterial y los sistemas motores extrapiramidales y vestibulo-cerebelar (10, 58, 86, 87). Por otro lado, el RO5-4864 administrado periféricamente se mostraba como proconvulsivante en algunas experiencias, pudiendo ser antagonizado en algunos casos por RO15-1788 y diacepán, lo que nos lleva a pensar en una participación en sus acciones de los receptores tipo central (8, 88).

El RO5-4864 ejerce sus acciones uniéndose en cerebro a un componente del complejo supramolecular GABA-benzodiazepina-canal de cloro, diferente del lugar de fijación del resto de las benzodiazepinas; sin embargo ni el GABA, ni otros componentes de dicho complejo, como los canales de cloro, afectan a la unión periférica de esta molécula, lo que demuestra que se trata de una unión distinta de la central (89). Es más, los receptores centrales son más abundantes en la fracción sinaptosómica-mitocondrial, y los periféricos en la fracción nuclear, habiéndose estudiado este dato tanto "in vivo" como "in vitro" utilizando el H³-diazepán (12, 74).

Estudios recientes han insinuado la posibilidad de que el receptor benzodiazepínico periférico en SNC sea un complejo formado por el propio receptor, el receptor de tipo central y lugares de afinidad micromolar para la unión de benzodiazepinas ligadas a canales de calcio voltaje-dependientes (8).

Un compuesto no benzodiazepínico derivado isoquinoleínico carboxiamida, el PK 11195, 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinoleíncarboxiamida, desplaza potencialmente al H³-R05-4864 de sus lugares de fijación tanto centrales como periféricos, por lo que ha sido muy útil en el estudio de estos receptores periféricos. Además parece actuar en lugares diferentes que R05-4864 (9, 17).

Otros estudios demostraron que congelando y descongelando los tejidos donde pueden encontrarse los receptores no cambiaba el número de uniones, pero sí la afinidad, que también se elevaba tras el tratamiento con detergentes. Se observó que este aumento de la afinidad para R05-4864 se debía a unos cambios conformacionales en la unión, que liberaba un ligando endógeno que fijaba estrechamente, pero no constantemente, al R05-4864 al lugar de unión periférico. Este estudio y otros similares han permitido demostrar que el R05-4864 se une a un receptor periférico (90).

Estos receptores de la periferia se han caracterizado en mastocitos, plaquetas, pulmón, riñón, páncreas, corazón, glándulas salivares, bazo, hígado, lengua, epitelio nasal, hipófisis, testículo y suprarrenal (con una de las mayores densidades). En intestino y músculo los niveles de detección son muy bajos. Los

ejemplos más relevantes son riñón y tejido endocrino.

Entre las glándulas endocrinas tenemos la cápsula adrenal, que presenta una elevada densidad de receptores en la corteza, pero una virtual ausencia en la médula. En los testículos se sitúan sobre todo en el tejido intersticial, y sólo en bajas densidades en los tubos seminíferos. La distribución en la hipófisis es uniforme, aunque con niveles algo mayores en el lóbulo posterior. Se ha estudiado también en tiroides, pero está aún poco claro el papel de los receptores en dicha localización (8, 10, 13, 59, 91, 92, 93, 94, 95, 96).

La densidad intrarrenal de los lugares de fijación es muy elevada en la corteza, y nula en la médula, cálices menores y arteria renal. Circunscribiéndonos a la nefrona, el mayor acúmulo se sitúa en el túbulo contorneado distal y porción ascendente del asa de Henle.

En las células cebadas tampoco se han encontrado mecanismos que justifiquen la existencia de los receptores benzodiazepínicos, ni siquiera algún efecto sobre la liberación de gránulos de histamina, 5HT, SRS-A, factor quimiotáctico de los eosinófilos o factor activador de las plaquetas (8, 17, 20, 96, 97, 98, 99). En las plaquetas se ha observado recientemente en estudios experimentales en ratas que la ansiedad modifica su agregación, y que empleando diazepam se pueden rever-



tir estos efectos (20, 96).

Poco se sabe como hemos dicho de sus posibles funciones. Se da el caso curioso de que en la hipertensión arterial espontánea están alterados estos receptores, con diferencias entre plaquetas (era mayor el número de alteraciones) y riñón, sin que se sepa la causa (93).

Trabajando con H^3 -diacepán se han encontrado también receptores específicos similares a los de otras localizaciones periféricas en tejido cardiaco de ratas y cobayas. Las proteínas específicas a las que se liga esta molécula marcada son más numerosas en ventrículos derecho e izquierdo y en el septum interventricular, y mucho menos en las aurículas (17, 92, 100).

Del hecho de que el dipiridamol (que inhibe la recaptación de adenosina, y es un vasodilatador coronario) interaccione con los receptores y desplace al H^3 -diacepán se ha querido deducir que el diacepán potencia la acción vasodilatadora coronaria actuando a nivel de la adenosina, por lo que sería recomendable su uso en pacientes con cardiopatía isquémica; también se han postulado efectos antiarrítmicos y de aumento de la contractilidad (92, 101, 102, 103, 104).

Más claro parece estar el hecho de que el R05-4864 sobre aurícula izquierda aislada de rata muestra

un efecto inotrópico negativo, efecto que es antagonizado por el antagonista específico de estos receptores PK 11195 (16).

De cualquier forma, el efecto y la trascendencia clínica de los receptores benzodiazepínicos cardiacos en particular, y de los periféricos en general, se encuentra aún muy oscura.

Llegado a este punto es importante subrayar aquí unas recientes especulaciones que se han realizado sobre la identidad del receptor benzodiazepínico periférico, que parece localizarse en la mitocondria.

La membrana externa mitocondrial contiene un número relativamente pequeño de proteínas de membrana. Sobre esta membrana se encuentra el canal aniónico voltaje-dependiente de la membrana externa mitocondrial que parece ser el transportador de la ligadura periférica de las benzodiazepinas. Su composición molecular y morfológica no está bien definida.

La proteína "poro" de la membrana externa mitocondrial sería una proteína integral transportadora que formaría a través de la membrana externa mitocondrial un canal anión-selectivo y voltaje-dependiente, con un tamaño aproximado de poro de unos 15 Angströms, pudiendo por su tamaño permitir el paso de grandes aniones como el de ADP y ATP a través de la membrana externa mitocon-

drial. La proteína poro también aportaría hexoquinasa a la membrana externa, cuya fijación, es responsable, al menos en parte, del aumento de la tasa de glicolisis de las células tumorales en rápido crecimiento, según demuestran algunos estudios. Esto nos lleva a observar que las benzodiazepinas podrían tener importantes efectos en el metabolismo energético por alteración de los distintos compuestos de alta energía entre compartimentos extra e intramitocondriales o alterando la tasa de glicolisis aerobia. No obstante se requieren más estudios para comprobar todo esto (8, 105).

Se han observado también efectos de las benzodiazepinas sobre el crecimiento y la diferenciación celular, mediados por el tipo periférico de receptor benzodiazepínico, entre los que se incluyen reversión de la melanogénesis en células de melanoma, inducción de la síntesis de hemoglobina en células proeritroleucémicas, inhibición de la proliferación en células de timoma y estimulación de la metilación de fosfolípidos en células C_6 del astrocitoma. Además las benzodiazepinas estimulan el quimiotactismo de los monocitos, y facilita la expresión de factores proto-oncogénos en algunas células nerviosas (8).

Además de estas y otras propiedades, el RO5-4864 disminuye la duración del potencial de acción

intracelular en el corazón, efecto antagonizado por el PK 11195 (17).

Todos estos ejemplos llevan a pensar que los receptores benzodiazepínicos periféricos tienen un importante lugar en modulación del metabolismo celular (8, 17).

4.b. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas sobre la neurotransmisión de las sinapsis neuronales. Su implicación molecular con los receptores.

Tras 20 años de gran utilización clínica, y a pesar de numerosas investigaciones el mecanismo sináptico que constituye el lugar principal de acción de estos fármacos todavía no se conoce de forma segura.

Se han implicado muchos mecanismos neurotransmisores, entre los que destacan:

Catecolaminas: Estas sustancias se han relacionado por estudios que señalan una disminución del recambio telencefálico de dopamina (DA) y del cortical o hipotalámico de noradrenalina (NA) después de la administración de clordiazepóxido, diazepam y nitrazepam si se administraban dosis elevadas. La disminución de la velocidad de turnover cerebral de catecolaminas después de la inyección de benzodiazepinas se interpretó como debida a una disminución del flujo de impulsos de los axones noradrenérgicos y dopaminérgicos, proponiéndose una correlación de la disminución del turnover de las catecolaminas con la acción depresora de éstas. Sin embargo, esta

disminución del recambio catecolaminérgico no está relacionado con la actividad ansiolítica de las benzodiazepinas, aunque sí parece estar relacionado con el efecto hipotensor de las mismas, pudiendo ser el mecanismo una serie de cambios adaptativos en la función alfa-dos noradrenérgica (5, 40, 66).

Serotonina (5HT): También se ha postulado que las benzodiazepinas pueden ejercer sus efectos ansiolíticos reduciendo la acción neurotransmisora serotoninérgica central. Se vio que las benzodiazepinas disminuyen la velocidad del turnover cerebral de serotonina, disminución que está relacionada positivamente con la acción anticonvulsivante y ansiolítica de éstas. El hecho de que la disminución del recambio de 5HT se mantenga después de dosis repetidas de benzodiazepinas (baja tolerancia) y experimentos de inyección intracerebroventricular de serotonina apoyan que la acción depresora de las benzodiazepinas sea a nivel de las sinapsis serotoninérgicas. Pero esto no está nada claro y puede ser una acción indirecta de los fármacos benzodiazepínicos (5, 39, 40, 42, 66, 106).

No obstante, estudios recientes han avalado un importante mecanismo de acción de estas drogas disminuyendo el turnover de 5HT (como vimos), pero probablemente por potenciación de la inhibición mediada por GABA de las neuronas del rafe. Se señala que específicamente la estimulación sobre los receptores $5HTP_2$, y no está del todo claro si también sobre

receptores GABA_B (los estudios con baclofen parecen demostrarlo). Además, de la disminución en el intercambio de 5HT, parece haber también una depleción del precursor de 5HTP (38, 43, 107).

Acetilcolina: Las benzodiazepinas pueden cambiar el contenido y la velocidad del recambio de acetilcolina (ACh) (por ejemplo en intestino delgado donde parece actuar sobre receptores GABA_A), por lo que se sugiere que las neuronas colinérgicas puedan ser un blanco de la acción de las benzodiazepinas. Pero diferentes estudios señalan claramente que la acción primaria es sobre la sinápsis gabaérgicas, ya que es reproducido por el muscimol, que es un potente agonista de estos receptores. Además, es destacable la experiencia que confirma que el efecto anticonvulsivante del diazepam en ratones perdura más de 20 horas, y el efecto sobre el contenido de ACh cerebral menos de 2 (5, 66, 95, 108, 109).

Glicina: Se ha postulado también la posible implicación de este neurotransmisor del SNC en el mecanismo de acción de las benzodiazepinas. Pero aunque ha sido demostrado "in vitro", los resultados "in vivo" son más que cuestionables, ya que en trabajos en gatos y ratones no parece que el diazepam tenga un efecto significativo reduciendo la disminución de la acción inhibitoria de la glicina producida experimentalmente por estriquina (5, 66, 110).

GABA: Se ha postulado que las benzodiazepinas pueden ejercer una acción inhibitoria neuronal en la que

tendría parte importante una acción sinérgica de estar potenciando la acción del ácido gamma-amino-butírico (GABA) (6, 111, 112).

Sin embargo esto sólo ha podido ser parcialmente explicado en el SNC. Algunos hechos que lo corroboran son:

* La propiedad de las benzodiazepinas de facilitar la acción sináptica del GABA (estudiado electrofisiológica y bioquímicamente), sobre todo a nivel postsináptico en gran número de núcleos cerebrales o en sistemas neuronales donde la transmisión gabaérgica es operativa (6, 66, 87, 111, 113, 114, 115, 116, 117, 118).

* La capacidad de los fármacos benzodiazepínicos de disminuir el aumento de GMP_c cerebral que acontece generalmente tras un decrecimiento de la transmisión gabaérgica entre las células de Golgi, estrelladas y en cesto, y respectivas neuronas postsinápticas (1, 57, 66, 119).

* Por estudios realizados con radioligandos de GABA y benzodiazepinas marcados radiactivamente (87, 111, 120, 121).

Un resumen de la acción de estos neurotransmisores se puede ver en la figura 4.

Pese a todo lo dicho, el mecanismo por el que las benzodiazepinas actúan sobre el GABA ha mostrado

muchas controversias, y aún hoy permanece poco claro, de manera que mientras que un grupo de autores sugerían que potencian los efectos gabaérgicos del SNC (la opinión más aceptada hoy día), otro grupo de estudios veían antagonizados los efectos de las benzodiazepinas por el GABA. Otros autores como Steiner y Felix (según se cita en ref. 122) dicen que las benzodiazepinas en cerebelo y núcleo dentado antagonizan la acción inhibitoria del GABA, aunque otros no lo han podido demostrar. Braestrup (56, 60) descartó la interacción directa entre GABA y benzodiazepinas. Kozhechkin y Ostrovskaya (122) postularon que la acción del GABA y benzodiazepinas son sinérgicas, apoyados en que el diazepán potencia la acción del GABA en la actividad espontánea de las neuronas del córtex sensoriomotor, y en la acción inhibitoria del clordiazepóxido en córtex .

4.b.1. Mecanismo por el que las benzodiazepinas modifican la acción gabaérgica.

Una vez visto que la interacción GABA/benzodiazepinas es suficiente para explicar muchos de los efectos electrofisiológicos de estas últimas, se han propuesto diversos mecanismos para aclarar la manera de actuar de las benzodiazepinas en la acción gabaérgica, a saber:

- Facilitación de la transmisión mediada por GABA.
- Potenciación de la inhibición gabaérgica.
- Activación directa de los receptores de GABA, que hoy

día está desmentida (37, 51, 52, 66, 75, 111, 112).

- Antagonismo de la inhibición mediada por GABA (123).

Los mecanismos fisiológicos por los que podrían actuar las benzodiazepinas quedaban sintetizados al final en tres, a saber:

- Aumento de la liberación de GABA.

- Inhibición la recaptación de GABA, en membranas tanto de axones terminales, como de células gliales.

- Facilitación las acciones del GABA, en el receptor postsináptico, como al final parece haberse demostrado que ocurre (66).

En efecto, se ha comprobado que estos fármacos sólo ejercen su acción GABA-mimética cuando la transmisión gabaérgica es funcional, por lo que las benzodiazepinas no pueden ejercer su acción mediante un mecanismo presináptico de liberación, síntesis o recaptación de GABA en sitios de almacenamiento localizados en terminaciones nerviosas como anteriormente se creía. Debemos, por tanto concluir que el mecanismo de acción es de tipo postsináptico (comprobado "in vitro" e "in vivo") (37, 66, 117, 124).

El problema que se nos plantea ahora es dilucidar como se efectua esta acción postsináptica.

Primeramente hemos de reseñar que en las diferentes áreas cerebrales hay distinta densidad de

receptores GABA, dándose el caso de que en estas áreas se agrupan receptores de afinidad distinta, quedando diferenciados estos en receptores GABA₁, de baja afinidad, y otros de alta afinidad que han sido denominados GABA₂. En estos últimos una proteína específica media un mecanismo alostérico, que regula el número y afinidad de los lugares fijadores de GABA, habiéndose estudiado que el diacepán tiene la capacidad de desplazar esta proteína moduladora y facilitar la transmisión gabaérgica por incremento del número de receptores GABA₂ (1, 125). Ambos tipos de receptores fueron clasificados posteriormente del subtipo GABA_A (sensibles al bloqueo con bicuculina), mientras que se denominan GABA_B al subtipo que no era antagonizado por este fármaco, y que sin embargo respondía a la acción del baclofén. Ambos tipos de receptores se distribuyen por SNC (algunos estudios parecen mostrar que la acción antidepresiva de las benzodiazepinas es mediada por receptores GABA_B) e incluso por periferia viéndose que en intestino delgado, por ejemplo, el receptor GABA_A media una contracción a través de una acción colinérgica postgangliónica, y el tipo GABA_B media relajación de la musculatura lisa a través de una acción inhibitoria presináptica en las neuronas colinérgicas postganglionares. Por si fuera poco, estudios con radioligandos parecen mostrar que la benzodiazepina con acción sobre receptores periféricos RO5-4864 actúa mediante una

interacción sobre el receptor GABA_A (38, 45, 85, 95, 109, 126, 127, 128).

Remitiéndonos al mecanismo alostérico de regulación anteriormente citado, debemos pensar que las benzodiazepinas han de actuar normalmente potenciando la acción del GABA en sus receptores por desplazamiento de una proteína moduladora endógena, que forma parte de un complejo macromolecular constituido por el receptor GABA y el ionóforo (52, 111). Este mecanismo podría depender de la fijación de alta especificidad de las benzodiazepinas en un lugar regulador cerca del receptor GABA. Por lo tanto este sitio, por un mecanismo alostérico, conjuntamente incrementa la afinidad de los sitios de reconocimiento por GABA, o facilita el acoplamiento entre este sitio de reconocimiento y el ionóforo. Consecuente con esta hipótesis es la descripción de un sitio de fijación saturable de alta afinidad para las benzodiazepinas, diferente de los del GABA, regulado en receptores post-sinápticos por una proteína endógena.

Por tanto, posiblemente las benzodiazepinas inducen una acción cooperativa positiva por actuación de este mecanismo regulador, y también facilitando la fijación del GABA a un receptor postsináptico.

El GABA puede aumentar significativamente la afinidad de los lugares de fijación de las benzodiazepinas.



pinas, tanto "in vivo", como "in vitro". Estos cambios de afinidad refrendan una vez más la existencia de una supraunidad GABA-ionóforo-activador alostérico modulador, que parece actuar en la membrana celular (8, 66). La gabamodulina es una proteína termoestable (de 15.000 daltons) que se localiza en diversos tipos de células cerebrales y que puede interaccionar con receptores GABA por inhibición alostérica de su capacidad para ligar GABA. Esto está mediado por la fosforilación de una proteína de membrana (1). Las mayores concentraciones de esta proteína se han medido en córtex, cerebelo, hipotálamo, y en concentraciones mucho menores (1/10, 1/20) en hígado, riñón y bazo.

La interacción entre el H³-diazepam y el modulador endógeno parece ser competitiva.

Según algunos trabajos es posible que el modulador endógeno opere a nivel de la membrana como un modulador alostérico endógeno para el lugar de fijación del receptor GABA. De acuerdo con esto, el modulador podría cambiar la formación del lugar de reconocimiento del receptor gabaérgico (cambiando la afinidad para GABA), indirectamente por activación o inhibición de un proceso que se ocupa de la función de los receptores benzodiazepínicos (1, 8, 66).

Se concluye que la gabamodulina es la responsable de la interacción recíproca benzodiazepinas-

GABA, ya que ésta inhibe los receptores GABA alostéricamente, por lo que las benzodiazepinas, cuando actúan a este nivel desplazan la gabamodulina y desinhiben a los receptores de GABA (37).

4.b.2. Activación de los receptores benzodiazepínicos y el papel de los canales iónicos.

De entrada hemos de recordar que la acción postsináptica del GABA está en íntima relación con los ionóforos. Estos ionóforos son también proteínas integrales de membrana que coexisten en dos estados conformacionales diferentes, estando su transición controlada alostéricamente por el mecanismo regulador de la ocupación de los receptores postsinápticos. Una conformación del ionóforo facilita el flujo de un determinado ión (1). El receptor benzodiazepínico puede estar estrechamente asociado con el canal iónico de cloro, que estará también íntimamente unido al lugar de fijación del GABA. Esto lo corroboran las alteraciones encontradas en el complejo benzodiazepina/GABA/ionóforo de cloro en stress experimental en ratones, produciéndose alteraciones en el trasiego iónico (75, 76).

Cuando el GABA ocupa los receptores postsinápticos el ionóforo del cloro puede funcionar, y este ión fluye a través de la membrana de acuerdo con un gradiente de concentración. Cuando los fluidos extracelu-

lares contienen más cloro que los intracelulares de la célula que está inervada por sinápsis gabaérgica, la liberación transináptica de GABA incrementa el flujo de cloro e hiperpolariza la membrana celular. Consecuentemente, la intensidad de esta respuesta celular para producir depolarización (estímulo excitatorio) se reduce o se abole (1).

Los estudios electrofisiológicos, farmacológicos y bioquímicos avalan hoy la acción de los receptores benzodiazepínicos sobre estos canales de cloro, así como el hecho de que no son la misma entidad para GABA y benzodiazepinas. Así, se sugiere que los iones modulan la afinidad del receptor benzodiazepínico a través de un cambio de conformación inducido alostéricamente (8, 50, 66, 128).

Las modificaciones producidas por el acoplamiento entre iones, receptores y el cambio alostérico de la proteína en el lugar de fijación del GABA aún no se ha podido demostrar, si bien se ha comprobado cómo sustancias con afinidad por estos canales tienen propiedades ansiolíticas (130). El modelo más aceptable es el del autor que se representa en la figura 5 (66).

4.b.3. Mecanismo de acción de los receptores benzodiazepínicos periféricos.

Como ya vimos, se ha demostrado la existencia de receptores para las benzodiazepinas en tejidos

periféricos como pulmón, riñón, corazón, cápsulas adrenales, hígado, plaquetas, mastocitos, los cuales fueron denominados como "lugares aceptores" ya que no se han podido asociar a un efecto determinado y se pensó que fueran farmacológicamente inertes, por lo cual la denominación de "receptor" no sería exacta (17).

Numerosos estudios posteriores dieron como resultado que algunas benzodiazepinas, además de la acción central ya demostrada, tenían algún tipo de efecto en la periferia, destacando entre ellas el diazepam, además del triazolán o el flunitrazepam (20, 74, 92, 97, 99, 101, 102, 103, 104).

A raíz del descubrimiento de la benzodiazepina R05-4864 que es la que más afinidad muestra por receptores periféricos (de mayor a menor: R05-4864-diazepam-clonazepam), y la que menos por receptores centrales (de mayor a menor: clonazepam-diazepam-R05-4864), y de su antagonista selectivo PK 11195, se han podido postular los posibles mecanismos de acción de las benzodiazepinas a este nivel.

Parece ser que esta benzodiazepina reacciona con el proceso de recaptación de nucleósidos, sobre los ionóforos del cloro, y sobre la proteinquinasa dependiente de calcio-calmodulina. Aunque no está muy claro, parece ser que estos receptores no permanecen

insensibles a las manipulaciones del sistema GABA, pudiendo demostrarse esto al observarse como un pretratamiento con GABA evita la aparición de arritmias supra-ventriculares (sin que pase la barrera hematoencefálica), al parecer por un mecanismo de antiautomatismo cardiaco, y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto sobre la interacción RO5-4864/receptor GABA_A. También parece ejercer el GABA acción hipotensora.

Los estudios que más claros parecen estar son los efectuados sobre el sistema cardiovascular, donde se ha visto que los receptores para estos fármacos se encuentran estrechamente relacionados con los canales de calcio, al parecer localizados en el sarcolema de las células musculares.

Para explicar esta actuación se propusieron tres estados de los canales de calcio, uno de reposo, otro activado, y otro estado inactivado. Los bloqueantes del calcio clásicos (nifedipina, verapamil) parecen actuar en el estado de inactivación, el agonista de estos canales BAY K-8644 parece actuar sobre el estado activo, y RO5-4864 sobre el estado de reposo, por lo que el efecto de este fármaco sobre el corazón se basa en un decrecimiento de la contractilidad y de la duración del potencial de acción intracelular (14, 16, 17, 85, 116, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145).

Se ha estudiado como las benzodiazepinas impiden la entrada de calcio (el flujo iónico) en las células de aurícula y músculo liso, por lo que este efecto antagonista mediaría la acción antiarrítmica cardíaca y la acción relajante de músculo liso (146).

El antagonista de receptores benzodiazepínicos periféricos PK 11195 debe su comportamiento según estudios recientes a que se comporta como un antagonista de los canales de calcio voltaje-operantes (activados por BAY K-8644), pero no de los canales operativos unidos a adrenoceptores α_1 o α_2 (147). Esto vendría a corroborar aún más las teorías anteriormente expuestas.

5. Efectos Farmacológicos.

5.a. Acción ansiolítica.

Ya señalamos al principio como el interés por las benzodiacepinas surgió de un screening diseñado para detectar efectos sedantes. De todas formas, la especificidad del efecto ansiolítico es difícil poner de manifiesto, tanto en la experimentación animal como en la medición en humanos (19). Sin embargo se ha visto como alivian o suprimen el síntoma de ansiedad que caracteriza a algunas neurosis y eliminan parte de los síntomas que acompañan, sin necesidad de producir sedación o sueño en casi todos los casos (6).

Al no conocerse exactamente las bases neuroquímicas ni neurofisiológicas de la ansiedad no se puede precisar exactamente el mecanismo de acción sobre esta alteración psicológica. Los datos experimentales que abogan por esta acción son:

5.a.1. Tests de conducta animal:

En estos tests, la acción de estos fármacos se caracteriza por un aumento de las respuestas conductuales que son deprimidas por el contingente de respuesta al castigo o por el miedo condicionado (148).

Así:

- Disminuyen la aparición de úlcus de stress en animales inmovilizados (causa que la produce) y pretratados con estos fármacos (19).

- En situaciones experimentales de "conflicto" atracción-

evitación aumentan las respuestas al mismo nivel por las ratas no tratadas sin conflicto (19, 148).

- También parecen inhibir el comportamiento innato sin adiestramiento previo.

- Disminuye la frecuencia de aparición de "neurosis" experimental en ratas y ardillas (148).

- Producen efecto de amansamiento y doma en el mono Rhesus y otros animales salvajes, sin embargo no se puede demostrar que estos fármacos tengan un comportamiento "antiagresivo" ni en animales ni en el hombre (como se ha pretendido buscar) habida cuenta el hecho de que algunas benzodiazepinas son capaces de inducir agresividad en ratas y ratones tras su administración repetida, explicando esto ciertas reacciones hostiles y agresivas que ocasionalmente producen en la especie humana (6, 148).

5.a.2. Estudios clínicos en humanos:

El principal problema que presenta este estudio es el hecho de que la valoración debe hacerse en sujetos ansiosos, no siendo válido en voluntarios sanos. Para ello se emplean escalas de ansiedad, sobre las que se llevan los datos de un cuestionario que se efectúa a los enfermos. Al comparar diferentes síntomas se vió como disminuían los síntomas de ansiedad.

5.a.3. Estudios neurofarmacológicos:

Las benzodiazepinas han demostrado tener

propiedades sedantes del sistema límbico, habiendo sido atribuido a esto las propiedades ansiolíticas.

En particular el hipocampo y el sistema amigdalario parecen ser los lugares más sensibles a la acción ansiolítica de las benzodiazepinas.

Los cambios electroencefalográficos inducidos en preparaciones experimentales por las benzodiazepinas son variables, dependiendo de la dosis, vía de administración y preparación animal particularmente usada. Los registros de actividad eléctrica de estructuras subcorticales revelan profundos cambios consiguientes a la administración de benzodiazepinas. La actividad eléctrica espontánea del hipocampo de la rata, gato y conejo es deprimida por la administración intraperitoneal de clordiazepóxido o diazepam.

Schallek y cols. (según se cita en ref. 2) han demostrado que el potencial de postdescarga en el núcleo amigdalario se eleva tras la administración intravenosa de clordiazepóxido, diazepam o nitrazepam. Las descargas amigdalohipocámpicas también se encuentran deprimidas. Las benzodiazepinas también parecen disminuir las respuestas del hipocampo a la estimulación amigdalaria.

Todos estos trabajos sugieren, pero no prueban, que las benzodiazepinas impiden selectivamente la descarga amigdalaria y la trans amigdalohipocámpica. La depresión de la actividad de estos núcleos se consigue

con dosis que no afectan a la formación reticular. Dosis mayores inhiben la formación reticular e hipocampo, por lo que se puede producir un efecto de disminución de la presión arterial y de la producción de arritmias cardiacas tras la estimulación eléctrica experimental del hipotálamo que la potenciaría.

Se supone que la acción ansiolítica puede ser consecuencia de la acción sobre el hipocampo y amígdala, pudiendo por ello repercutir en la desinhibición cortical (2, 6).

5.b. Efecto sedante e hipnótico:

Con respecto a su acción hipnótica, la mayoría de las benzodiazepinas son capaces de producir o inducir sueño. Las de acción más específicamente hipnótica son nitrazepam, flurazepam y flunitrazepam, utilizándose como auténticos hipnóticos en el tratamiento del insomnio (6, 19). También loprazolam (una 1-4 benzodiazepina con propiedades hipnóticas) ha sido usada en este campo. Triazolam a la dosis de 0.5 mg. es capaz de inducir también sueño (en comparación con placebos), y tiene menos efectos colaterales que otros fármacos de este grupo como flurazepam (149), aunque hay quien no opina igual (28). Brotizolam (una triazolothienodiazepina) también parece eficaz como productor de sueño (150), así como quazepam (28).

Estos fármacos no suprimen el sueño REM a

la dosis utilizada para el tratamiento de la ansiedad, quedando, sin embargo, totalmente suprimido el sueño en etapa IV (nivel acompañado de pesadillas) de la fase de sueño de ondas lentas o no-REM (151). En general producen un efecto de sedación (subhipnótico) como somnolencia, ataxia, confusión mental, desorientación, disartria, etc., sobre todo en ancianos.

5.c. Efecto sobre la memoria.

Las benzodiazepinas pueden incidir en el proceso de transferencia de información de la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (19).

5.d. Acción anticonvulsivante:

Algunas benzodiazepinas, sobre todo diazepam y clonazepam, muestran intensa acción anticonvulsivante frente a estímulos de naturaleza física y química (6). Son eficaces para prevenir la actividad anticonvulsivante, y para abortar las convulsiones en curso (151). El clonazepam a dosis elevadas tiene acción anticonvulsiva inespecífica (6).

5.e. Acción antiepiléptica.

Se utilizan, sobre todo, el clonazepam y en algunas formas el nitrazepam. El diazepam está muy indicado en el status epilepticus.

En el ratón son capaces de inhibir las convulsiones producidas por el electroshock, el pentilente-tetrazol, y la estriquina. La teoría que predecía que según esto todas las benzodiazepinas serían efectivas en la epilepsia tipo

petit mal no ha sido confirmada en humanos, quedando los fármacos anteriormente reseñados como los más efectivos en esta alteración.

Parece ser que el mecanismo antiepiléptico de algunos anticonvulsivantes, como el diacepán, se fundamenta en que en la epilepsia hay un defecto en los niveles del GABA en SNC, viéndose el GABA incrementado tras la administración de benzodiazepinas. No obstante hay estudios contradictorios. También se ha querido implicar a la serotonina en este proceso, ya que los efectos anticonvulsivos de estos fármacos son menos evidentes en animales que han sido deplecionados de SHT mediante reserpina (2, 18, 152).

En general, estos fármacos parecen limitar la difusión de la actividad convulsiva espontánea generalizada, y suprimir la actividad epileptiforme del EEG provocada por fármacos (2, 151).

El clonacepán tiene acción antiepiléptica en crisis generalizadas primarias tipo ausencias, generalizadas secundarias, en mioclonias y en status epilepticus (6).

5.f. Acción miorrelajante.

Numerosas experiencias muestran que las propiedades músculo-relajantes de las benzodiazepinas son dobles, tanto centrales como periféricas, habiéndose estudiado como el diacepán relaja la contracción isométrica en preparación de músculo estriado de pollo. El mecanismo implica a los

iones de calcio y no está bien aclarado; también se ha estudiado en músculo liso. No obstante, está en discusión si el mecanismo central priva sobre el periférico o viceversa, aunque se ha visto como en individuos con sección medular se producía el efecto. Aún así, el efecto de estos fármacos en la transmisión neuromuscular se desconoce casi por completo, habiéndose descrito acciones del diacepán "in vitro" nulas, potenciadoras, inhibitoras o bifásicas e incluso contrarias dependiendo de la dosis, por lo que hay gran controversia (2, 19, 86, 91, 146, 153).

La acción miorelajante central parece estar basada en una acción sobre la formación reticular activadora ascendente y sobre interneuronas espinales, que deprimen los efectos espinales (6, 151). El nivel de actuación parece ser presináptico (153).

5.g. Otros efectos.

5.g.1. Cardiovasculares:

Se ve afectada tanto la presión sanguínea como la función miocárdica a través de un mecanismo directo y a la vez otro neurogénico que interaccionan. Se vió como la administración de grandes dosis (60 mg.) de diacepán por vía intravenosa a individuos normales provocaba una ligera disminución de la respiración, presión arterial y trabajo sistólico del ventrículo izquierdo (2, 151). Podemos destacar los efectos en:

- Cardioversión: 450 estudios muestran como la frecuencia

de extrasistoles ventriculares eran mucho menores en asociación con diacepán que con otros fármacos que se emplean, como es el caso de los barbitúricos(2).

- Arritmias: Parece ser que las benzodiazepinas pueden tener, aunque en pequeña medida, un ligero comportamiento antiarrítmico (2, 103). Parece ser que las benzodiazepinas inhiben competitivamente la contracción dependiente de calcio en la aurícula (y en otros puntos), pareciendo estar ligado este mecanismo al de la acción antiarrítmica (146). Estudios de tipo experimental muestran que las benzodiazepinas prevenían las contracciones arrítmicas inducidas en la aurícula derecha perfundida "in vitro".

Esto parecía deberse a un aumento en el periodo refractario del músculo cardíaco y a una depresión de la velocidad de conducción (154).

- Ansiedad en el fallo cardíaco: Parecen ser efectivas en esta alteración, habiéndosele atribuido al diacepán, incluso, propiedades vasodilatadoras relacionadas con una potenciación de la acción de la adenosina, aunque esto no está claro (2, 101, 103, 104).

5.g.2. Respiración.

Son potencialmente depresores respiratorios, sobre todo en administración intravenosa, ya que parece ser que reducen el volumen tidal, eleva la PCO_2 y deprime la respuesta respiratoria al dióxido de carbono,

lo que hace que se precipite una acidosis respiratoria.

Aunque se ha visto que el clordiacepóxido tiene propiedades antihistamínicas, no se ha comprobado que tenga efecto en el tratamiento del asma (2, 19).

5.g.3. Tracto gastrointestinal.

Las propiedades anticolinérgicas no parecen tener significación gastrointestinal. Los efectos más importantes de este punto parecen estar mediados por la influencia del SNC, aunque estudios recientes parecen demostrar ciertas acciones mediadas por receptores GABA_A de tipo periférico (95, 109). También parecen inhibir algo la secreción gástrica y salivar, pero con poca trascendencia clínica (2). El diacepán a altas dosis parece potenciar la secreción exocrina pancreática en páncreas perfundido de perros (94).

5.g.4. Efectos obstétricos y ginecológicos.

Se ha comprobado que "in vitro" el diacepán relaja la musculatura uterina, aunque esto no ha podido verificarse "in vivo".

En algunos estudios se ha observado que las benzodiazepinas (diacepán y clordiacepóxido) reducen el trabajo del parto, sobre todo en las multiparas, al parecer por la sedación tanto central como periférica que puede producir, aunque otros estudios no corroboran este dato. Sin embargo se ha notado como en los niños de madres tratadas con diacepán hay una tendencia a ser

hipoactivos e hipotónicos en las primeras 24 horas tras el nacimiento, viéndose que eran más propensos a la acidosis que los de las madres que no habían recibido la medicación (2).

El clordiacepóxido y el diacepán no tienen actividad antihipertensiva intrínseca pero pueden reducir la presión sanguínea cuando la ansiedad y la agitación contribuyen a esta elevación, siendo ésta al parecer, la causa de su uso en las convulsiones eclámpticas. Pero se ha descrito también como las altas dosis de diacepán administrado a la madre toxémica producen una grave depresión en el neonato (2).

5.g.5. Dismorfogénesis.

Parece existir un aumento de incidencia, de malformaciones congénitas en recién nacidos de madres tratadas con clordiacepóxido durante el embarazo, particularmente una frecuencia cuatro veces mayor de hendidura de labio y de paladar en los niños nacidos de madres pretratadas. Esta es la causa de que no se deban administrar a embarazadas, salvo casos muy imprescindibles, sobre todo durante el primer trimestre (19, 155).

5.g.6. Oftalmología.

Las propiedades músculo-relajantes de las benzodiacepinas pueden ser aplicadas al sistema oculomotor. El efecto de estos fármacos sobre la cefalea

psicógena era significativo con respecto al del placebo; pero en el glaucoma no parecían tener efectos (2).

5.g.7. Efectos metabólicos.

Arrigoni-Martelli y Toth (según se cita en la ref. 2) han demostrado que el clordiacepóxido libera el glucógeno hepático y produce hiperglicemia en ratas. Como el efecto se puede anular mediante el pretratamiento con bloqueantes beta-adrenérgicos y por adrenalectomía, sugieren que el clordiacepóxido activa mecanismos adrenérgicos.

Aunque algunas benzodiacepinas, como el clordiacepóxido, parecen desplazar a la hormona TRH isotópicamente marcada de la membrana de la amígdala, se ha podido comprobar que esta interacción es de tipo periférica, y no hay un antagonismo sobre TRH a nivel central, por lo que la acción de estos fármacos sobre las secreciones tiroideas están aún muy oscuras (98).

Otros efectos sobre el metabolismo están poco claros y parecen tener menos relevancia (2,98).

6. Indicaciones terapéuticas.

El uso de las benzodiazepinas es muy amplio, pero debe tenerse en cuenta el peligro potencial del abuso de fármacos tranquilizantes, ya que su utilización indiscriminada puede llevar a la farmacodependencia, como veremos más adelante (18).

6.a. Liberación de la ansiedad.

El sentimiento de nerviosismo o de constante preocupación de causa incierta, que denominamos ansiedad, es la principal indicación de estos fármacos. Estos fármacos son más valiosos cuando también se encuentra presente la agitación o la aprehensión severa.

Debemos tener siempre en cuenta que es posible que nos encontremos ante una depresión en la clínica habitual, por lo que será importante el establecimiento del diagnóstico diferencial de estas entidades, si bien pueden coexistir con el cuadro de ansiedad que nos ocupa, como ya veremos más adelante (151, 156).

Hay que tener, no obstante, en cuenta las formas patológicas del síndrome para el establecimiento racional del tratamiento (6). Así diferenciaremos:

6.a.1. Neurosis ansiosa:

En este tipo de ansiedad son mucho más importantes las benzodiazepinas que otros fármacos, como los barbitúricos o el meprobamato. Igualmente ocurre cuando predominan situaciones de pánico (2, 6).

6.a.2. Depresión ansiosa:

Hay muchos pacientes que además de ansiosos están también deprimidos. Las benzodiacepinas pueden ser valiosas en pacientes con depresiones neuróticas, particularmente cuando la ansiedad o la agitación son los componentes primordiales. Pese a ello, las benzodiacepinas no parecen tener propiedades antidepresivas específicas.

Cuando se combinan con los antidepresivos tricíclicos en el tratamiento de estos cuadros no interfieren ni antagonizan la acción primaria del antidepresivo. De cualquier forma, las combinaciones de fármacos conteniendo dosis mezcladas de benzodiacepinas y antidepresivos tricíclicos no son demasiado racionales (2).

6.a.3. Ansiedad de tipo reactivo:

La ansiedad de tipo reactivo que aparece en circunstancias vitales difíciles (enfermedad grave en la familia, separación de los hijos, desempleo, etc.) no requiere medicación la mayoría de las veces, pero en caso de emplearse debemos utilizar este tipo de fármacos, teniendo suficiente cuidado de que esto no sirva para que el paciente no comprenda o no se adapte a la circunstancia desencadenante, originando un cuadro de dependencia yatrógena (6, 19).

6.a.4. Neurosis fóbicas asociadas a objetos o situa-

ciones específicas.

En particular estos fármacos parecen estar indicados en el sonambulismo y en cuadros de terrores nocturnos. En niños habrá que tener en cuenta que deberemos esperar en la mayoría de los casos a que el niño madure psicológicamente, ya que la mayoría de las veces suele desaparecer el cuadro en este momento.

En adultos, el diacepán parece tener utilidad para disminuir la frecuencia de ataques de terror nocturno (6, 18, 155).

6.a.5. Fármacos más usados y dosis empleadas:

Como tratamiento de la ansiedad, en sus distintas formas se han venido empleando los fármacos y dosis que se enmarcan en la tabla 3.

6.b. Psicosis.

Estudios muy pormenorizados han aclarado que las benzodiazepinas no son muy beneficiosas en el tratamiento de pacientes esquizofrénicos, y aunque la ansiedad y la agitación puede ser controlada en algunos casos, estos fármacos, por ser tranquilizantes menores, no tienen efecto sobre los trastornos del pensamiento y otras manifestaciones psicóticas (2, 18).

6.c. Tratamiento del alcoholismo.

Hay estudios que sugieren que el clordiazepóxido y el etanol tienen efectos contrarios sobre el SNC. Otros estudios muestran que el etanol y las benzodiazepinas

producen efectos aditivos centrales de sedación bien establecidos. Aunque haya poco claro respecto a esto, sobre todo en estudios en humanos, parece ser que las benzodiazepinas tienen pocos efectos sobre el metabolismo del etanol. De todas maneras, estos fármacos se han usado frecuentemente en los cuadros siguientes relacionados con el alcoholismo (2):

6.c.1. Abstinencia al alcohol.

El cuadro general de abstinencia al alcohol, y el delirium tremens, son indicaciones habituales y precisas de las benzodiazepinas.

Entre las causas de uso de estos fármacos podemos enumerar el que tienen propiedades farmacológicas similares al alcohol (por lo que son sustitutos razonables), son anticonvulsivantes efectivos (por lo que protegen de las convulsiones, muy frecuentes en estos cuadros), no tienen un riesgo potencial elevado sobre el paciente, y no son nocivos como el paraldehído.

La indicación en delirium tremens es de 10 mg. de diazepam iv. cada 4 h., pasando luego, cuando ya hay mejoría a la vía bucal, 10 mg./4-6 horas (2, 18, 156).

6.c.2: Alcoholismo crónico:

En el tratamiento del alcoholismo sólo podemos observar pobres resultados de varios grupos de fármacos en general, y de las benzodiazepinas en particu-

lar.

Oxacepán y clordiacepóxido han sido los fármacos que parecen tener una ligera capacidad de disminuir la dosis de alcohol que el enfermo ingiere. En particular, el clordiacepóxido, unido a imipramina hizo en algunas experiencias que tan sólo un 10% de pacientes alcohólicos crónicos retornaran a su hábito. De todas formas esto debe ser objeto de comprobación (2).

6.d. Tratamiento de alteraciones neuromusculares y convulsivas.

6.d.1. Uso en la espasticidad muscular:

En estos estados, se emplean fundamentalmente como relajantes musculares y como sedantes, en los cuadros siguientes:

- Parálisis cerebral: Aproximadamente el 50% de los niños tratados con diacepán o clordiacepóxido mostraran efectos beneficiosos, como disminución de movimientos involuntarios, disminución de la espasticidad, mejor coordinación, e incluso en algunos casos hubo mejoras en el comportamiento e hiperactividad.

Las dosis de diacepán a utilizar son 0'5 mg/Kg/día en niños, y de 10 mg/3 veces al día en adultos.

- Espasticidad postraumática y estados degenerativos: El diacepán tomado oralmente, se ha visto que es efectivo en cuadros de esclerosis múltiple, parkinsonismo, esclerosis lateral amiotrófica, accidentes cerebrovasculares, y

lesiones medulares que pueden producir un incremento en el tono muscular. Electromiográficamente se comprobó como tras el diacepán oral se producía una relajación del espasmo muscular.

- Tétanos y envenenamiento por estricnina: El diacepán parece producir una inhibición presináptica que produce relajación muscular en los cuadros tetánicos. Aunque se han comprobado los efectos beneficiosos, las dosis pueden llegar a ser tan elevadas como de 1.200 mg./día de diacepán.

El mecanismo por el que mejora el envenenamiento por estricnina es muy similar, y se puede considerar al diacepán como un antídoto razonable del envenenamiento por estricnina (2, 18, 156).

6.d.2. Uso en convulsiones no controladas repetidas.

Dentro de la heterogénea familia de las epilepsias, podemos observar como se emplean las benzo-diacepinas, sobre todo en los siguientes cuadros:

- Mioclonias y espasmos infantiles: Nitrazepam ha demostrado ser el fármaco más activo en este tipo de epilepsias, así como en algunos casos de extensas ausencias tipo petit mal. Generalmente se requieren dosis de 0'5 mg/Kg/día. El problema fundamental a estas dosis es la sobredosificación y la intensa sedación que puede producirse.

- Status epilepticus: Con las benzodiazepinas se han tenido óptimos resultados en el tratamiento de este cuadro. El uso del diazepam intravenoso a las dosis anteriormente citadas es el tratamiento de elección principal de éste tipo de cuadros (2, 155).

6.e. Uso como hipnótico y anestésico:

Cualquier benzodiazepina podría ser utilizada como hipnótico, pero la que más frecuentemente ha sido utilizada como tal ha sido flurazepam, aunque esta eventualidad parece ser que se debe, tan sólo, a los grandes esfuerzos promocionales de los laboratorios farmacéuticos, ya que presenta más efectos colaterales que otros fármacos de este grupo. Estudios recientes muestran que las nuevas benzodiazepinas como quazepam, tiene una elevada eficacia como hipnóticos. Triazolam y brotizolam también han probado su eficacia (2, 28, 149, 150).

El diazepam y el lorazepam, principalmente, han sido utilizados como anestésicos endovenosos. Los usos fundamentales son:

* Premedicación anestésica: Se puede conseguir con estos fármacos la cooperación del paciente, la disminución del estado de ansiedad, aprensión y conciencia y la relajación del tono muscular. Si estamos intentando establecer una premedicación oral, las dosis de clordiazepóxido oscilarán entre 20-50 mg, mientras que con diazepam, con 10 mg la noche anterior se logra el estado deseado. La

premedicación parenteral tiene los inconvenientes de que al poder producir sueño se corre el riesgo de que el paciente aspire el producto de un vòmito. Se emplean 10-20 mg de diacepán iv.

* También puede ser utilizado como inductor anestésico, en pequeñas intervenciones odonto-estomatológicas, en procedimientos endoscópicos (esofagoscopia, broncoscopia, gastroscopia), en intervenciones ortopédicas (reducciones de fracturas menores, y cuadros en los que predominen las contracturas del tipo del lumbago), y en obstetricia, con idea de calmar la ansiedad y aprensión preparto, la contractura uterina (ya que actúan como relajantes uterinos) y el dolor, quedando la paciente somnolienta y calmada (2, 18, 29, 156).

7. Efectos indeseables.

Las benzodiazepinas en general, y particularmente sus dos exponentes más relevantes, cuales son diazepam y clordiazepóxido, están implicados en casi todas las reacciones adversas que podamos imaginar. Cualquier síntoma o signo que se desarrolle mientras un paciente esté tomando un fármaco, y que subsiguientemente desaparece cuando el paciente deja de tomarlo puede ser atribuida a la toma de estos fármacos (2).

Al ser unos fármacos muy difundidos y de uso frecuente, es muy importante el conocimiento de estos efectos. Entre los más importantes podemos destacar:

7.a. Tolerancia.

En principio recordaremos que conocemos como tolerancia a la situación que obliga a consumir cantidades crecientes de un fármaco para conseguir los mismos efectos (157).

La tolerancia puede producirse a partir de varios mecanismos posibles (alteración en la sensibilidad del receptor celular, incremento en la tasa del metabolismo del fármaco, modificación en las sustancias del transmisor celular), y aunque pese a todo esto se desconoce el mecanismo exacto, sí se sabe que en contra de lo que propugnaron estudios anteriores, esta tolerancia no se debe a un cambio en el acoplamiento del receptor GABA/benzodiazepina, ni en el número de receptores benzodiazepínicos o su afinidad, aunque

si puede haber un cambio en todo el espectro de ligandos. La clave para el desarrollo de esta tolerancia es el uso crónico y no interrumpido de estos fármacos, forma mediante la cual suelen usarse generalmente, lo que hace que la tolerancia sea difícilmente evitable. De todas formas esta tolerancia en las benzodiazepinas sigue un desarrollo lento por regla general (152, 156, 158, 159).

Se han llevado a cabo estudios comparativos en sujetos sanos para estudiar el índice de tolerancia de las diferentes benzodiazepinas, destacando una reciente que compara diazepam, oxazepam y placebo, y que dan como resultado el que ambos fármacos producen tolerancia, aunque no "efecto rebote" (160).

Los estudios en animales han sugerido que las benzodiazepinas pueden producir de igual forma tolerancia aguda y crónica, habiéndose visto en ratones, por ejemplo, tolerancia a los efectos anticonvulsivantes del clonazepam (7).

Todos los estudios realizados sugirieron que la tolerancia que se producía tras la toma de benzodiazepinas podría desembocar en un estado de adicción o habituación en animales, cosa que posteriormente se vió evidenciada en humanos. En esto radica principalmente su importancia (2, 161).

7.b. Dependencia física.

La dependencia física es una consecuencia de la tolerancia, ya que primeramente suele establecerse una dependencia psicológica, y un "abuso" (el paciente requiere más medicamentos para mejorar de sus síntomas), que si no estamos prestos a atajar, puede desembocar en la dependencia fisiológica (156).

El tipo de dependencia de este grupo de fármacos, se sitúa, según el comité de expertos de la OMS dentro del grupo de los barbitúricos/sedantes (pudiendo también estar incluidos en el del tipo del etanol). También aparece una dependencia psicológica cuya gravedad y rapidez de aparición varían según los diversos fármacos y los sujetos, grados variables de deterioro del comportamiento social, y las manifestaciones típicas del cuadro de dependencia física que ahora veremos.

Clinicamente el cuadro (que ha sido muy estudiado en humanos y animales) es muy similar al producido por alcohol o barbitúricos, pero con diferencias en cuanto al tiempo de aparición sobre todo. Esto es debido a que la vida media de las benzodiazepinas, por regla general, es más prolongada que la de la mayoría de los sedantes, y esto hace que el descenso de las concentraciones plasmáticas del fármaco sea más gradual y que se tarde más en alcanzar un nivel tan bajo como para producir síndrome de abstinencia. Los trabajos con animales muestran que el cuadro puede estar causado por la acumulación del metabolito del diazepam N-desmetildiazepam.

En su forma mínima, los signos y síntomas son : aprensión, insomnios, vahidos y anorexia, no pudiéndose distinguir en la mayoría de los casos si en realidad se trata del síndrome de abstinencia o si por el contrario son síntomas de reactivación del cuadro ansioso, siendo fundamental para distinguirlo el estudio del tiempo que lleva el paciente tomando la medicación.

En cuadros de cierta gravedad, aparecerán además, y por orden creciente de afectación náuseas y vómitos, debilidad muscular o temblores, hipotensión postural, hipertermia, espasmos musculares, convulsiones, y estados de confusión o psicosis. De cualquier forma, el cuadro completo no suele presentarse.

El tratamiento consiste en restablecer la posología en el nivel original y retirar gradualmente el fármaco, si bien algunos autores propugnan el "destete" con barbitúricos. Estudios recientes en monos abogan por la posibilidad de utilizar antagonistas benzodiazepínicos (como RO15-1788) en el tratamiento del síndrome de abstinencia, ya que su resultado en estos animales fue satisfactorio (157, 163).

De todas formas, el factor de riesgo que presentan las benzodiazepinas es bajo, e inferior al de la mayoría de los sedantes y tranquilizantes de uso más común (157, 162, 163, 164).

Con miras a una buena asistencia médica y a la economía, y para minimizar los riesgos de dependencia es necesario persuadir a los facultativos de la conveniencia de:

- a) Proceder a una selección cuidadosa de los casos en que la administración de benzodiacepinas es apropiada.
- b) Hacer uso concomitante de otros procedimientos terapéuticos apropiados.
- c) Suprimir la farmacoterapia en cuanto sea posible.
- d) Aplicar un criterio prudente cuando se trate de la administración de las benzodiacepinas durante un periodo prolongado en caso de enfermos que hacen uso abusivo del alcohol u otros sedantes.
- e) Evitar la interrupción brusca del tratamiento, sobre todo en los que han tomado benzodiacepinas más de un mes (156).

7.c. Interacciones con otras drogas.

Con las benzodiacepinas suelen ser infrecuentes, excepto por un efecto aditivo con otros depresores del SNC (3).

Entre las sustancias con las que podemos destacar algún tipo de interacción destaca el alcohol etílico. También se ha descrito interacción con tiopental (y clordiacepóxido), con fenitoína, con hidroxicumarina (y diacepán) y hasta con L-DOPA. Los grandes fumadores de cigarrillos parecen necesitar una dosis mayor de estos fármacos para obtener niveles terapéuticos. El café y los anorexígenos también

parecen tener una leve interacción de tipo farmacodinámico. Alprazolam, lorazepam, temazepam y triazolam consumidos junto a anticonceptivos orales producen un aumento de la sensibilidad a los efectos psicomotores a dosis bucales simples. De todas formas esta interacción no se ha medido con completa fiabilidad.

El grado de inducción enzimática que son capaces de producir las benzodiazepinas es mucho menor que el que pueden producir otros fármacos, como los barbitúricos, y en la práctica se puede considerar nulo (2, 3, 30, 156).

7.d. Toxicidad en SNC.

Es el efecto adverso más común en las benzodiazepinas.

Si administramos las benzodiazepinas como hipnóticos puede darse el caso de que el paciente tenga disminuido su nivel de alerta durante parte del día siguiente en mayor o menor medida, según la vida media del compuesto. Expresión de depresión del SNC son síntomas como debilidad muscular, apatía, vértigo, discinesia, ataxia, enuresis, fallos en la eyaculación e incluso síntomas que recuerdan al cuadro ansioso.

Las reacciones adversas que siguen a una administración parenteral incluyen depresiones respiratorias de tipo central (2).

7.e. Otros efectos indeseables.

Podemos enumerar:

* Reacciones alérgicas: Reacciones cutáneas de las benzodiazepinas. urticaria, edema angioneurótico, erupción máculopapular, e incluso algún caso de reacción anafiláctica en asmáticos tras la ingesta de clordiazepóxido (2).

* Función tiroidea: Parece ser que el clordiazepóxido y el diazepam interfieren con la recaptación del yodo, pudiendo agravar cuadros de tirotoxicosis. Sin embargo la relación entre estos fármacos y la liberación de hormona tiroidea no está clara. Otros estudios "in vitro" han observado que concentraciones muy elevadas de diazepam desplazan a la tiroxina y triyodotironina de los sitios de unión de la globulina fijadora de hormona tiroidea (proteína de transporte) (2). El midazolam es 6 veces más activo en esta función que el clordiazepóxido, aunque como referimos anteriormente esta interacción no se produce en núcleos cerebrales, sino periféricamente, y tiene muy poca trascendencia clínica según parece (98).

* Efectos hepatotóxicos, hematotóxicos, o citogenéticos han sido descritos de una manera tan poco frecuente y tan dudosa que podemos despreciarlos (2).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hace tiempo que se describió el efecto que podían tener las benzodiazepinas sobre el corazón. Se ha visto que potencian el mecanismo de acción de la adenosina (inhibiendo su recaptación), por lo que median una respuesta vasodilatadora y posiblemente antianginosa (101, 102, 103, 104) ejercida de forma más potente por el diazepam, seguido en orden decreciente por oxazepam, clonazepam, lorazepam, clordiazepóxido y prazepam (165). También se ha observado que poseen algunas propiedades antiarrítmicas (aumento del periodo refractario, disminución de la velocidad de conducción auriculoventricular).

Presentan especialmente cierta acción inotrópica positiva (o negativa si se aumentaban las dosis de diazepam) (146, 154), ya que en un rango de concentraciones de 5-10 micromolar parecía potenciar la acción inotrópica negativa de la adenosina (166).

Se han descrito lugares de fijación de moléculas de diazepam marcadas isotópicamente en corazón (así como en otros muchos tejidos periféricos), pero a ellos este fármaco se unía con mucha menos fuerza que en SNC (92, 93, 100).

Posteriormente se describieron receptores para las benzodiazepinas en la periferia, sobre los que el RO5-4864 y el PK 11195 (antagonista no benzodiazepínico) tenían una afinidad muy marcada, pero mucho menos el diazepam u otras benzodiazepinas de acción central. Estos receptores

fueron también descritos en corazón (más en ventrículos que en aurículas) (13, 17, 89, 131, 132), y se relacionó su aparición en este lugar y no en otros tejidos musculares (esquelético, liso) por la aparente necesidad de tomar energía de la fosforilación oxidativa (abundante en el músculo cardiaco), y no de la glicolisis (que se produce en tejidos del SNC) (8, 167, 168).

Aunque los primeros estudios parecieron encasillar a estos lugares de fijación periféricos como "aceptores", posteriormente parece comprobarse que los fármacos anteriormente descritos, tienen ciertas acciones, entre las que destaca un decrecimiento del potencial de acción intracelular y de la contractilidad de forma dosis-dependiente. Este efecto producido por el RO5-4864, es antagonizado por el PK 11195, siendo este antagonismo reversible y GABA-independiente. Esto, unido a ciertos estudios termodinámicos han desembocado en determinar que estos lugares de fijación de benzodiazepinas cardiacas son verdaderos receptores (14, 17, 169, 170).

Hay que tener en cuenta también que la acción de esta benzodiazepinas (RO5-4864) sobre los receptores benzodiazepínicos cardiacos tiene una serie de manifestaciones a nivel intracelular, que se traducen en cambios de contractilidad en preparaciones aisladas de corazón (músculo papilar, aurícula, ventrículo), así como que el antagonismo a que se ve

sometido el R05-4864 por el PK 11195 parece relacionar ciertos mecanismos que complican a los canales de calcio.

Nuestro estudio se ha planteado con idea de arrojar luz sobre este tema (16, 169, 171, 172).

Corroborar aún más el que se trate el presente tema el hecho de que estudios recientes ponen en tela de juicio la hipótesis de que el acoplamiento del R05-4864 a sus receptores esté mediado por canales de calcio (170), o la evidencia de que otros estudios en los que se empleaba el PK 11195 en perros han mostrado que pueden tener cierta acción antianginosa precisamente por una interacción con los referidos canales de calcio, por lo que su uso como bloqueante de estos receptores benzodiazepínicos periféricos también debería ser verificada (173).

El uso de un modelo de experimentación que utiliza el corazón completo "in vitro" como es el de Langendorff, hemos juzgado que puede ser el ideal para observar como músculo cardíaco responde a la administración del fármaco o su antagonista.

Los objetivos específicos que se persiguen en el presente estudio son:

- 1) Determinar si la administración del R05-4864 (benzodiazepina activa selectivamente sobre receptores benzodiazepínicos periféricos) sobre una preparación de corazón "in vitro" tiene una respuesta estadísticamente significativa, a partir de los parámetros:

* Inotropismo o fuerza de contracción.

* Cronotropismo o frecuencia cardíaca.

2) Averiguar si la administración del PK 11195 [1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinoleincarboxiamida] es capaz de antagonizar los efectos R05-4864 [Cloro-7(p.clorofenil)-5 dihidro-1,3 metil-12 H 1,4-benzodiazepina-2-ona] sobre la fuerza y frecuencia de contracción cardíaca.

3) Concretar si los sitios periféricos de ligadura para benzodiazepinas se comportan como aceptores o como receptores.

MATERIAL Y METODOS.

Para la realización del presente estudio se utilizaron ratas Wistar albinas, machos (n=96), y de peso comprendido entre 200 y 300 g. Las ratas se obtuvieron del animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla.

La técnica que se siguió fue la descrita por Langendorff en 1.895, y hoy plenamente vigente para el estudio del corazón "in vitro" (174).

Hasta el momento de iniciar la experiencia los animales fueron libres de acceder al agua o la comida.

El animal se sacrifica mediante un golpe seco en la cabeza, posteriormente se decapita y desangra, con idea de evitar la aparición de coágulos sanguíneos dentro de las cavidades cardiacas. Posteriormente se procedía a la disección del corazón, siendo previamente levantado el peto costal, y abierto el pericardio. Tomando el corazón cuidadosamente entre los dedos, con idea de no lesionar coronarias ni fascículos de conducción, se resecaban las arterias y venas pulmonares primeramente, después las venas cavas, y por último se seccionaba la aorta justo por delante de la salida del tronco braquiocefálico.

El corazón era rápidamente colocado en una placa de Petri con solución nutritiva de Ringer oxigenada a 37° C. . En este medio el corazón era limpiado de posibles coágulos y cuerpos extraños impurezas que hubieran podido penetrar en las cámaras cardiacas, así como de posibles

burbujas de aire. Seguidamente era canulado por la aorta, con cuidado de no obstruir la salida del seno coronario, y fijado a la cánula mediante un hilo anudado (Fig. 6).

Acto seguido el corazón era colocado en el aparato de perfusión, regulando el flujo de solución nutritiva hasta el momento en que la presión en las cámaras cardiacas, medida por un manómetro de mercurio, alcanzaba los 40-45 mm. La temperatura se estabilizó en todos los corazones entre 36'5-37 grados C., siendo constante a lo largo de toda la experiencia. La medición de la temperatura se llevaba a cabo, a parte de por el termostato del motor que perfundía el sistema externo de calentamiento, por un termómetro de mercurio colocado a tal efecto de una manera similar al manómetro (174).

Aunque está muy extendida, explicaremos en breves palabras por qué se desarrolló la técnica de esta forma, estando fundamentado en que la presión de la solución Ringer cierra la válvula aórtica, de manera que el Ringer es liberado directamente a la boca del seno coronario sin pasar a través del corazón. Las válvulas aórticas hacen que el ventrículo izquierdo no se llene, y todo el lado izquierdo del corazón permanece vacío. El lado derecho recibe el fluido drenado del seno coronario y es expulsado a través de la vena cava inferior que previamente había sido cortada en la disección, o pasa a través del ventrículo derecho y es

bombeada afuera por la arteria pulmonar cortada. Todo esto condiciona el que en esta preparación el músculo cardiaco esté realizando un trabajo muy pobre y que no haya gasto cardiaco real (175).

El corazón se estabilizaba libremente durante 15-20 minutos tras los cuales, si dicha estabilización se había conseguido (si no era automáticamente desechado), se pasaba a colocarle sobre el pericardio del ápex una pinza de Starling unida a un hilo, que pasando a través de unas poleas era anudado a un transductor fuerza-desplazamiento Nihon-Kohden TB 611 que se acoplaba a un polígrafo Nihon-Kohden RM 6.000 (Fig. 7 y 8) el cual, tras ser tensada la preparación a 1 g., se encargaba de realizar uno o dos registros de control, tras los cuales pasaban a administrarse las soluciones problema. A partir de aquí se hacían registros cada 5 minutos y durante 20 segundos cada uno. El resto de la experiencia, que no se registraba, era controlada mediante un osciloscopio Nihon-Kohden VC-640 G para proceder adecuadamente en caso de aparecer algún tipo de alteración.

Con este tipo de preparación está descrito que se puede medir la fuerza de contracción (inotropismo), y la frecuencia cardiaca (cronotropismo) (174, 175, 176, 177).

Tras la realización de cada experiencia los corazones eran desecados mediante papeles de filtro y pesados, siendo la media de su peso $1'33 \pm 0'3$ g.

El sistema de perfusión, como se representa gráficamente en la figura 8 está compuesto fundamentalmente por un serpentín y un vaso, ambos de doble pared, por los que circulaba entre la pared externa y la interna agua a temperatura constante bombeada por un motor, y que servía para mantener a esa misma temperatura los líquidos nutricios que circulaban a través del serpentín, y al corazón aislado que estaba situado en el interior del vaso, pero sin tocarlo directamente.

La solución nutricia era oxigenada mediante gas carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2).

La solución nutricia empleada fue la descrita por Ringer en 1.894, y que se compone (174):

Sodio.....	159'9 mEq/l.
Potasio.....	5'6 mEq/l.
Calcio.....	4'4 mEq/l.
Cloro.....	163'9 mEq/l.
Bicarbonato.....	5'9 mEq/l.
Glucosa.....	5 mEq/l.

La solución problema a probar era preparada a diario diluyendo el fármaco problema en una solución de dimetilsulfóxido (que se empleó siempre como solvente) y solución de Ringer.

El paso de solución nutricia libre de sustancias a solución nutricia con fármaco problema se



realizaba de manera sencilla abriendo y cerrando las llaves de paso correspondientes.

Los fármacos utilizados en el estudio han sido:

- * R05-4864 de ROCHE.
- * PK 11195 de PHARMUKA.

Ambos fueron gentilmente cedidos por los Laboratorios Pharmuka de París.

Las series experimentales que se desarrollaron fueron las mismas en cada una de las concentraciones probadas, siendo el tamaño de las muestras en todas $n=6$, y las concentraciones $10^{-5}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, y $10^{-7}M$. Estas series son:

- * R05-4864, una para cada concentración molar.
- * PK 11195, una para cada concentración molar.
- * Dimetilsulfóxido (DMSO), una para cada concentración molar.
- * R05-4864+PK 11195, una para cada concentración molar.

El método estadístico aplicado para la comparación del control con los diferentes valores obtenidos en tiempos establecidos fue la prueba de "t-Student" para datos independientes y apareados, previa aceptación de normalidad e igualdad de varianza ("F de Snedecord"). El test estadístico no paramétrico U-Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para datos apareados se aplicaron en el caso en que la muestra no perteneciese a una distribución normal o tuviese

diferencias significativas en la igualdad de varianza. Así mismo, el programa que se realizó incluía la obtención del coeficiente de correlación lineal "r-Pearson" y el cálculo de la recta de regresión.

El nivel de confianza que se estableció para todos los cálculos estadísticos realizados fue de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS.

Como se indicó en el apartado referente al material y método, los resultados se expresaron gráficamente de manera porcentual respecto al tiempo, tal como aparecen en las representaciones de las figuras 9 a la 37.

Como control se tomó siempre una serie tratada con DMSO (solvente utilizado). Experiencias realizadas en nuestro laboratorio, previas al desarrollo del estudio que nos ocupa nos ratificaron en que no habían diferencias significativas entre preparaciones tratadas con solución Ringer y aquellas a las que se les administró DMSO, a cada una de las concentraciones empleadas (178, 179).

Efecto del R05-4864 sobre el inotropismo cardiaco.

Concentración 10^{-9} M : A esta concentración no se encontraron diferencias significativas entre el control tratado con DMSO, y los corazones a los que se les había administrado el agonista benzodiazepínico periférico R05-4864 (figura 9, tablas 4 y 5).

Concentración 10^{-6} M: A esta concentración, se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con el R05-4864 y el control, ($p < 0'001$ a los 5, 10, 15, 20, 25, y 30 minutos). En la figura 10 se aprecia como hay una depresión del inotropismo, de hasta un 44'3% a los 30 minutos en el grupo tratado con el R05-4864.

La disminución del inotropismo con el R05-4864 era progresivamente mayor con respecto al tiempo durante la administración de la misma concentración (figura 11 y

tablas 6 y 7).

Concentración 5×10^{-7} M: No se encontraron puntos significativos al comparar con los valores para DMSO. Esto se muestra en la figura 12 y tablas 8 y 9.

Concentración 10^{-7} M: Produce efecto inotrópico negativo a los 10, 15 y 20 minutos, con un valor de $p < 0'005$ a los 10 minutos, y de $p < 0'05$ a los 15 y 20 minutos. En las tablas 10 y 11, así como las figuras 13 y 14 se observa una disminución de la fuerza de contracción en los intervalos anteriormente mencionados, máximo a los 10 minutos (15'96%). Estableciendo una nueva relación de datos apareados (t-Student) entre las concentraciones 10^{-6} M y 10^{-7} M (de las que previamente se había comprobado su significación) se vio que existía una relación dosis-dependiente entre la primera en la que el efecto era más marcado que en la segunda, siendo significativo a los 30 minutos donde el apareamiento tomaba el valor de $p < 0'05$. Según lo anterior, los valores tenían una relación ascendente para la concentración 10^{-7} M, frente a 10^{-6} M, de lo que se deduce que a esta última concentración la disminución de la fuerza contráctil cardiaca era máxima.

Efecto del R05-4864 sobre el cronotropismo cardiaco.

Concentración 10^{-8} M: A los 10 minutos, la preparación se comporta como cronotrópica positiva ($p < 0'05$) con disminución de la frecuencia del 8'15% con respecto al control (tablas 12 y 13, figura 15).

Concentración 10^{-6} M: A los 5 minutos, ($p < 0'001$) se comporta como cronotrópico positivo. En la figura 16, y tablas 14 y 15, vemos como la disminución del cronotropismo es mayor en los corazones a los que se les administró DMSO sólo, que en aquellos a los que se les adicionaba el R05-4864, siendo a los 5 minutos del 4'06%.

Concentración 5×10^{-7} M: No se encontraron diferencias significativas entre los grupos que venimos relacionando. Las disminuciones en el cronotropismo que se encontraron tanto en el grupo tratado con el fármaco, como en el que se le administró el solvente sólo, y que se pueden apreciar en la figura 17 y tablas 16 y 17 son superponibles estadísticamente.

Concentración 10^{-7} M: Se encontró una respuesta cronotrópica positiva a los 5 minutos ($p < 0'001$), 15 minutos ($p < 0'005$), 20 minutos ($p < 0'05$), 25 minutos ($p < 0'005$) y 30 minutos ($p < 0'001$). En la figura 18, y tablas 18 y 19, se aprecia una caída de la frecuencia máxima a los 30 minutos (15'24%).

Efecto del PK 11195 sobre el inotropismo cardiaco.

Concentración 10^{-5} M: No se encontró ningún punto estadísticamente significativo, siendo su comportamiento similar al control (figura 19 y tablas 5 y 20).

Concentración 10^{-6} M: Sólo se puede observar un punto estadísticamente significativo a los 30 minutos ($p < 0'05$) en el que el fármaco ejerce una acción inotrópica negativa

sobre la preparación, descenso del 26'73% (figura 20, tablas 7 y 21).

Concentración 5×10^{-7} M: A esta concentración no aparece ningún punto significativo al comparar la respuesta inotrópica del PK 11195 con la de DMSO (figura 21 y tablas 9 y 22).

Concentración 10^{-7} M: Se observó un punto significativo a los 10 minutos ($p < 0'005$), que puede ser observado en la figura 22, y en las tablas 11 y 23, con comportamiento inotrópico negativo (13'38% de disminución). En los demás puntos las variaciones no alcanzan significación estadística.

Establecida una relación de datos apareados entre aquellas concentraciones en las que se encontró significación (10^{-6} M vs. 10^{-7} M) no apareció nivel de significación, por lo que tampoco en este caso podríamos hablar de una relación dosis-dependiente.

Efecto del PK 11195 sobre la frecuencia cardiaca.

Concentración 10^{-6} M: A esta concentración nos aparece un claro efecto cronotrópico negativo a los 25 y a los 30 minutos ($p < 0'05$), que es máximo a los 30 minutos con un 21'92% de disminución (figura 23 y tablas 13 y 24).

Concentración 10^{-6} M: Produce aumento de la frecuencia cardiaca en todos los intervalos de medida; así a los 5 minutos $p < 0'01$, 10 minutos $p < 0'01$, 15 minutos $p < 0'005$,

20 minutos $p < 0'005$, 25 minutos $p < 0'01$ y 30 minutos con valor de $p < 0'01$ (figura 24 y tablas 15 y 25). Este efecto es máximo a los 10 minutos (14'8%) (figuras 25 y 26).

Concentración 5×10^{-7} M: A la mencionada concentración aparece un comportamiento cronotrópicamente positivo a los 15 minutos ($p < 0'005$) con aumento del 7'6% respecto al control (figura 27 y tablas 17 y 26).

Concentración 10^{-7} M: A esta concentración no se observa significación estadística tras la administración del PK 11195 en comparación con la del DMSO, siendo ambas gráficas prácticamente superponibles (figura 28 y tablas 19 y 27).

El estudio para ver si había una relación dosis-dependiente entre las concentraciones que presentaban valores significativos se realizó también por apareamiento, lo que nos dio una significación que podríamos valorar como dosis-dependiente entre ambas concentraciones del PK 11195 de 10^{-6} M y 5×10^{-7} M, y a los 10 y 15 minutos, presentando en ambos casos valores de $p < 0'05$.

A estas concentraciones tenemos que según el estudio realizado, la concentración 5×10^{-7} M tiene un comportamiento descendente, respecto a la concentración 10^{-6} M. Si a esto unimos el hecho del comportamiento cronotrópico negativo significativo de la concentración 10^{-5} M, que además da un valor de t apareada con respecto a 10^{-6} M ascendente para esta última a los 10, 15, 25, y 30 minutos ($p < 0'05$),

podemos observar un comportamiento general cronotrópico negativo a la concentración 10^{-5} M, que cambia a cronotrópico positivo a la concentración 10^{-6} M, que disminuye en el caso de 5×10^{-7} M, hasta la basal (donde no adquiere significación) con 10^{-7} M.

Efecto del R05-4864 administrado simultáneamente con el PK 11195 sobre el inotropismo cardiaco.

Concentración 10^{-5} M: A esta concentración se encontró una fuerte respuesta inotrópica positiva a los 5 minutos ($p < 0'001$), 10 minutos ($p < 0'001$), 15 minutos ($p < 0'001$), 20 minutos ($p < 0'001$), 25 minutos ($p < 0'001$) y 30 minutos ($p < 0'01$). Observando la figura 29 y las tablas 5 y 28 puede observarse como el efecto de la solución R05-4864+PK 11195 sobre el corazón es máximo a los 15 minutos, 85'8% (figura 30).

Concentración 10^{-6} M: Realizando el test estadístico correspondiente no aparecieron diferencias significativas entre el grupo al que se le administró R05-4864+PK 11195, y el que se le había administrado DMSO, respecto a la fuerza de contracción cardiaca (figura 31, y tablas 7 y 29).

Concentración 5×10^{-7} M: A esta concentración tampoco aparecieron diferencias significativas entre el grupo de control y el tratado con ambos fármacos problema. Las variaciones que aparecieron no obtuvieron significación estadística (figura 32 y tablas 9 y 30).

Concentración 10^{-7} M: A esta concentración aparece un punto significativo a los 15 minutos ($p < 0'001$) con comportamiento inotrópico negativo (10'96 de descenso). Pueden observarse los valores en la figura 33 y en las tablas 11 y 31.

Efecto del R05-4864 administrado simultáneamente con el PK 11195 sobre el cronotropismo cardiaco.

Concentración 10^{-8} M: A esta concentración podemos observar dos puntos significativos, el primero de ellos a los 5 minutos y el segundo a los 30, ambos con valores de $p < 0'05$ y con comportamiento cronotrópico negativo, siendo máximo a los 30 minutos (18'7%). Puede ser observado en la figura 34 y en las tablas 13 y 32.

Concentración 10^{-6} M: A esta concentración se observa una respuesta cronotrópica positiva, estadísticamente significativa a los 15 minutos (10'81 de aumento), con valor de $p < 0'005$. Podemos observarlo en la figura 35 y en las tablas 15 y 33.

Concentración 5×10^{-7} M: Una vez comprobados los tests estadísticos se observó que no había ningún valor significativo para ninguno de los intervalos de tiempo. Las diferencias porcentuales que se observan en la figura 36 y en las tablas 17 y 34 no presentan diferencias significativas.

Concentración 10^{-7} M: Se encontró una respuesta cronotrópica negativa a los 25 minutos ($p < 0'05$). Observando la figura 37, y las tablas 19 y 35, puede verse como la máxima

diferencia porcentual entre ambas experiencias (R05-4864+PK 11195 y DMSO) se alcanza a los 25 minutos y es del 5'5%.

Comparando de manera apareada los datos de las concentraciones 10^{-5} M y 10^{-6} M se vio como aparecía una relación dosis-dependiente, particularmente significativa a los 10 minutos con valor de $p < 0.05$. La relación entre las demás no nos dio valores significativos.

Entre las concentraciones 10^{-5} M y 10^{-6} M se vio una relación ascendente para la última respecto a la primera, lo que nos lleva a observar un comportamiento cronotrópico negativo a 10^{-5} M, que pasa a ser cronotrópico positivo a la concentración 10^{-6} M (con una relación dosis-dependiente), y que después baja a valores próximos al control en las restantes concentraciones.

DISCUSION

Los trabajos previos con el solvente utilizado en nuestro estudio (DMSO) han determinado que en corazones de rata a concentraciones entre 0'14 M y 2'82 M se produce un efecto cronotrópico negativo, dosis-dependiente, que podría llegar al paro cardiaco con la última concentración referida. Sobre el mecanismo por el que se produce este efecto se ha postulado que pueda ser una disminución del potencial de acción de la célula cardiaca, o de la velocidad de conducción (178).

En corazones perfundidos de rata, el DMSO (0'7 M) y concentraciones inferiores, producía un efecto inotrópico positivo concomitante con el cronotrópico negativo, que podría estar producido, a estas concentraciones, por el fenómeno de la escalera inversa (característico de la fisiología cardiaca de la rata). A concentraciones de DMSO mayores de 0'7 M y hasta 2'11 M se ha observado un comportamiento inotrópico negativo (179, 180).

A las concentraciones utilizadas en nuestro estudio, y como se expone al principio de los resultados, no se encontraron diferencias significativas entre grupos de corazones perfundidos con DMSO y aquellos a los que se les administró solución Ringer, de lo que podemos deducir que los efectos que vamos a encontrarnos tras la administración de los fármacos problema son acciones propias de ellos, y no debidas al solvente.

En nuestro estudio hemos encontrado que el

RO5-4864 presenta un efecto inotrópico negativo máximo a la concentración 10^{-6} M, y que guarda relación dosis-dependiente.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mestre y cols. y Le Fur y cols. (14, 181), quienes han descrito que el agonista benzodiazepínico periférico RO5-4864 se comporta como un bloqueante de los canales de calcio (con algunas diferencias con los clásicos, como verapamil) en diversas preparaciones de corazón aislado. Este fármaco produce disminución en la duración del potencial de acción de la célula miocárdica y de la contractilidad (entre 3×10^{-7} M y 3×10^{-6} M) en preparaciones de músculo papilar de cobaya.

Estos estudios se fundamentan en trabajos realizados con el antagonista de receptores benzodiazepínicos PK 11195 (al parecer selectivo para el tipo periférico) el cual revierte las acciones del RO5-4864 y de algunos bloqueantes del calcio clásicos (169, 171). Estos trabajos parecen indicar que en el mecanismo de acción de estos compuestos están implicados los canales de calcio, además el aumento de las concentraciones extracelulares de este ión revierte el efecto del RO5-4864 (17, 169, 171, 172).

Estudios recientes han demostrado que en miocitos de corazón de cobaya, y a concentraciones de 3×10^{-6} M el RO5-4864 producía cambios en el gradiente eléctrico de la membrana de dicha célula, que se traducía en una depolarización de -50 mV. a +10 mV. A esta concentración no se afectó la

corriente de calcio, y sin embargo se mantuvo el efecto inotrópico negativo, de lo que se dedujo que pudiera ser que el R05-4864 no fuera un bloqueante de los canales de calcio como habían propuesto Mestre y cols. (170).

El mecanismo por el que se produce la contracción cardiaca se encuentra expuesto en las figuras 38, 39 y 40 (182, 183, 184). Para la contracción cardiaca es fundamental el que se produzca la combinación del calcio con la troponina C, que a su vez liberará el complejo actina-miosina de su inhibición por el de troponina-tropomiosina, produciéndose entonces la contracción de las fibras de actina-miosina, y de la fibra cardiaca en general. Para ello es necesario que el calcio citosólico libre aumente.

El efecto inotrópico negativo encontrado con el R05-4864 podría explicarse por un bloqueo en los canales de calcio de la célula miocárdica, aunque las corrientes transmembrana de los restantes iones permanezcan inalteradas (en particular la de sodio) el intercambio de este ión sodio por el de calcio no podría producirse, con lo cual disminuirían los niveles de calcio dentro de la célula, reduciéndose así la contractilidad. Este efecto sería similar al de los bloqueantes del calcio clásicos. Pero en contra de esta teoría tenemos diversos estudios que demuestran que el receptor de tipo periférico de benzodiazepinas se encuentra en la membrana externa mitocondrial (una proteína integrante de la membrana externa que forma un canal anión-selectivo y

voltaje dependiente de 15 Angströms, que puede transferir hasta grandes moléculas de adenosina) donde también parece localizarse una bomba de intercambio sodio/calcio (8, 105, 167).

El estudio realizado por Hollk (170), demostraba que a determinadas concentraciones el efecto inotrópico negativo producido por el R05-4864 no era antagonizado por concentraciones elevadas de calcio extracelular, por lo que es posible que el efecto del R05-4864 se produzca directamente sobre la membrana mitocondrial. Así, el R05-4864 haría que el calcio intramitocondrial no se liberara al citosol, disminuyendo las concentraciones de éste dentro de la célula, y dificultándose la contracción (167, 170). Estudios realizados por Doble y cols. (172), que hacen referencia a que el tipo de canal de calcio bloqueado por el R05-4864 es similar al bloqueado por las dihidropiridinas (172) nos hace pensar que probablemente estos canales sodio/calcio de la mitocondria sean similares a los Tipo-L de la membrana de la célula cardiaca (185).

También es importante destacar aquí que el efecto inotrópico negativo producido por la disminución del calcio citosólico podría verse potenciado por el efecto que el R05-4864 pudiera tener sobre la adenosina (17). Se ha descrito que esta sustancia posee una acción intrópica negativa y vasodilatadora que es potenciada por el diacepán mediante un

proceso de inhibición de su recaptación (101, 104, 165, 166, 186). A la vista de que el diacepán es la benzodiazepina de tipo central que presenta más afinidad sobre el tipo periférico de receptor benzodiazepínico (14, 17, 131, 132), y que el aumento del calcio extracelular estimula la formación de nucleótidos cíclicos, casi todos dependientes de la adenosina (187), podemos intuir que la acción inotrópica negativa que se nos presenta a las concentraciones de 10^{-7} M y 10^{-6} M puede deberse también al efecto de la adenosina. La falta de respuesta encontrada a la dosis 10^{-5} M podemos atribuirla a que a elevadas concentraciones los efectos que se encuentran puedan ser inespecíficos (17).

El que la adenosina produzca también disminución de la frecuencia cardíaca (188), el diacepán un efecto antiaritmico, con disminución de la conducción en aurícula izquierda, y aumento del periodo refractario del músculo cardíaco (189), los bloqueantes de los canales de calcio clásicos producen efectos similares (146, 154, 182, 189) todo ello nos haría esperar que el RO5-4864 en nuestro modelo experimental presentara una disminución de la frecuencia cardíaca, e incluso se produce aumento de la frecuencia cardíaca, máximo a la concentración de 10^{-7} M, y que no guardaba relación con la dosis. Este efecto puede ser atribuido al fenómeno de la escalera inversa que se puede observar en los corazones de rata preparados "in vitro", y que hace pensar en la diferente participación que tiene el calcio

externo en la activación intracelular de la concentración de calcio (180, 190, 191). También puede tener alguna relación con el hecho de que la acción del RO5-4864 sobre las propiedades automáticas de la célula cardiaca se obtuvieron en trabajos previos a muy altas concentraciones (de 10 a 100 veces la dosis más alta utilizada para mostrar el efecto inotrópico negativo), así como el hecho de que la acción del RO5-4864 es óptima a 4°C., estando nuestro estudio realizado a 37°C. para acercarnos lo más posible a las condiciones del organismo vivo (169).

Las diferencias significativas encontradas en nuestra preparación a los 10 minutos (10^{-7} M, $p < 0.05$) y 30 minutos (10^{-6} M, $p < 0.05$) pudieron interpretarse, sobre todo en el último caso, como un agotamiento de la preparación al paso del tiempo, no debiendo valorarse estos puntos aislados, por lo que podemos considerar que el PK 11195 no afecta a la fuerza contráctil cardiaca. Esto datos concuerdan con otros precedentes en los que se mostraba que el PK 11195 no tenía ningún tipo de efecto sobre el inotropismo cardiaco, referido a preparaciones de órgano aislado (17, 171, 172). En estos estudios referidos se definía al PK 11195 como un antagonista y al RO5-4864 como agonista de receptores benzodiazepínicos periféricos en base a estudios termodinámicos y por analogía con receptores beta o receptores benzodiazepínicos centrales (14).

Sin embargo, nuestros hallazgos referentes al cronotropismo discrepan de los publicados por otros autores, que refieren que el PK 11195 no altera el comportamiento del potencial de acción de la fibra miocárdica, y que no tiene efecto por sí mismo sobre las propiedades eléctricas del corazón, actuando tan sólo como un estabilizador de los canales de calcio voltaje-dependientes, por lo que actuaría antagonizando tanto las acciones del RO5-4864 (como bloqueante de los canales de calcio atípico) como la de los bloqueantes del calcio típicos (verapamil, nitrendipina) o la de los agonistas de estos canales como el BAY K8644 (17, 147, 169, 171). En nuestro caso hemos encontrado una respuesta cronotrópica positiva a las concentraciones 5×10^{-7} M y 10^{-6} M dosis-dependiente, y una respuesta cronotrópica negativa a la dosis 10^{-5} M.

Ante estos resultados cabe la posibilidad de que la administración del PK 11195 sobre el corazón no sea inocua, al menos en lo que se refiere a las propiedades automáticas del corazón. De hecho ya se han llevado a cabo estudios que describen como el PK 11195 (5-25 mg./Kg.) parece mostrarse como antianginoso (efecto que presentan los bloqueantes del calcio clásicos) en un modelo de isquemia miocárdica en perros, viéndose en este mismo estudio como tenía cierto efecto sobre las arritmias por reperfusión que se producían mediante el mismo protocolo experimental, aunque esto último no estaba del todo claro (173).

El PK 11195 parece unirse a los mismos receptores que el RO5-4864, estando ambos localizados muy probablemente en la membrana externa mitocondrial (relacionados con la MAO) (8), en una proteína sobre la que se producen cambios conformacionales o alostéricos según se aplique uno u otro fármaco. Esto modificaría para cada caso la conductancia al calcio (14, 17, 172), contribuyendo a explicar a nivel subcelular estos hechos.

Un segundo paso para la explicación del efecto del PK 11195 es el recordar que los bloqueantes del calcio clásicos (como verapamil) parecen tener un efecto más marcado sobre las células responsables de la actividad eléctrica cardíaca, y en particular sobre el nodo sinoauricular, donde se ha descrito que pueden llegar incluso a abolir la depolarización de estas células, ya que lógicamente su actuación será mayor en células que dependan mucho más directamente de la corriente de calcio, como ocurre con las células automáticas (6, 18, 182).

Según lo anteriormente expuesto, el PK 11195 podría actuar de una manera inversa a como lo hacen los bloqueantes del calcio clásicos o el RO5-4864, pero con una actuación directa sobre la mitocondria, donde parece localizarse su receptor, de manera que administrado aisladamente a la preparación que nos ocupa puede aumentar la corriente de calcio desde la mitocondria hacia el citosol y potenciar así

la actividad eléctrica del nodo sinoauricular, y de todo el sistema autoexcitable. En presencia del RO5-4864 o de los bloqueantes del calcio clásicos podría establecerse algún tipo de antagonismo que para el RO5-4864 podría basarse en un cambio conformacional del receptor (171), pero que para los bloqueantes del calcio habría que tener en cuenta las hipótesis de quienes creen que son receptores distintos, estrechamente relacionados con los primeros (172).

El efecto cronotrópico negativo encontrado a la dosis 10^{-5} M puede achacarse a la acción inespecífica que ya hemos referido que se ha descrito a concentraciones elevadas (17), además de la posible existencia de un agotamiento de la preparación en esos puntos significativos, ya que se producen a los 25 y 30 minutos, y su significación es baja ($p < 0.05$).

Para comprobar el efecto antagonista del PK 11195 sobre el RO5-4864 se administraron de forma simultánea, y concentraciones equimoleculares los dos fármacos. Vimos, sin embargo, un aumento de la fuerza de contracción cardíaca en todos los intervalos de tiempo a la concentración 10^{-5} M, permaneciendo al utilizar el resto de las concentraciones próximo a la línea de base. Esto podría deberse al efecto alostérico anteriormente descrito (171, 172), mediante el cual, en nuestra experiencia, al administrar una concentración elevada de ambos fármacos, por un mecanismo desconocido puede producirse un flujo iónico de calcio desde dentro de la

mitocondria hacia el citosol, estimulándose así la fuerza de contracción. Esto podría ratificar el hecho de que a 37 °C. el PK 11195 presente una fijación mucho más efectiva que el RO5-4864, por lo que lo desplaza de sus lugares de unión, o los estudios de "fijación" que demuestran que la unión del PK 11195 a sus receptores es más fuerte que la del RO5-4864 (14, 192, 193, 194). No obstante, este mecanismo no está claro, ya que a la misma concentración (10^{-8} M) en las series a las que se administró el RO5-4864 y el PK 11195 separadamente no se observó efecto alguno sobre la fuerza contráctil, por lo que no podemos descartar, de nuevo, el posible efecto inespecífico producido por estos fármacos a concentraciones más elevadas (17).

La acción cronotrópica positiva producida por el PK 11195 (a las dosis 5×10^{-7} y 10^{-6}) es revertida por la coadministración equimolecular del PK 11195 y el RO5-4864, lo que nos hace pensar en la posibilidad de antagonismo entre ambos compuestos, que deberá ser comprobada en posteriores estudios.

CONCLUSIONES

1) El RO5-4864 produce un efecto inotrópico negativo a las concentraciones 10^{-6} M (a los 5, 10, 15, 20, 25, y 30 minutos con valor de $p < 0'001$ en todos casos) y 10^{-7} M (a los 10 minutos con $p < 0'05$, 15 y 20 con valor de $p < 0'005$) guardándose entre ambas una relación dosis-dependiente más marcada para la primera concentración referida.

El máximo efecto inotrópico negativo promedio se observó a la concentración 10^{-6} M a los 30 minutos, ascendiendo a un 44'3%.

2) El RO5-4864 aumenta la frecuencia cardiaca a las concentración 10^{-5} M (a los 10 minutos, $p < 0'05$), 10^{-6} M (5 minutos, $p < 0'001$) y 10^{-7} M $p < 0'001$ a los 5 minutos, $p < 0'005$ a los 15 minutos, $p < 0'05$ a los 20 minutos, $p < 0'005$ a los 25 minutos y $p < 0'001$ a los 30 minutos.

El máximo efecto cronotrópico positivo promedio se observó a la concentración 10^{-7} M a los 30 minutos, ascendiendo a un 15'24%.

3) El PK 11195 tiene un comportamiento inotrópico negativo a las concentraciones 10^{-6} M (30 minutos, $p < 0'05$) y 10^{-7} M (10 minutos $p < 0'005$), que no guardan relación dosis-dependiente, ni es significativo a concentraciones mayores a estas.

El máximo efecto inotrópico negativo promedio se observó a la concentración de 10^{-6} M a los 30

minutos, ascendiendo a un 26'73%.

4) El PK 11195 produce sobre el corazón aislado y perfundido un efecto cronotrópico negativo a la concentración 10^{-5} M (25 y 30 minutos, $p < 0'05$), así como un efecto cronotrópico positivo a las dosis 10^{-6} M (5 minutos $p < 0'01$, 10 minutos $p < 0'01$, 15 minutos $p < 0'005$, 20 minutos $p < 0'005$, 25 minutos $p < 0'01$ y 30 minutos $p < 0'01$) y 5×10^{-7} M (15 minutos, $p < 0'005$), habiendo una relación dosis-dependiente entre ambos.

El máximo efecto cronotrópico positivo promedio se observó a la concentración de 10^{-6} M a los 10 minutos, ascendiendo a un 14'8%.

5) La administración simultánea del RO5-4864 y del PK 11195 produce un aumento significativo en la fuerza de contracción cardiaca a la concentración 10^{-5} M (5, 10, 15, 20, y 25 minutos con valor de $p < 0'001$ y 30 minutos con $p < 0'01$), así como un decremento a la concentración 10^{-7} M (15 minutos, $p < 0'001$).

El máximo efecto inotrópico positivo promedio se observó a la concentración 10^{-5} M, a los 15 minutos, ascendiendo a un 85.5%.

6) La administración del RO5-4864 más PK 11195 produce un

efecto cronotrópico negativo a los 5 y 30 minutos ($p < 0'05$) a la concentración 10^{-8} M e igual comportamiento a la de 10^{-7} M (25 minutos, $p < 0'05$), así como un fugaz aumento de la frecuencia cardíaca a la concentración 10^{-6} M (15 minutos, $p < 0'005$).

El máximo efecto cronotrópico negativo promedio se observó a la concentración de 10^{-8} M a los 30 minutos, ascendiendo a un 18'7%.

7) La administración del RO5-4864 a la preparación de Langendorff produce una respuesta farmacológica inotrópica negativa que sugiere que los lugares de fijación de las benzodiazepinas periféricas a este nivel se comportan como receptores farmacológicos y no como meros aceptores.

8) El PK 11195 no se comporta en esta preparación como antagonista puro de los receptores benzodiazepínicos pues afecta las propiedades automáticas y la frecuencia cardíaca.

RESUMEN

Hace 60 años aproximadamente Sternbach, casi por azar, sintetizaba el clordiazepóxido, y desde entonces no han dejado de aparecer nuevas publicaciones que intentan esclarecer los mecanismos de acción de estos compuestos, dada su importante aplicación a la clínica como ansiolíticos, miorelajantes, anticonvulsivos o hipnóticos principalmente.

Estudios más recientes demostraron que el efecto que producían estos fármacos a nivel central era mediado por receptores que parecían estar ligados a los del neurotransmisor inhibitor de las sinapsis neuronales gabaérgicas teniendo ambos relaciones con algunos de los canales iónicos de la membrana celular, y en particular con los ligados al ión cloro.

En 1.977 se descubrió que existían lugares específicos periféricos donde se fijaban las moléculas de las benzodiazepinas, especialmente el diazepam, descubriéndose posteriormente que el agonista benzodiazepínico RO5-4864 (que presentaba acciones antagónicas a las del resto de las benzodiazepinas a nivel central, como era el hecho de ser un proconvulsivante) se fijaba con afinidad nanomolecular a estos lugares periféricos, así como que la molécula no benzodiazepínica PK 11195 que se comportaba como antagonista del RO5-4864, viéndose además que esta última parecía tener, entre otras, una acción similar a la de los bloqueantes del calcio, que también eran antagonizados por el PK 11195.

Trabajos más recientes han identificado estos receptores en diferentes tejidos: riñón, cápsula adrenal, testículos o corazón. También se ha especulado con la posibilidad de que estos receptores no se encuentren en la membrana celular sino en la membrana externa mitocondrial.

En corazón se han descrito estos lugares de fijación para el RO5-4864 y el PK 11195, habiéndose observado como el primero ejerce una acción inotrópica negativa sobre el músculo papilar de cobaya, así como un efecto de disminución de la conducción del potencial de acción de la célula miocárdica, siendo antagonizados ambos efectos por el PK 11195 y estando al parecer todo este conjunto de acciones ligadas a la conductancia del calcio transmembranas. Se ha descrito también que el PK 11195 no tiene efecto "per se", aunque en recientes estudios parece mejorar los cuadros de angor experimental en perros, así como las arritmias por reperfusión en estos mismos modelos.

En nuestros estudios hemos encontrado que el RO5-4864 tiene un marcado efecto inotrópico negativo en el rango de concentraciones 10^{-6} M y 10^{-7} M, mostrándose entre ambas concentraciones una relación dosis-dependiente. Este hecho podría deberse a un bloqueo en la bomba de intercambio sodio/calcio localizada tanto en la membrana de la célula miocárdica como en la membrana externa de la mitocondria, aunque algunos datos obtenidos por Mestre y cols., Holik y

cols. y los nuestros propios nos llevan a pensar que posiblemente la participación de las mitocondrias sea más importante que la de la membrana celular, pudiendo establecerse un bloqueo de esta bomba, con lo cual disminuiría el calcio citosólico disponible para la realización de la contracción. También es posible que este efecto se deba, al menos en parte, a una potenciación del efecto de la adenosina.

El PK 11195 tiene una acción cronotrópica positiva dosis-dependiente mientras que no tiene actividad sobre el inotropismo. Estos datos nos llevan a pensar que el PK 11195 podría actuar sobre el mismo receptor benzodiazepínico periférico de la membrana externa mitocondrial, posiblemente con algún cambio conformacional en la proteína del receptor respecto al RO5-4864.

Por último, la administración simultánea del RO5-4864 y el PK 11195 no mostró variación respecto a los controles, a excepción del fuerte comportamiento inotrópico positivo encontrado a la concentración 10^{-5} M y que podría estar ligado a un efecto inespecífico de los fármacos a dichas concentraciones o a alteraciones en el comportamiento de los receptores frente a elevadas concentraciones de ambos fármacos a la vez.

Es importante dejar claro, por último, el que según estos hechos los lugares de fijación periférica para benzodiazepinas parecen ser verdaderos receptores, así como que el PK 11195 presenta un efecto "per se" sobre el corazón,

especialmente sobre su sistema automático y que se comporta como antagonista no puro del R05-4864.

TABLAS

TABLA 1: Farmacocinética de las principales benzodiazepinas'

BENZODIAZEPINA	VIDA MEDIA	METABOLITOS
clordiazepóxido	larga (50-30 h.)	- lactama de clordiazepóxido - desmetilclordiazepóxido
diazepán	larga (20-50 h.)	- temazepán - oxazepán
medazepán	larga	- diazepán - nordiazepán - otros
clorazepato	mediana	- desmetildiazepán
lorazepán	breve(8-25 h.)	- glucuronato de oxazepán (inactivo)
oxazepán	breve(5-15 h.)	- oxazepán glucurónico (inactivo)
bromazepán	breve (20 h.)	- 3-hidroxi-bromazepán

(3,6,19,21,22,25,26).

TABLA 2: Relación de las benzodiacepinas sintetizadas más recientemente, según el tipo de metabolismo y vida media.

FARMACO	PASO DEL METABOLISMO	METABOLITOS ACTIVOS EN SANGRE	VIDA MEDIA
clobazán	oxidación (DM)	clobazán desmetilclobazán	larga
halacepán	oxidación (DA)	halacepán desmetildiacepán	corta larga
ketazolán	oxidación (OH)	desmetildiacepán	larga
alprazolán	oxidación (OH)	alprazolán	intermedia
temazepán	conjugación	temazepán	intermedia
lormetacepán	conjugación	lormetacepán	intermedia
clotiacepán	oxidación (OH, DM)	clotiacepán hidroxiclotiacepán desmetildiacepán	corta-intermedia
midazolán	oxidación (OH)	midazolán	ultracorta
triazolán	oxidación (OH)	triazolán	ultracorta
brotiazolán	oxidación	brotiazolán	ultracorta

Clave: DM= desmetildiacepán; DA= dealquilación; OH= hidroxilación (22)

TABLA 3: Benzodiazepinas más usadas en la ansiedad y dosis orales empleadas.

BENZODIAZEPINA	DOSIS	INDICACIONES A TENER EN CUENTA
clordiazepóxido	10 mg./2-4 veces/día	- utilizar el 50% en ancianos - duplicar en casos necesarios
diazepán	5 mg./2-4 veces/día	- utilizar el 50% en ancianos - 0.3 mg./Kg./día en niños - duplicar en casos necesarios
oxacepán	15 mg./2-4 veces/día	- idem. clordiazepóxido
loracepán	2 mg./2-3 veces/día	- idem. clordiazepóxido
bromacepán	3 mg./ 3 veces/día	- idem. clordiazepóxido
clonazepam	1 mg./ 3 veces/día	- idem. clordiazepóxido
medazepán	5 mg./2-4 veces/día	- idem. clordiazepóxido
temazepán	5 mg./2-4 veces/día	- idem. clordiazepóxido
clorazepato potásico	10 mg./2-3 veces/día	- idem. clordiazepóxido
prazepán	10 mg./2-3 veces/día	- idem. clordiazepóxido
clobazán	10 mg./2-3 veces/día	- idem. clordiazepóxido

TABLA 4: EFECTO DEL RO5-4864 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-5} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	83.74	74.82	74.57	77.68	75.85	80.57
2	100	68.57	74.82	68.57	80	100	108
3	100	83.33	76.67	96.67	100	86.67	100
4	100	89.19	78.38	64.81	67.56	54.05	70.27
5	100	104.65	90.70	86.05	81.40	79.07	65.12
6	100	72.97	54.05	56.76	59.46	59.46	59.46
\bar{X}	100	83.74	74.82	74.57	77.68	75.85	80.57
E.S.M.	-	5.20	4.83	5.97	5.63	6.96	8

TABLA 5: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-5} M (% CONTROL).

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	62.5	62.5	62.5	100	100	87.5
2	100	85.71	85.71	71.43	76.19	80.95	71.43
3	100	91.7	83.4	87.5	75.	54.2	42
4	100	106.7	93.33	90	90	90	90
5	100	87.2	80.9	55.3	55.3	55.3	51.1
6	100	100	97.7	100	100	100	93.4
\bar{X}	100	89	83.8	77.8	82.7	80.1	72.6
E.S.M.	-	6.2	4.9	7.1	7.1	8.5	8.9

TABLA 6: EFECTO DEL RO5-4864 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M(% CONTROL).

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	105	85	95	75	72.5	72.5
2	100	80	76.67	70	58.34	53.33	51.67
3	100	70.31	59.38	54.96	59.38	59.38	53.13
4	100	63.33	70	66.57	73.33	80	76.67
5	100	90	75	70	65	60	60
6	100	80.95	76.19	88.95	85.71	90.48	76.19
\bar{X}	100	81.6	73.7	72.9	69.5	69.3	65
E.S.M.	-	6	3.5	5.6	4.3	5.8	4.7

TABLA 7: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M (% CONTROL).

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	98.4	101.6	100.32	102.7	104.7	109.3
2	100	100	103.33	100	113.33	116.67	120
3	100	103.12	112.5	112.5	112.5	103.12	106.26
4	100	96	92	96	100	112	116
5	100	92.86	89.29	85.71	76.79	73.21	82.14
6	100	100	111.11	107.41	111.11	118.52	122.22
\bar{X}	100	98.4	101.65	100.32	102.7	104.7	109.3
E.S.M.	-	1.47	3.9	3.79	5.65	6.78	5.98

TABLA 8: EFECTO DEL R05-4864 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	131.25	106.25	187.5	168.75	175	175
2	100	109.75	90.24	97.56	95.12	93.9	78.04
3	100	100	100	77.68	97.37	73.69	84.21
4	100	125	111.11	116.67	66.67	41.67	41.67
5	100	138.89	166.66	161.11	161.11	136.11	100
6	100	60	83.33	106.66	116.66	110	80
\bar{X}	100	110.81	109.6	124.52	117.61	105.06	93.15
E.S.M.	-	11.7	12.14	16.94	16.32	19.14	18.14

TABLA 9: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} M$ (% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	100	104.54	86.36	86.36	104.54	54.54
2	100	83.33	60.67	83.33	83.33	100	116.67
3	100	92.31	138.46	111.54	76.92	65.38	50
4	100	103.85	100	84.61	84.61	38.46	34.61
5	100	120	122.5	155	132.5	105	95
6	100	116.13	109.68	90.32	93.55	90.32	77.42
\bar{X}	100	102.6	106.97	101.86	92.88	83.45	71.37
E.S.M.	-	5.69	9.86	11.45	8.22	10.47	12.57



TABLA 10: EFECTO DEL RO5-4864 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-7} M(% CONTROL).

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	75.44	50.80	59.65	63.16	64.91	92.98
2	100	116.67	85.71	90.48	85.71	95.24	90.48
3	100	96.43	100	103.57	107.14	103.57	107.14
4	100	77.78	94.44	116.67	111.11	100	100
5	100	94.12	94.12	75	75	75	75
6	100	92	68	48	72	96	96
\bar{X}	100	92.1	82.2	83.9	85.7	89	93.6
E.S.M.	-	6.1	7.8	10.1	8	6.3	4.4

TABLA 11: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $10^{-7}M$ (% CONTROL).

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	106.03	107.86	101.34	101.66	95.14	101.6
2	100	107.41	111.11	114.81	118.52	114.81	118.52
3	100	95.24	100	95.24	90.48	76.19	104.76
4	100	105.55	111.11	100	94.44	94.44	111.11
5	100	121.95	117.07	96.68	104.88	90.25	85.37
6	100	100	100	100	100	100	85.71
\bar{X}	100	106.03	107.86	101.34	101.66	95.14	101.09
E.S.M.	-	3.69	2.76	2.85	3.97	5.14	5.48

TABLA 12: EFECTO DEL R05-4864 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $10^{-5}M$ (% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	98.21	97.15	87.57	82.72	76.31	74.79
2	100	92.68	92.68	85.36	70.73	39.02	36.50
3	100	100	94.59	86.49	87.78	87.78	81.08
4	100	93.87	97.96	81.63	81.63	71.43	72.79
5	100	102.13	95.74	91.49	82.98	100	97.87
6	100	102.38	104.76	92.86	90.47	83.33	85.71
\bar{X}	100	98.21	97.15	87.57	82.72	76.31	74.79
E.S.M.	-	1.69	1.7	1.68	2.77	8.48	8.49

TABLA 13: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-5} M(% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	103.22	93.54	93.54	100	100	100
2	100	87.5	82.5	87.5	90	92.5	87.5
3	100	82	81.6	78.79	81.6	76.3	76.3
4	100	97.4	97.4	97.4	97.4	100	102.6
5	100	96.1	84.3	72.5	70.6	72.5	68.6
6	100	97.3	94.6	91.9	86.5	89.2	91.9
\bar{X}	100	95.6	89	87	87.7	88.4	87.8
E.S.M.	-	2.2	2.8	3.9	4.4	4.8	5.4

TABLA 14: EFECTO DEL RO5-4864 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M(% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	110.26	84.62	94.87	92.31	87.18	84.62
2	100	93.22	95.48	86.64	86.44	81.36	74.58
3	100	92.86	91.07	91.07	91.07	89.29	91.07
4	100	78.95	70.18	68.42	68.42	63.16	59.65
5	100	94	86	80	78	76	74
6	100	91.23	89.47	85.96	78.95	78.95	75.44
\bar{X}	100	93.44	86.13	84.4	82.5	79.3	76.6
E.S.M.	-	4.1	3.6	3.8	3.7	3.8	4.4

TABLA 15: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M(% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	89.36	80.55	79.59	79.1	71.6	69.97
2	100	85.37	75.61	73.17	70.73	65.85	65.85
3	100	88.68	88.68	88.68	90.56	88.68	86.79
4	100	90.57	75.47	77.36	75.47	71.7	69.81
5	100	93.62	82.98	78.72	70.21	65.96	61.70
6	100	88.57	80	80	71.43	65.71	65.71
\bar{X}	100	89.36	80.55	79.59	75.7	71.6	69.97
E.S.M.	-	1.1	2.02	2.07	3.13	3.61	3.59

TABLA 16: EFECTO DEL R05-4864 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (% CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	84	71	69	72	66	68
2	100	96	80	72	73	62	60
3	100	88.89	76.67	64.44	74.44	68.89	66.67
4	100	92.04	86.36	75	79.54	68.18	68.18
5	100	84.7	74.12	64.7	63.53	64.7	56.47
6	100	83.33	87.18	80.77	67.95	58.97	70.51
\bar{X}	100	88.16	79.22	70.98	71.74	64.79	64.97
E.S.M.	-	2.07	2.67	2.57	2.24	1.54	2.23

TABLA 17: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	100	106.58	102.63	103.95	93.42	78.95
2	100	93.55	88.71	59.68	53.23	53.23	51.61
3	100	84.81	69.62	63.29	62.02	59.49	58.23
4	100	87.95	77.11	72.29	84.34	72.29	72.29
5	100	82.61	62.39	63.04	69.56	64.13	60.87
6	100	98.51	91.04	83.58	59.70	25.37	25.37
\bar{X}	100	91.24	83.41	74.08	72.13	61.29	57.89
E.S.M.	-	2.95	6.08	6.72	7.71	9.14	7.65

TABLA 18: EFECTO DEL R05-4864 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	97.10	85.50	85.50	78.26	78.26	79.71
2	100	93.55	93.55	93.55	93.55	96.77	96.77
3	100	92.16	92.16	84.31	90.20	86.27	86.27
4	100	100	97.22	83.33	77.78	83.33	86.11
5	100	100	65.22	95.62	91.30	95.65	95.65
6	100	100	93.44	90.16	95.08	91.80	88.52
\bar{X}	100	97.14	87.8	88.5	87.7	88.7	88.8
E.S.M.	-	1.4	4.8	2.3	3.1	3	2.6

TABLA 19: EFECTO DEL DMSO SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	87.62	81.34	78.41	76.04	74.76	73.56
2	100	95.12	92.68	87.80	85.37	85.37	82.93
3	100	85	82.5	80	77.5	77.5	75
4	100	82.5	72.5	72.5	65	62.5	60
5	100	92.16	82.35	78.43	82.35	78.43	80.39
6	100	83.33	76.67	73.33	70	70	70
\bar{X}	100	87.62	81.34	78.41	76.04	74.76	73.56
E.S.M.	-	2.08	2.77	2.24	3.09	3.19	3.33

TABLA 20: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-5} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25	30'
1	100	77.77	83.33	66.66	52.77	55.55	52.77
2	100	126.66	146.66	126.66	106.66	120	126.66
3	100	76.47	105.88	100	76.47	70.58	58.82
4	100	86.67	86.67	93.33	66.67	70	63.33
5	100	100	82.35	79.41	67.64	61.76	58.82
6	100	77.27	68.18	63.64	68.18	72.73	63.64
\bar{X}	100	90.81	95.51	88.28	73.06	75.10	70.67
E.S.M.	-	8.05	11.36	9.64	7.4	9.36	11.31

TABLA 21: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	97.2	87.24	87.24	88.9	86.58	82.57
2	100	95.5	95.5	95.5	90.9	75	68
3	100	112.5	100	106.25	100	100	100
4	100	100	95.83	100	100	108.33	104.16
5	100	81.8	45.45	36.36	38.63	40.9	36.36
6	100	108.69	86.95	104.43	108.69	108.69	104.34
\bar{X}	100	97.2	87.24	87.24	88.9	86.58	82.57
E.S.M.	-	3.59	9.18	10.45	10.56	10.58	10.94

TABLA 22: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	100	116.67	162.5	129.17	58.33	33.33
2	100	63.33	76.66	73.33	83.33	80	80
3	100	100	155.55	155.55	88.88	66.66	44.44
4	100	100	150	125	116.67	116.67	108.33
5	100	116.66	133.33	133.33	150	127.77	116.66
6	100	65.21	82.6	104.34	108.69	130.43	130.43
\bar{X}	100	90.86	119.13	125.67	112.79	96.64	85.53
E.S.M.	-	8.8	13.7	13.6	10.2	13.1	16.27

TABLA 23: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	100	103.33	96.66	96.66	93.33	90
2	100	89.47	89.47	89.47	81.58	84.21	84.21
3	100	100	100	110	116.66	110	103.33
4	100	92.5	85	72.5	125	125	125
5	100	94.11	94.11	82.35	64.70	76.47	88.23
6	100	100	95	90	100	92.5	97.5
\bar{X}	100	96.01	94.48	90.16	97.43	96.9	98.04
E.S.M.	-	1.8	2.7	5.1	9.02	7.2	6.04

TABLA 24: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-5} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	89.74	71.79	69.23	69.23	64.10	61.53
2	100	74.13	60.34	55.17	53.44	46.55	44.82
3	100	100	84.37	84.37	84.37	87.5	81.25
4	100	96	92	86	104	84	80
5	100	76.08	54.34	54.34	45.65	51.44	45.65
6	100	94.85	92.31	92.31	82.05	84.62	82.05
\bar{X}	100	88.47	75.85	73.57	73.12	69.70	65.88
E.S.M.	-	4.44	6.64	6.7	8.79	7.4	7.23

TABLA25: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-6} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	97.62	95.35	90.07	87.99	84.56	83.13
2	100	97.6	95.2	88	85.7	81	81
3	100	96.8	96.8	96.8	90.3	87.1	87.1
4	100	111.11	100	91.66	94.44	91.66	88.88
5	100	93.47	86.95	78.26	76.04	71.74	68.56
6	100	89.13	97.82	95.65	93.47	91.30	89.13
\bar{X}	100	97.62	95.35	90.07	87.99	84.56	83.13
E.S.M.	-	3	1.83	2.72	2.73	3.05	3.02

TABLA 26: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	95.71	88.57	77.14	68.57	102.86	104.28
2	100	80.2	81.19	79.21	77.23	73.27	71.29
3	100	87.88	81.82	83.33	84.85	87.88	87.88
4	100	91.14	88.61	83.54	77.21	84.81	88.61
5	100	97.67	86.04	82.56	82.56	81.39	81.39
6	100	91.17	89.21	84.31	82.35	81.37	81.37
\bar{X}	100	90.62	85.9	81.68	78.79	85.26	85.8
E.S.M.	-	2.5	1.46	1.16	2.4	4.04	4.48

TABLA 27: EFECTO DEL PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO A LA CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	102.77	94.44	88.88	88.88	86.11	80.55
2	100	85.77	81.63	79.59	73.47	73.47	71.43
3	100	97.56	95.12	90.24	87.80	85.36	90.24
4	100	93.75	89.58	93.75	93.75	87.5	87.5
5	100	100	109.67	74.19	70.96	77.41	77.41
6	100	97.72	79.54	84.09	81.81	77.27	77.27
\bar{X}	100	93.2	91.7	85.12	82.77	81.18	80.73
E.S.M.	-	3.6	4.4	2.9	3.69	2.3	2.8

TABLA 28: EFECTO DEL R05-4864+PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION 10^{-5} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	129.3	147	163.6	159.2	136.7	114.2
2	100	127.27	145.45	200	190.9	172.72	163.63
3	100	128.57	171.42	200	214.8	142.85	121.42
4	100	136.36	136.36	127.27	109.09	109.09	72.72
5	100	109.09	109.09	118.18	118.18	113.63	113.63
6	100	145.45	172.72	172.72	163.63	145.45	100
\bar{X}	100	129.3	147	163.6	159.2	136.7	114.2
E.S.M.	-	4.91	9.67	14.28	16.64	9.5	12.13

TABLA 29: EFECTO DEL R05-4864+PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION 10^{-6} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	91.18	94.12	97.06	102.94	105.88	117.65
2	100	90.48	85.71	95.24	107.14	109.52	114.29
3	100	111.43	85.71	102.86	145.71	120	97.14
4	100	73.08	73.08	90.38	101.92	92.31	100
5	100	108.11	108.11	97.3	86.48	48.65	64.86
6	100	108.33	116.67	108.33	83.33	91.67	75
\bar{X}	100	97.1	93.9	98.53	104.57	94.67	94.82
E.S.M.	-	6.08	6.55	2.55	9.1	10.2	8.6

TABLA 30: EFECTO DEL R05-4864+PK 11195 EN INOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION 5×10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	68.85	75.41	65.57	65.57	49.18	49.18
2	100	97.73	90.91	61.36	57.95	57.95	57.95
3	100	88.1	71.43	80.95	90.48	95.24	66.67
4	100	86.67	70	53.34	53.34	66.67	66.67
5	100	87.1	82.26	93.55	87.1	96.77	103.22
6	100	103.22	119.35	122.58	122.58	67.74	35.48
\bar{X}	100	88.61	84.89	79.53	79.5	72.26	63.19
E.S.M.	=	4.8	7.57	10.42	10.6	7.99	9.34

TABLA 31: EFECTO DEL RO5-4864+PK 11195 SOBRE EL INOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	104.02	100.08	90.38	92.45	95.61	96.43
2	100	100	66.67	70.38	62.5	100	116.67
3	100	123.53	111.76	94.12	82.35	64.70	52.94
4	100	90.7	88.37	79.07	81.4	81.4	83.72
5	100	100	121.87	84.37	112.5	143.75	140.62
6	100	105.87	111.76	123.53	123.53	88.23	88.23
\bar{X}	100	104.02	100.08	90.38	92.45	95.61	96.43
E.S.M.	-	4.45	8.16	7.44	9.11	10.87	12.22

TABLA 32:EFECTO DEL R05-4864+PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO,CONCENTRACION 10^{-5} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	86.5	78.1	82.7	82.2	85.8	69.1
2	100	107.69	100	123.07	115.38	115.38	107.69
3	100	68.75	56.25	56.25	75	81.25	81.25
4	100	73.33	83.3	96.66	90	83.33	16.66
5	100	82.5	80	75	72.5	70	65
6	100	100	70.8	62.5	58.3	79.2	75
\bar{X}	100	86.5	78.1	82.7	82.2	85.8	69.1
E.S.M.	-	6.15	5.89	9.99	7.91	6.31	12.16

TABLA 33:EFECTO DEL R05-4864+PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO,CONCENTRACION 10^{-6} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	85.11	80.85	76.6	76.6	74.47	70.21
2	100	118.75	115.62	100	81.25	75	68.75
3	100	97.5	85	82.5	75	80	87.5
4	100	114.71	114.71	100	88.24	94.12	94.12
5	100	91.67	83.33	83.33	61.11	66.67	61.11
6	100	86.36	97.73	100	86.36	88.64	95.45
\bar{X}	100	99.01	96.21	90.4	78.09	79.82	79.52
E.S.M.	-	5.9	6.45	4.39	4	4.08	5.98

TABLA 34: EFECTO DEL RO5-4864+PK 11195 EN CRONOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	81.25	79.17	77.08	79.17	77.08	75
2	100	86.67	82.22	80	80	68.89	68.89
3	100	107.89	94.74	86.84	78.95	76.32	86.84
4	100	85.87	70.65	75	73.91	69.56	68.48
5	100	84.44	65.55	61.11	57.78	52.22	48.89
6	100	85.9	79.49	73.07	71.79	84.61	88.46
\bar{X}	100	88.67	78.63	75.51	73.6	71.44	72.76
E.S.M.	-	3.92	4.11	3.48	3.43	4.5	5.92

TABLA 35:EFECTO DEL RO5-4864+PK 11195 SOBRE EL CRONOTROPISMO CARDIACO, CONCENTRACION 10^{-7} M(%CONTROL)

Exp.	control	5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	100	91.90	86.77	86.12	75.04	69.26	76.85
2	100	95.12	102.44	100	97.56	56.09	56.09
3	100	88.64	77.27	75	65.91	75	81.82
4	100	91.67	91.67	89.58	46.53	50	83.33
5	100	86.96	73.91	71.74	65.22	65.22	63.04
6	100	97.14	88.57	94.29	100	100	100
\bar{X}	100	91.90	86.77	86.12	75.04	69.26	76.85
E.S.M.	-	1.56	4.73	4.48	8.41	7.16	6.39

FIGURAS

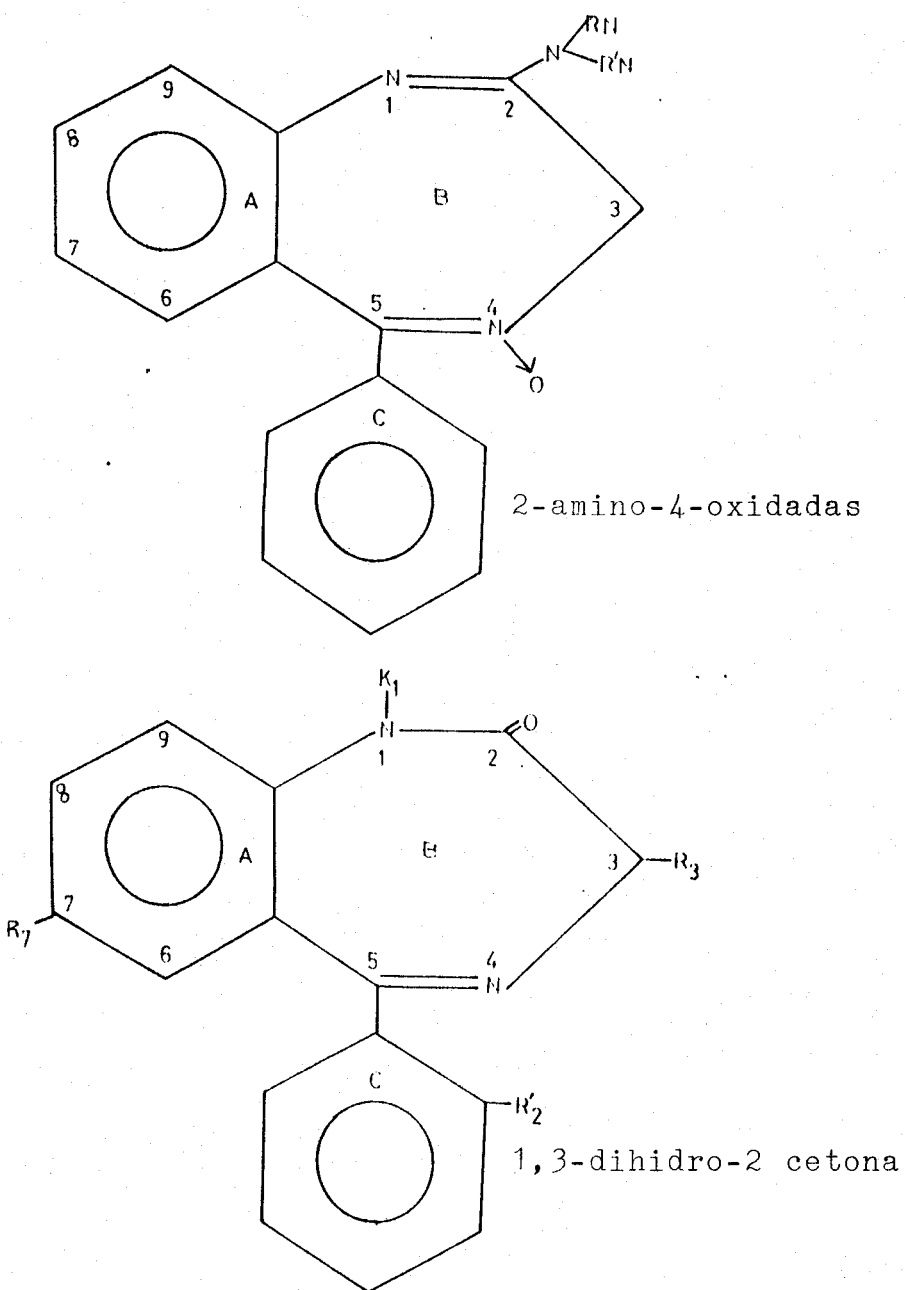
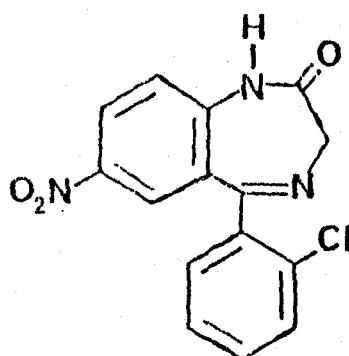


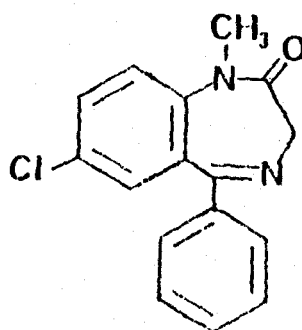
FIGURA 1: Estructura química de las benzodiazepinas (2)

TIPO
CENTRAL

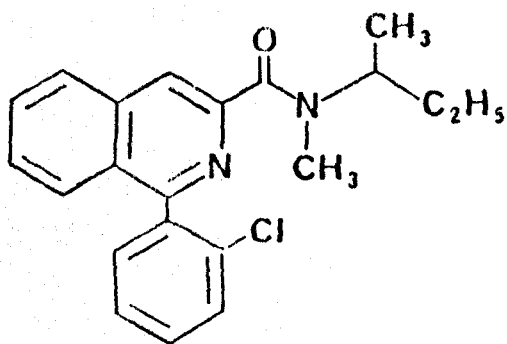


Clonazepam

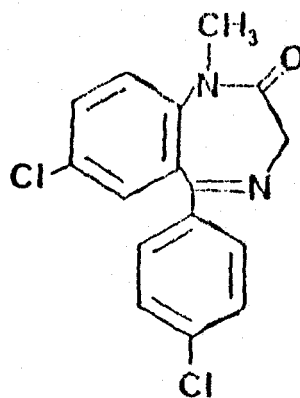
TIPO
PERIFERICO



Diazepam



PK - 11195



Ro - 5.4864

FIGURA 2: Estructura de algunas benzodiazepinas y de PK 11195, clasificadas según la zona del organismo donde ejercen su acción preferentemente (14, 17).

FIGURA 3: REACCIONES METABOLICAS DE LAS BENZODIACEPINAS.(19)

Clave: Los subrayados son utilizados en terapéutica. Los marcados "*" son activos "per se".

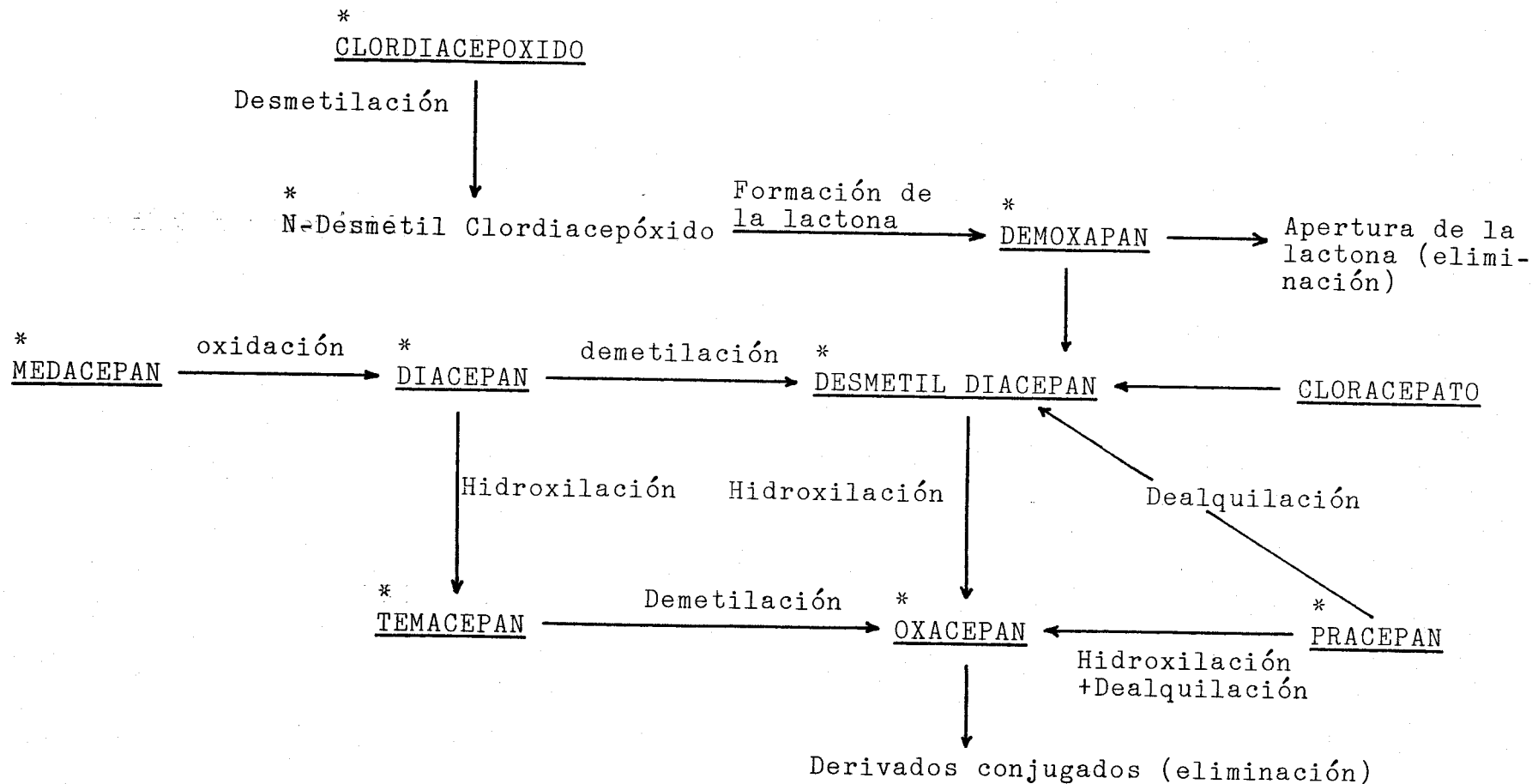
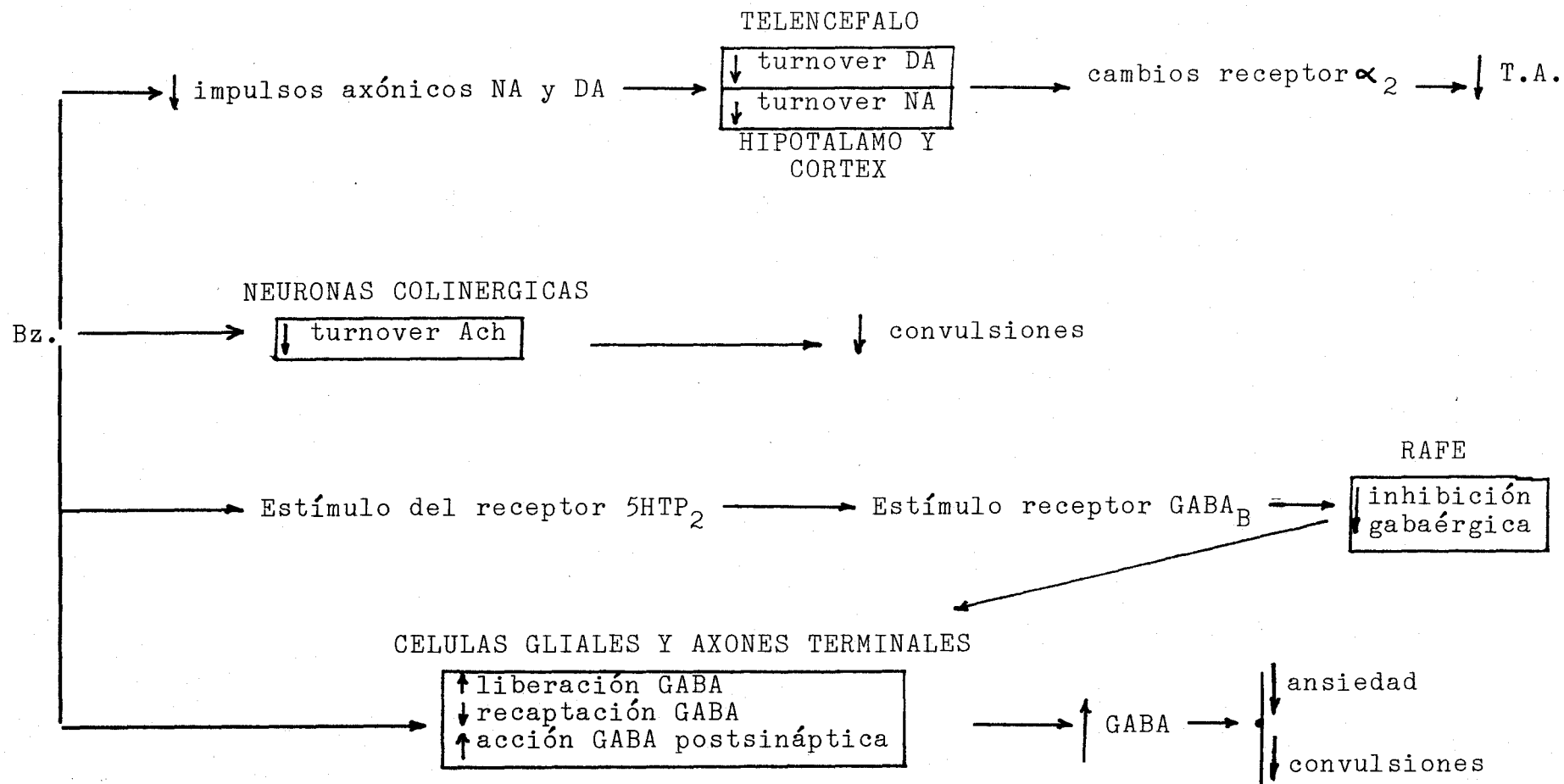
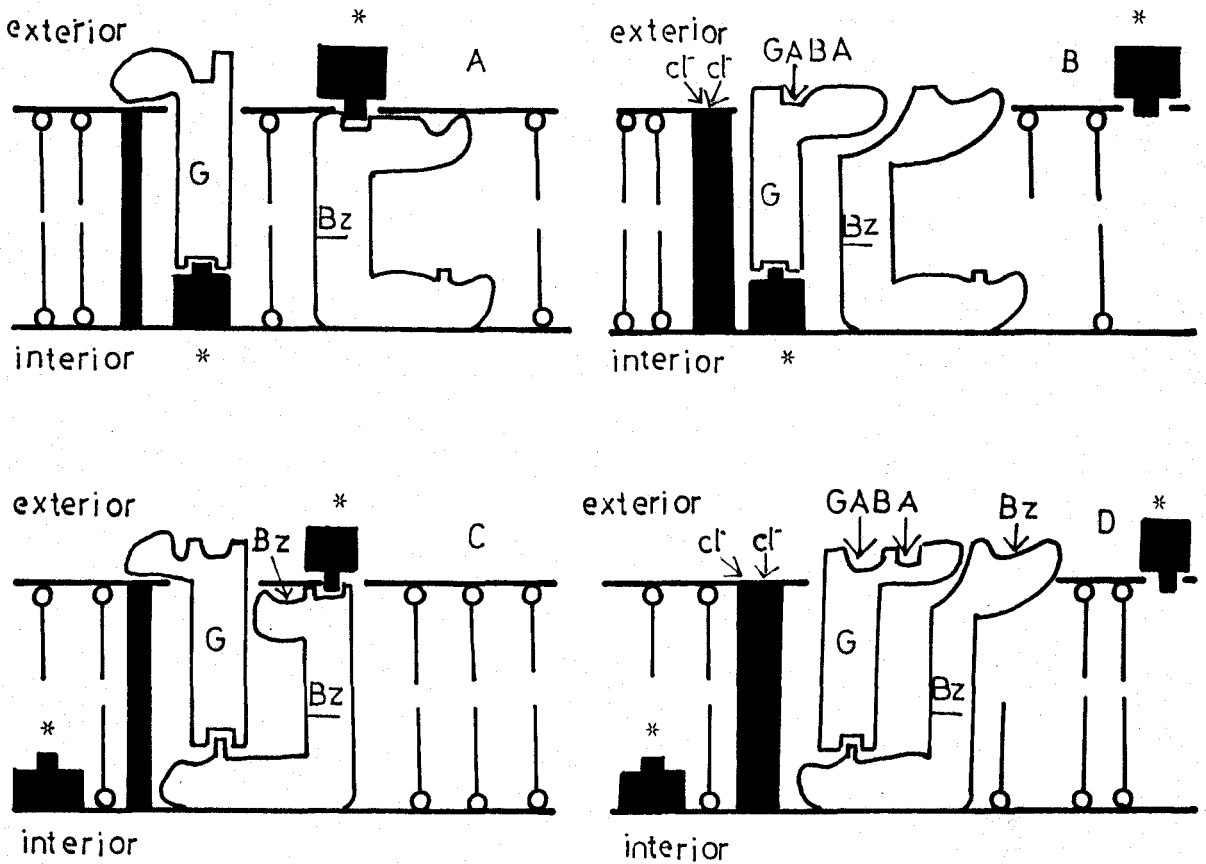


FIGURA 4: Acción de la benzodiacepinas (Bz) sobre los neurotransmisores del SNC (5,6,40,66).





Clave: G=receptor de GABA; Bz=receptor de Bz.; *=proteína moduladora; columna sombreada=canales de cloro.

- A: Estado de reposo
- B: Estimulación del receptor de Bz.: se abren los canales de cloro.
- C: Estimulación del receptor de Bz.: aumento de afinidad del GABA.
- D: Estimulación de los receptores de GABA y Bz.: se abren los canales de cloro y se incrementa la afinidad de los receptores de GABA y Bz.

FIGURA 5: Modelo hipotético de acción de las Bz. sobre la "unidad reguladora del receptor del GABA" (66).

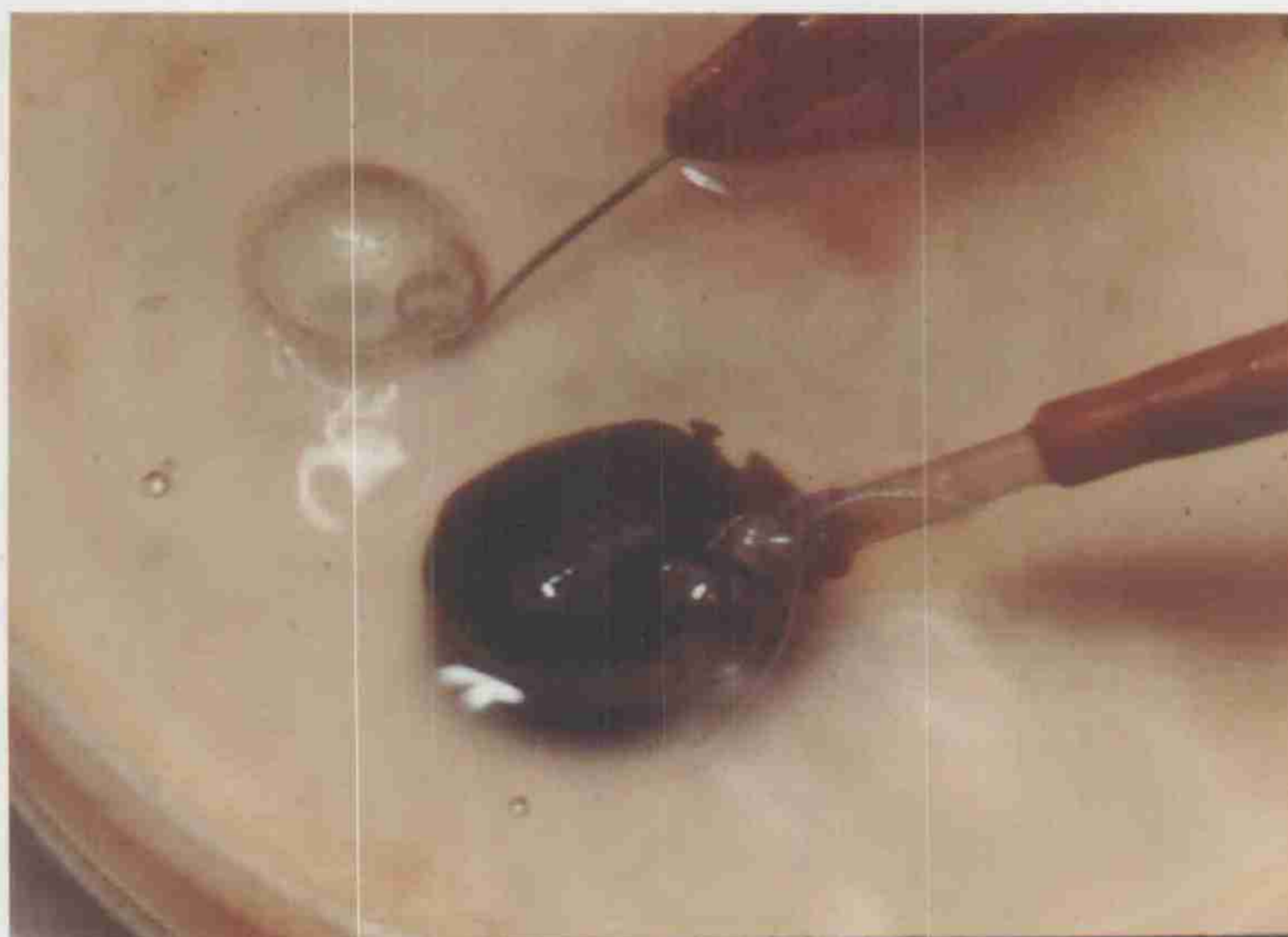


FIGURA 6: Corazón de rata perfundido en solución Ringer, canulado y oxigenado, listo para ser colocado en el sistema de perfusión de Langendorff.

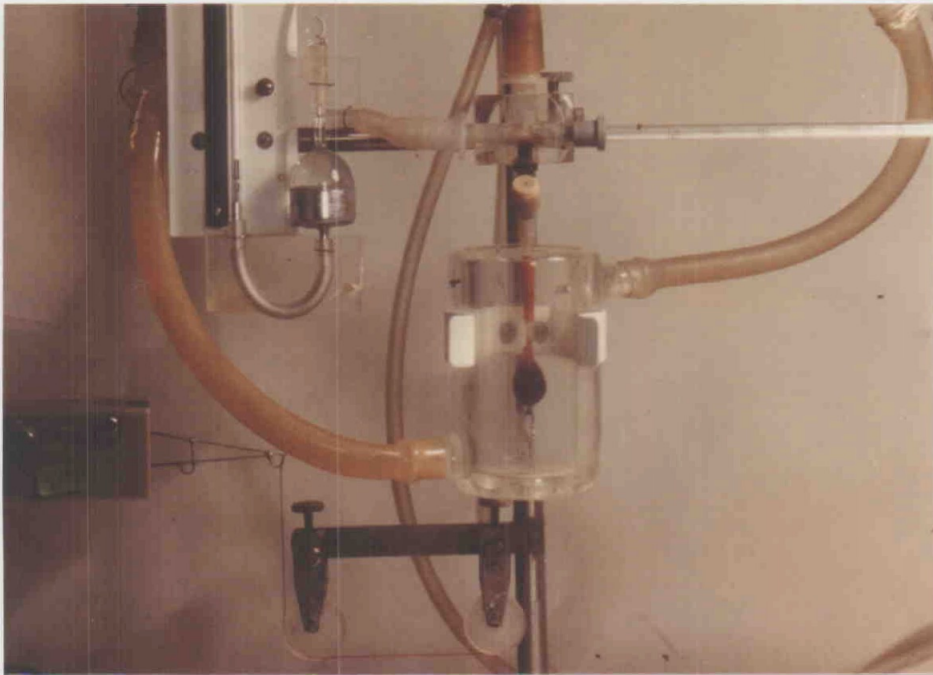


FIGURA 7: Corazón de rata en sistema de Langendorff (detalle).
Puede apreciarse el termómetro, el manómetro, así como el transductor fuerza/desplazamiento.

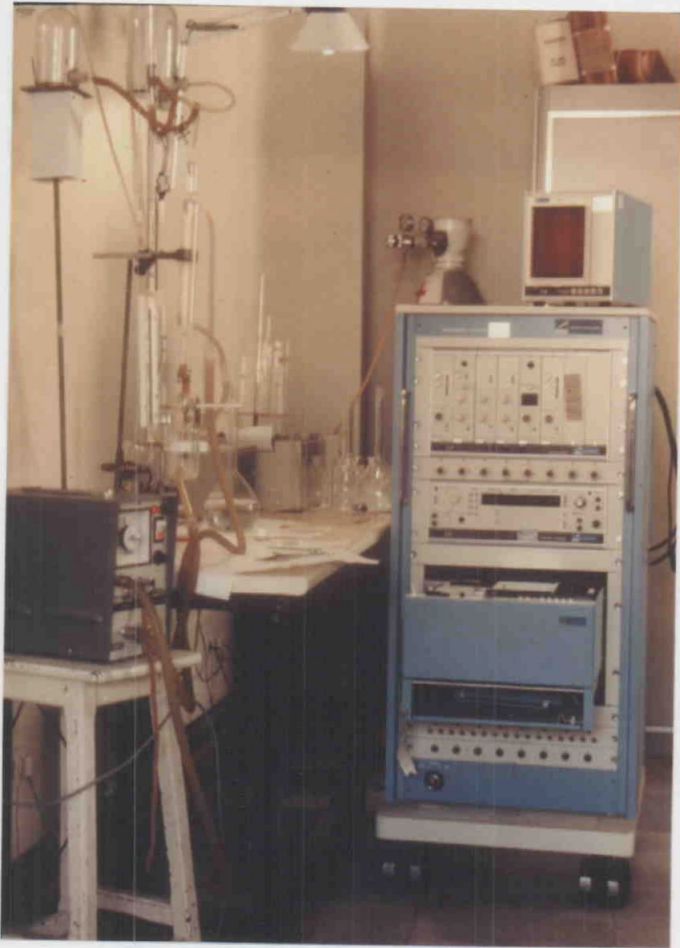


FIGURA 8: Sistema de perfusión de Langendorff. Puede apreciarse el polígrafo utilizado para registrar las experiencias y el baño termostatzado.

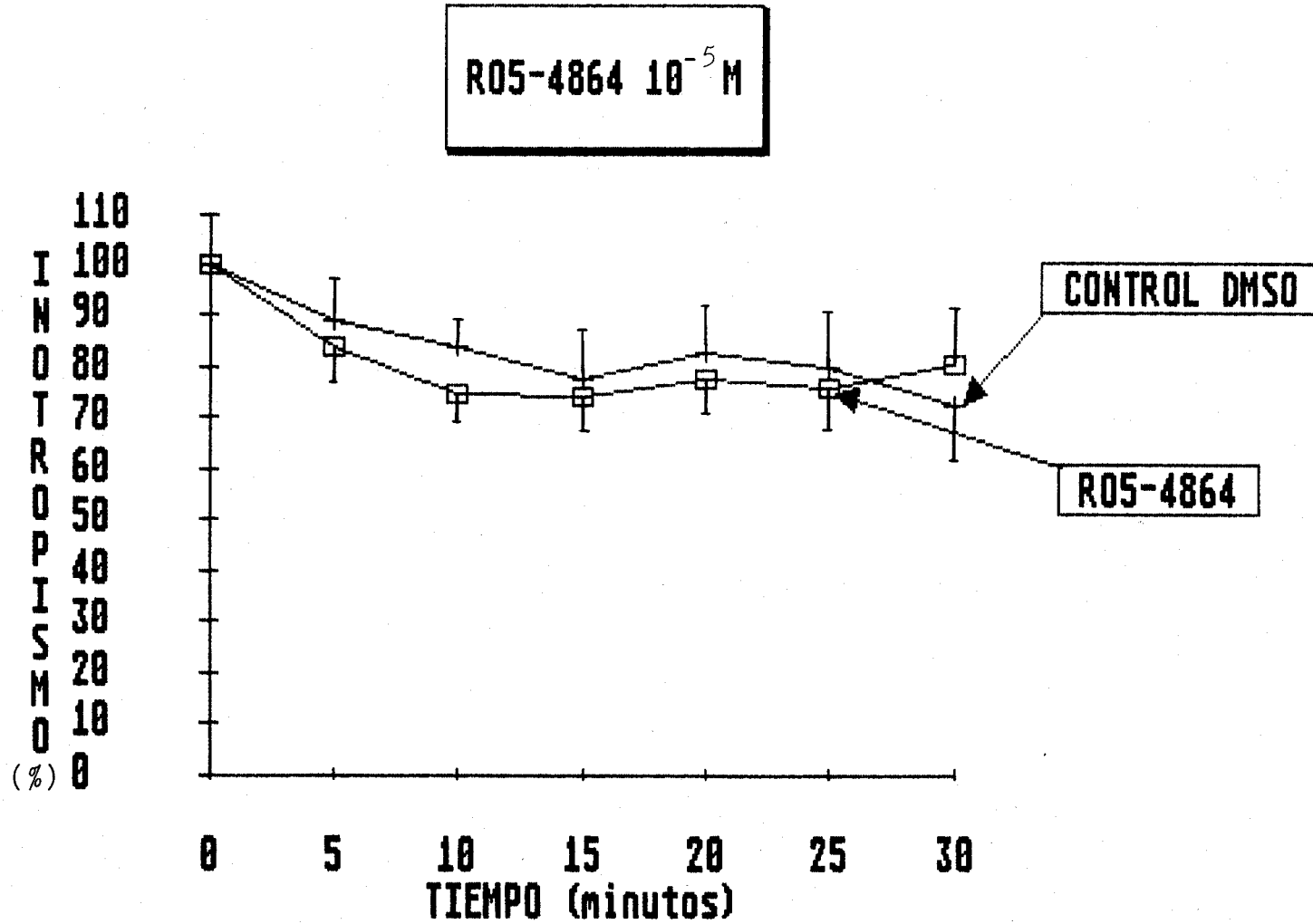


FIGURA 9: Efecto del R05-4864 10^{-5} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

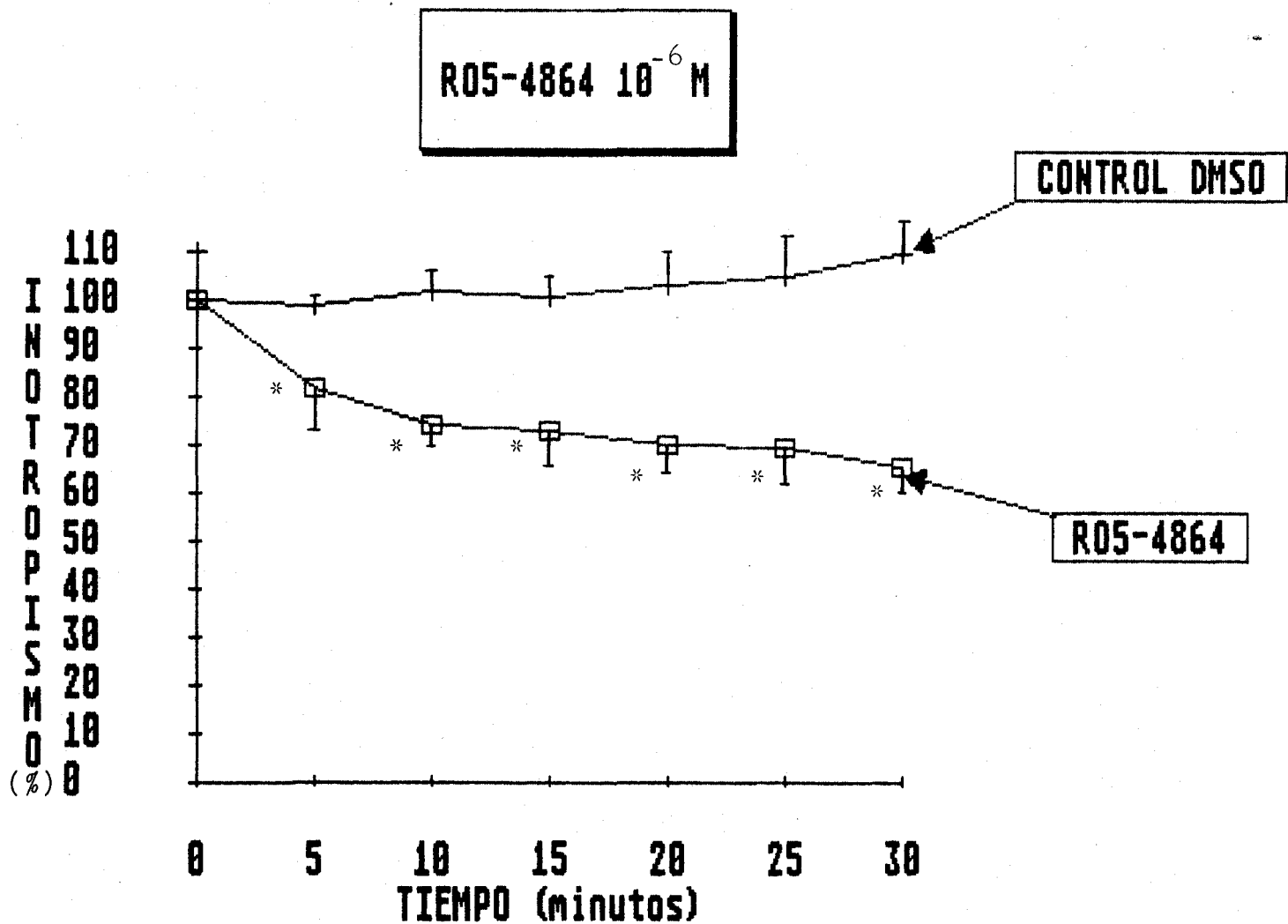
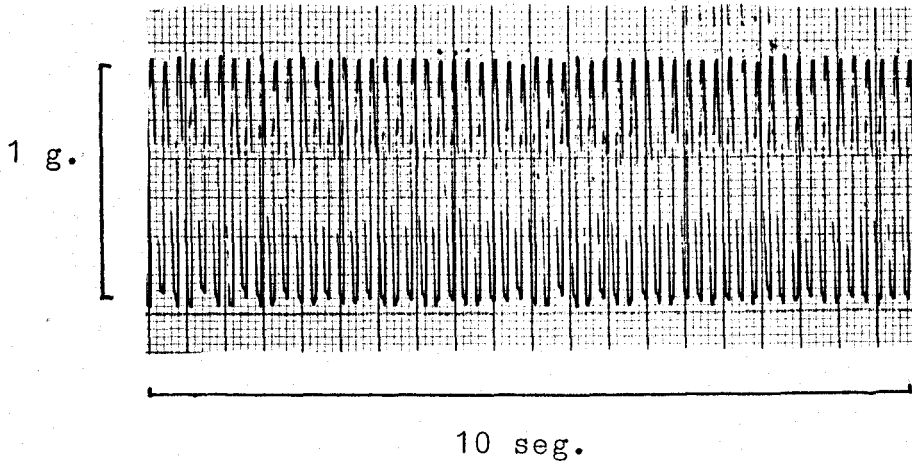
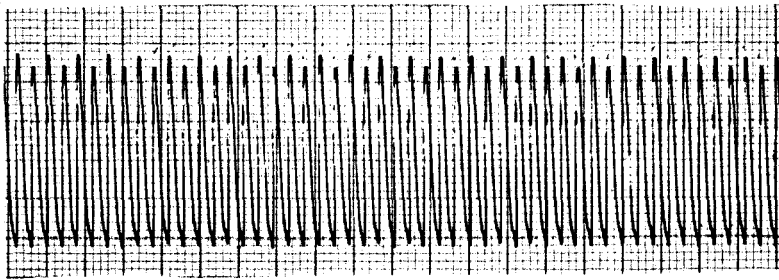


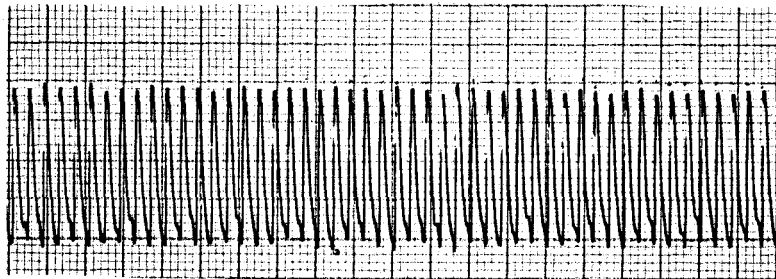
FIGURA 10: Efecto del R05-4864 10^{-6} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ ($p < 0.001$)



CONTROL

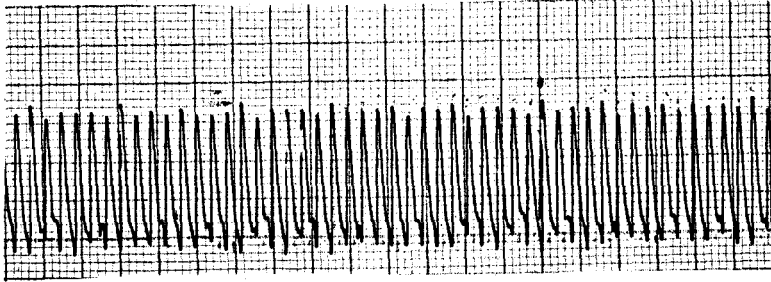


5 MINUTOS (tras fármaco)

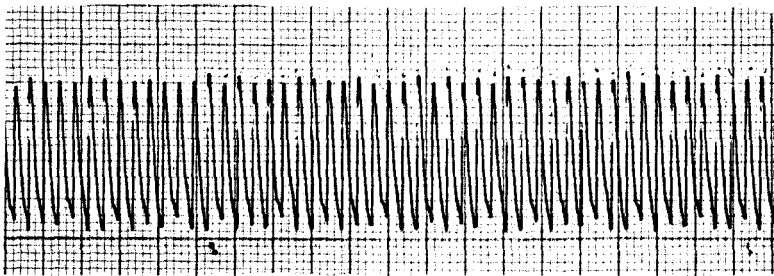


10 MINUTOS (tras fármaco)

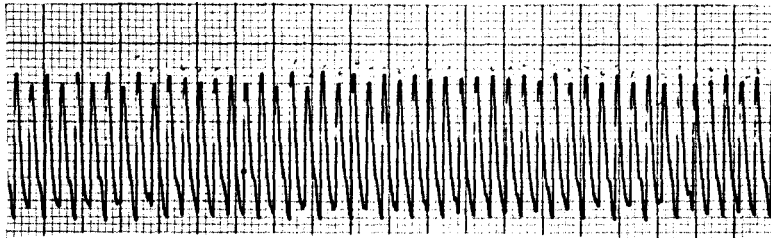
FIGURA 11: Registro experimental del efecto de R05-4864 (10^{-6} M) en corazón aislado de rata.



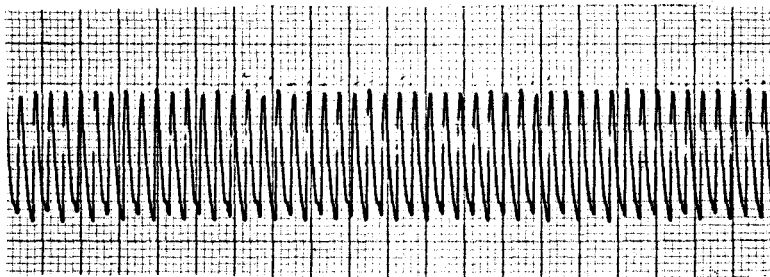
15 MINUTOS (tras fármaco)



20 MINUTOS (tras fármaco)



25 MINUTOS (tras fármaco)



30 MINUTOS (tras fármaco)

FIGURA 11: Continuación.



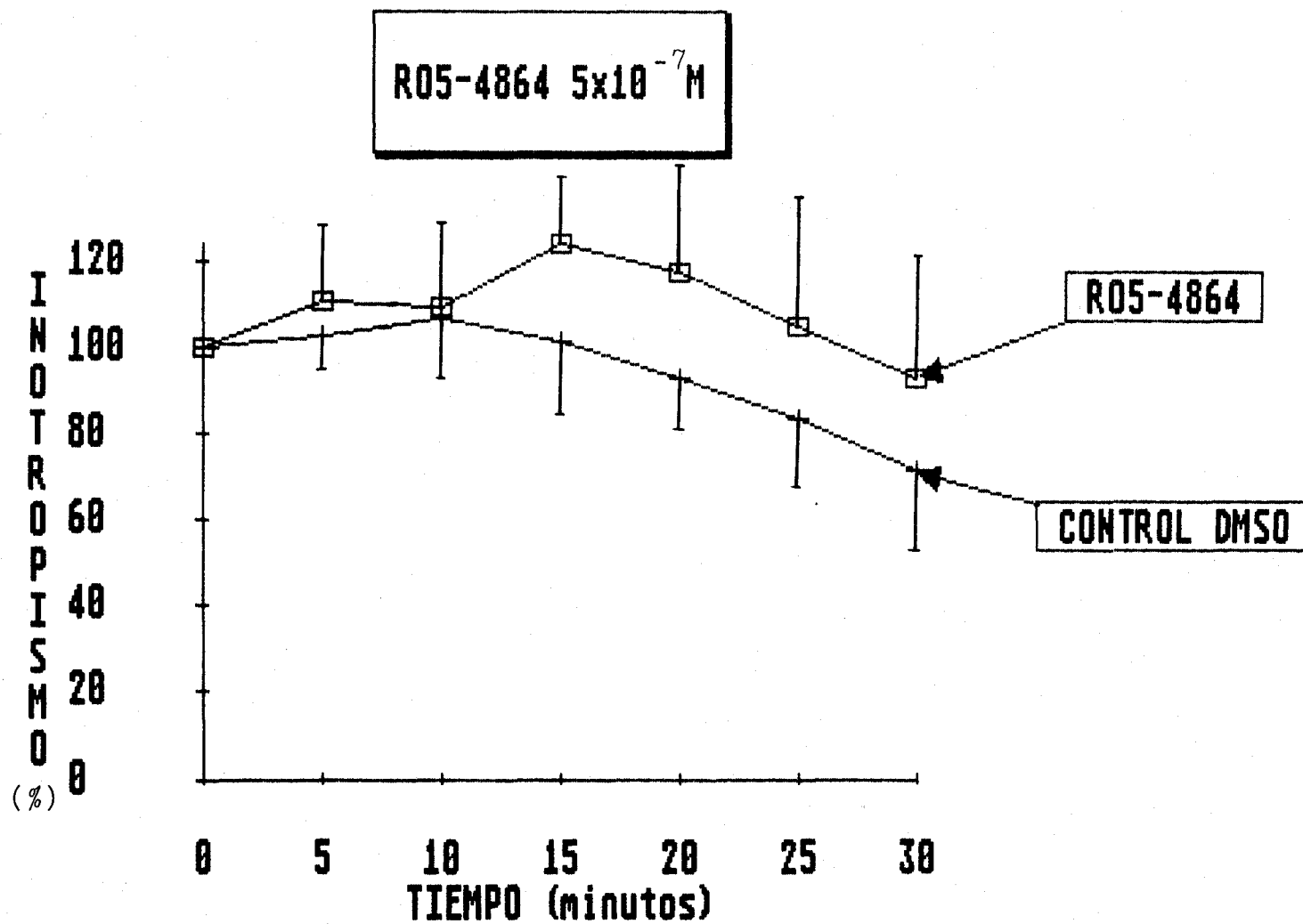


FIGURA 12: Efecto del R05-4864 5×10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

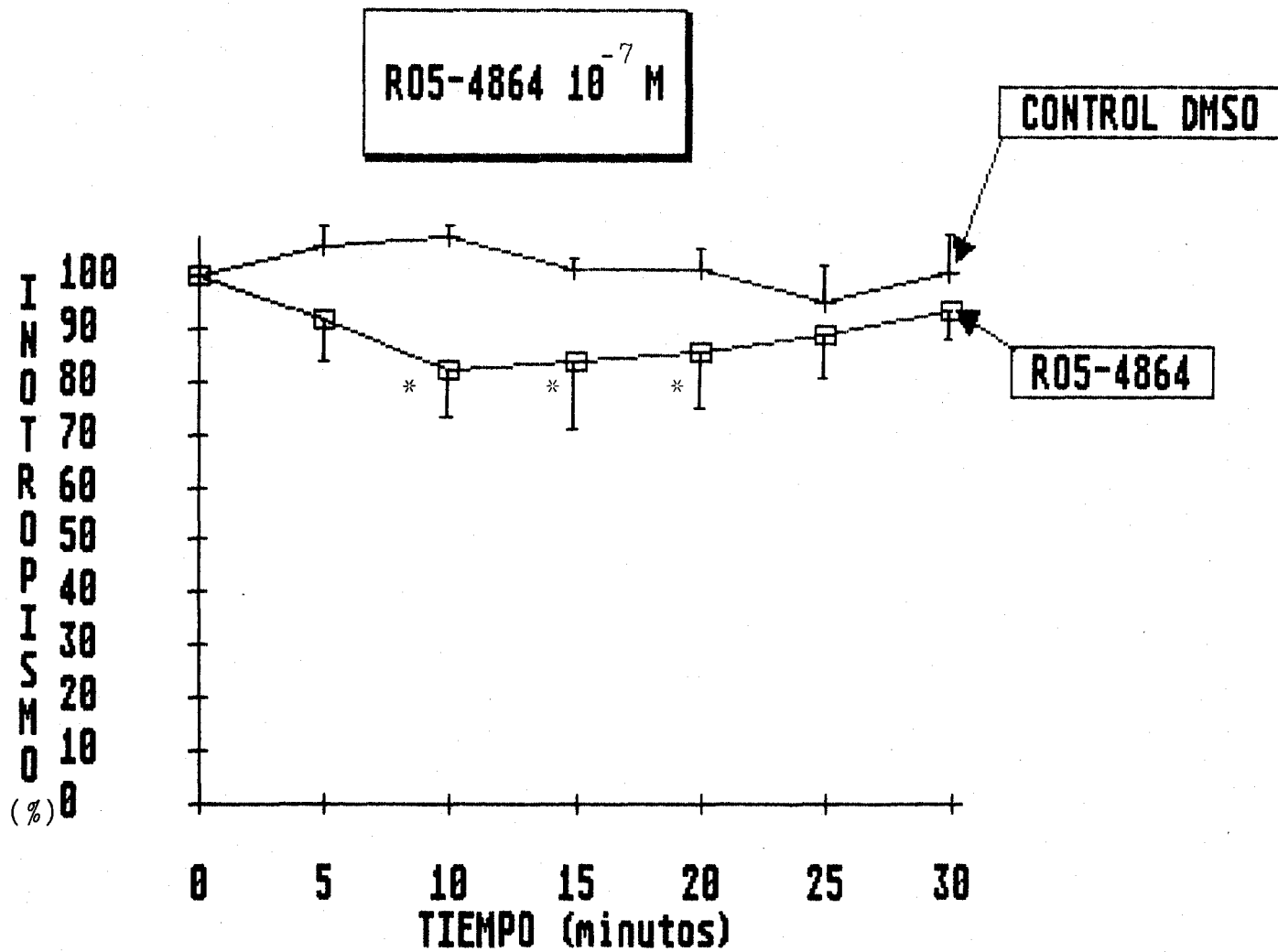
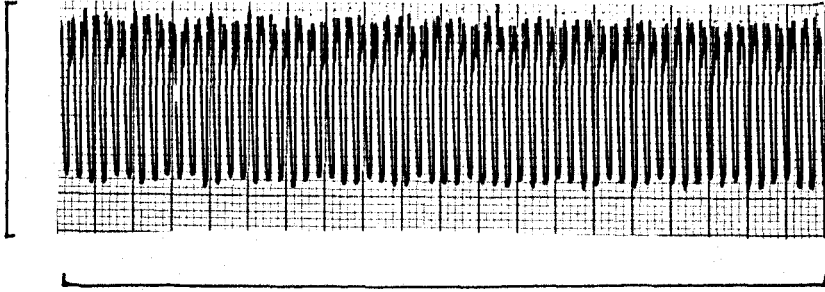


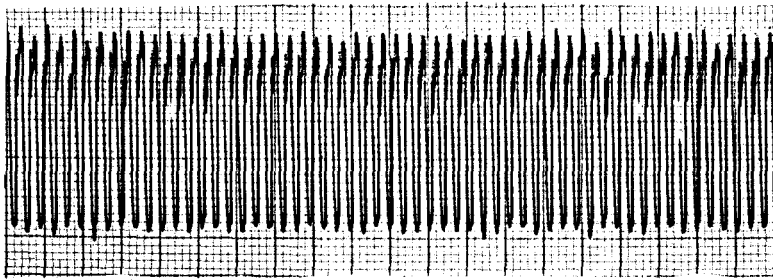
FIGURA 13: Efecto del R05-4864 10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.005$)

1 g.

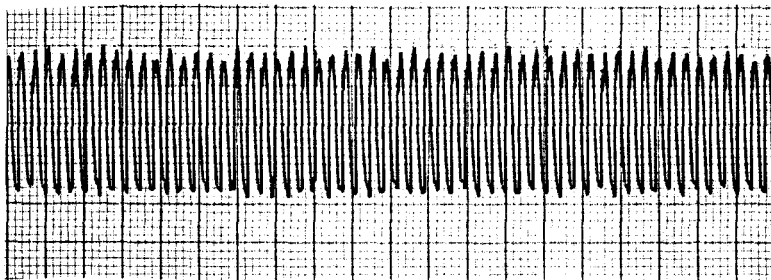


10 seg.

CONTROL

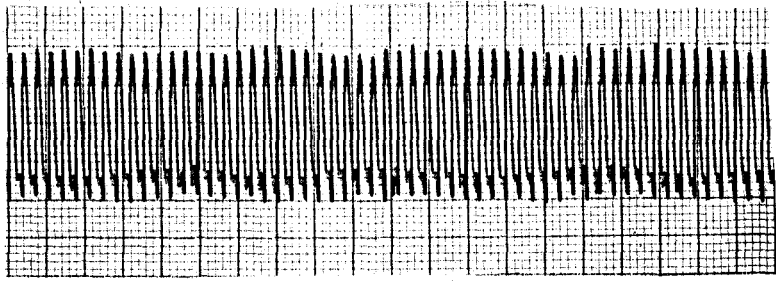


5 MINUTOS (tras fármaco)

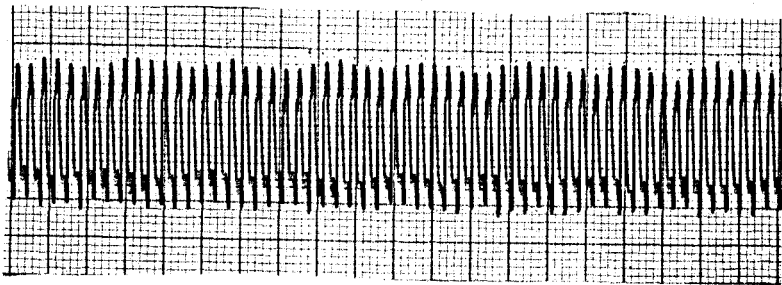


10 MINUTOS (tras fármaco)

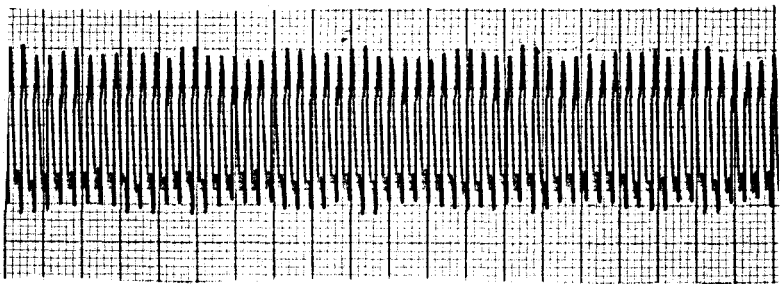
FIGURA 14: Registro experimental del efecto de R05-4864 (10^{-7} M) en corazón aislado de rata.



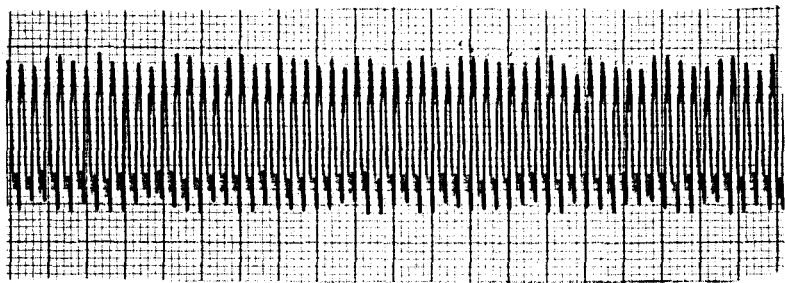
15 MINUTOS (tras fármaco)



20 MINUTOS (tras fármaco)



25 MINUTOS (tras fármaco)



30 MINUTOS (tras fármaco)

FIGURA 14: Continuación.

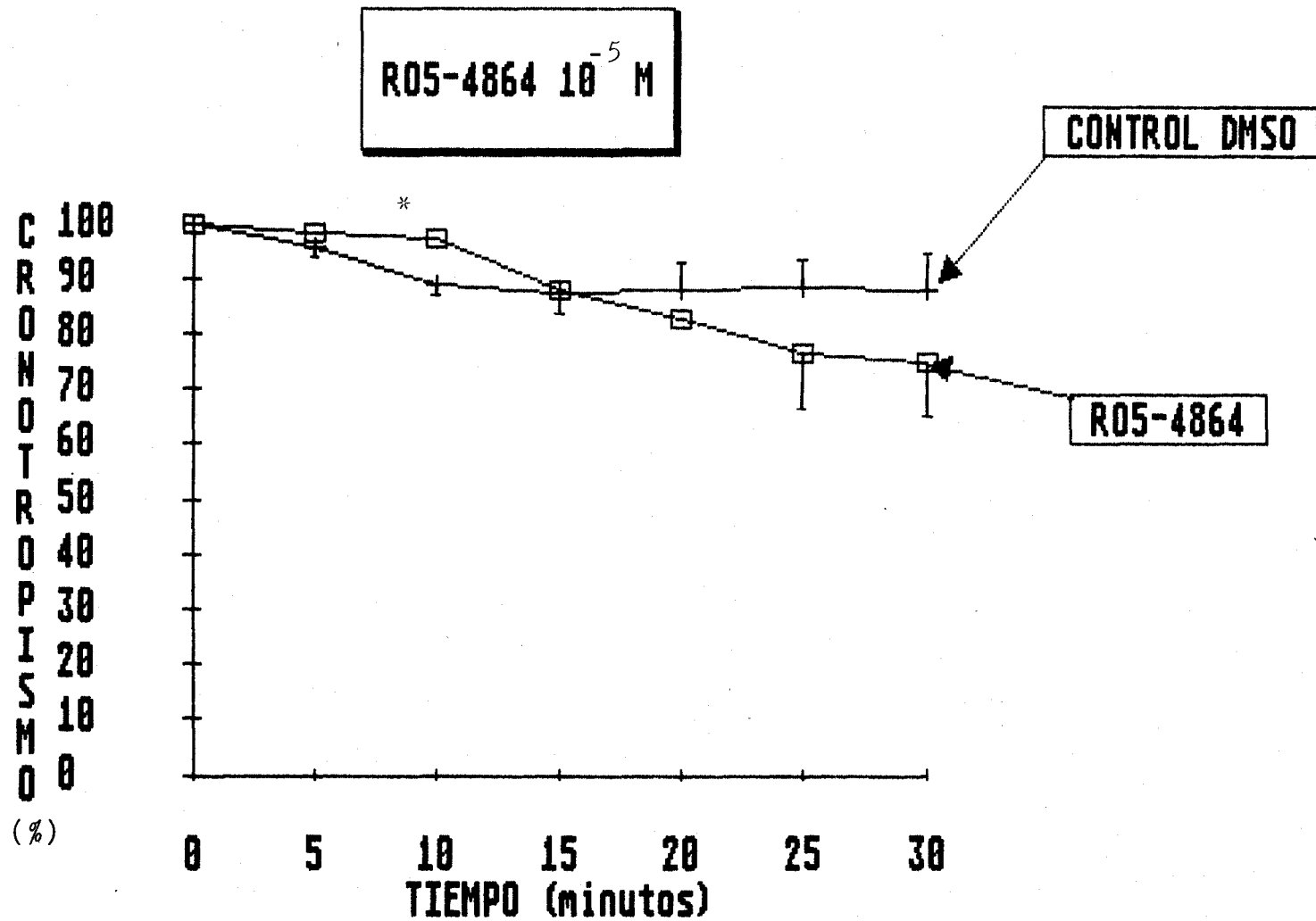


FIGURA 15: Efecto del R05-4864 10^{-5} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.05$)

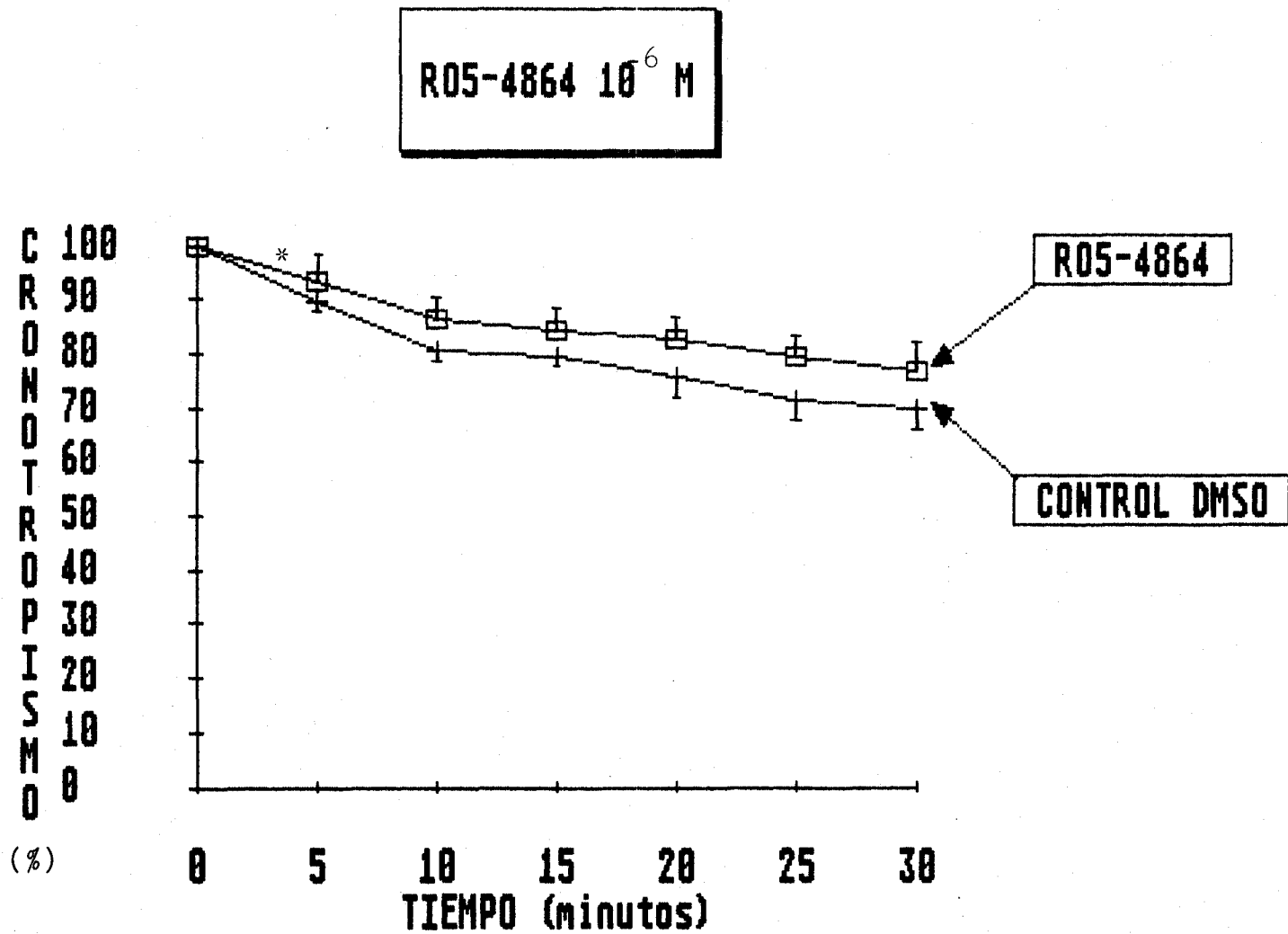


FIGURA 16: Efecto del R05-4864 10^{-6} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.001$)

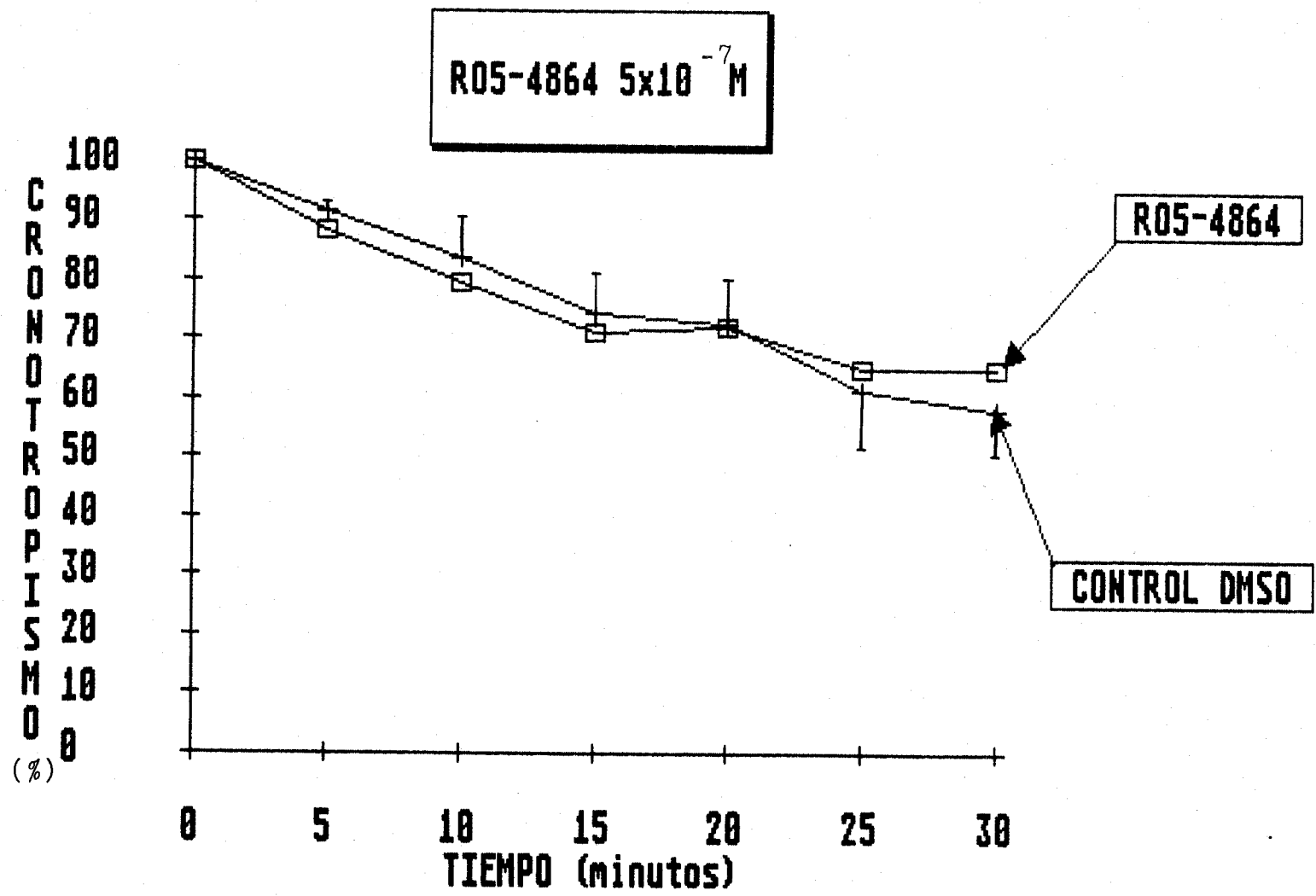


FIGURA 17: Efecto del R05-4864 5×10^{-7} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

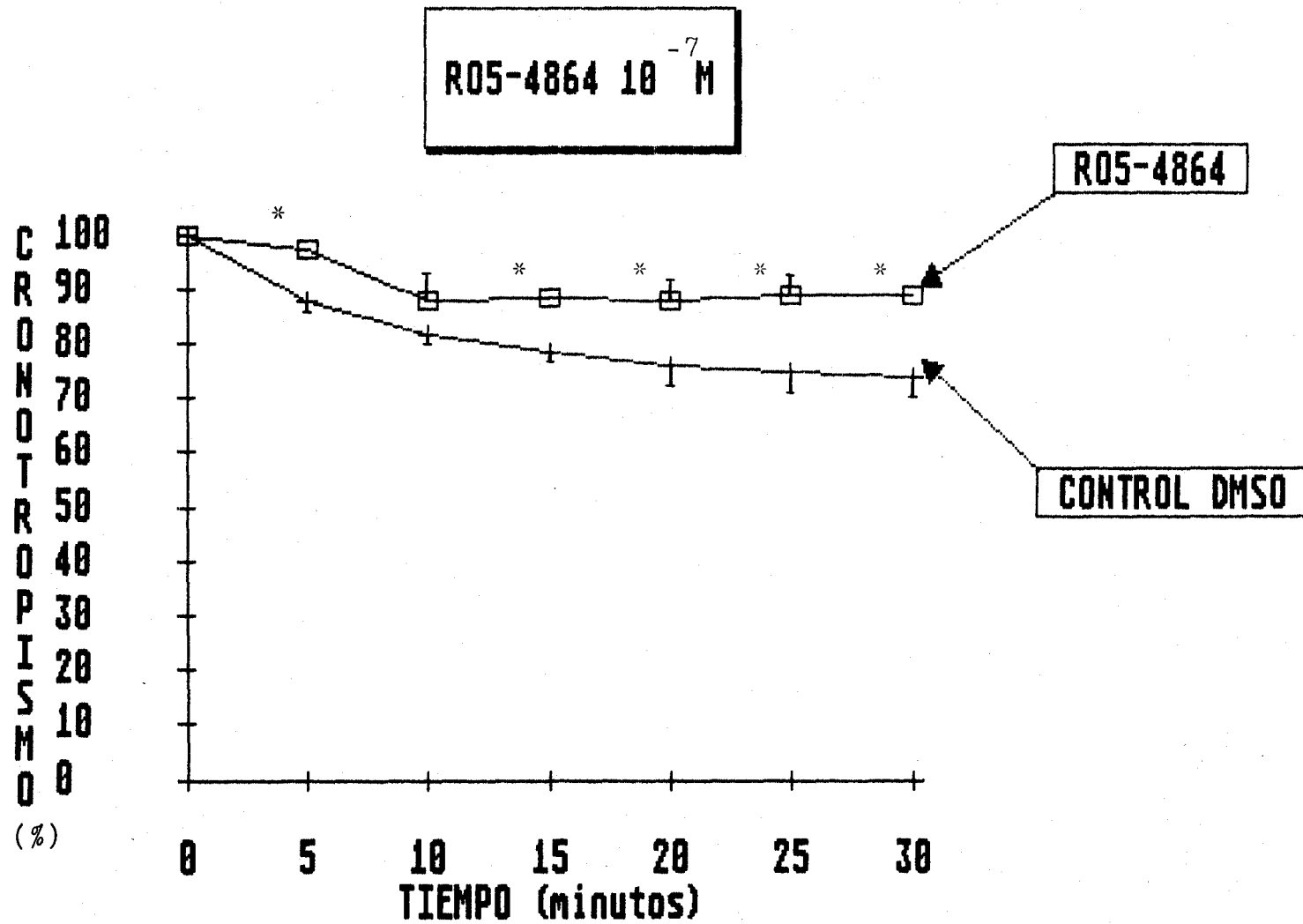


FIGURA 18: Efecto del RO5-4864 10^{-7} M sobre el cronotropismo cardiaco $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.05$)

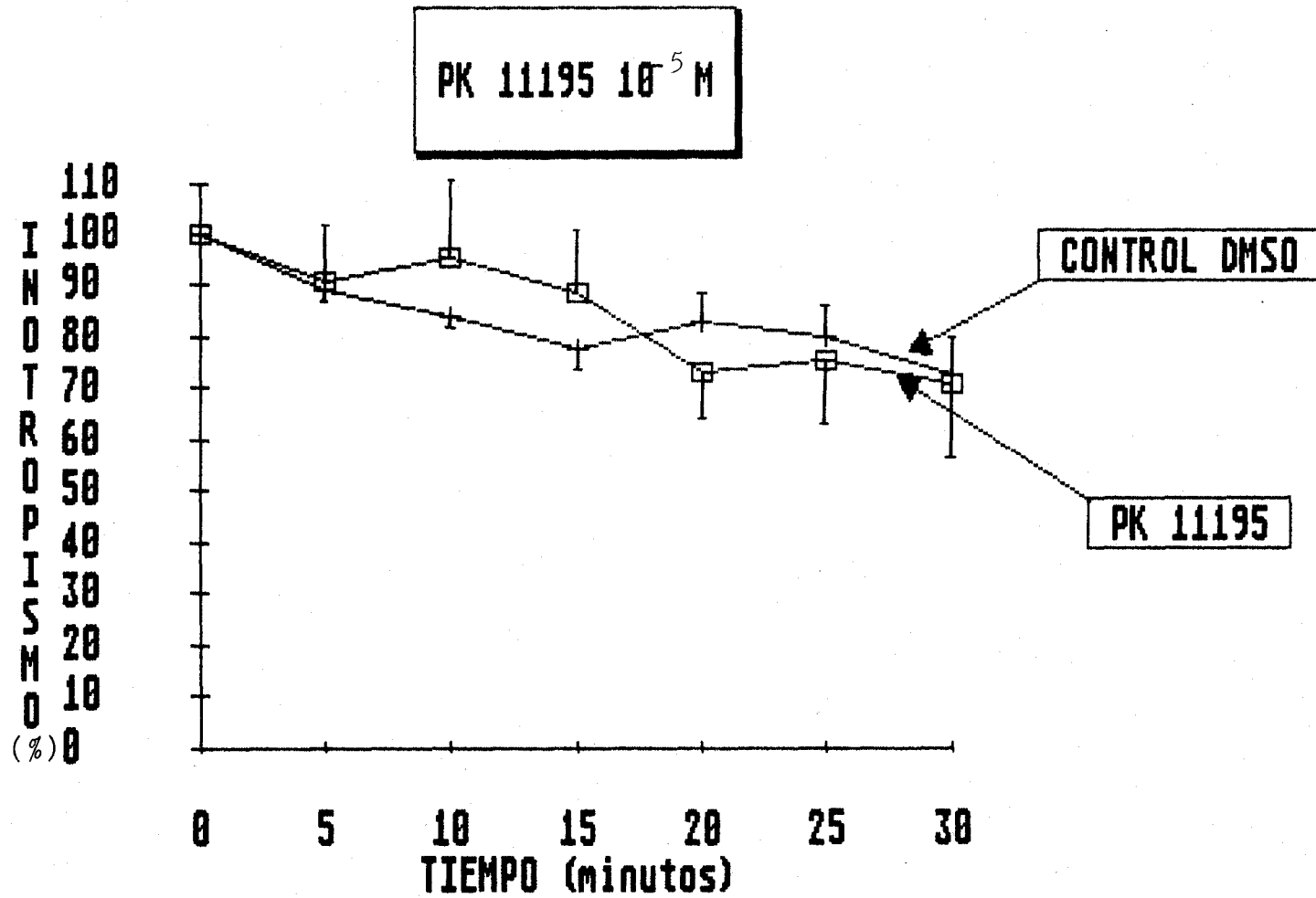


FIGURA 19: Efecto del PK 11195 sobre el inotropismo cardiaco (10^{-5} M), $\bar{X} \pm E.S.M.$

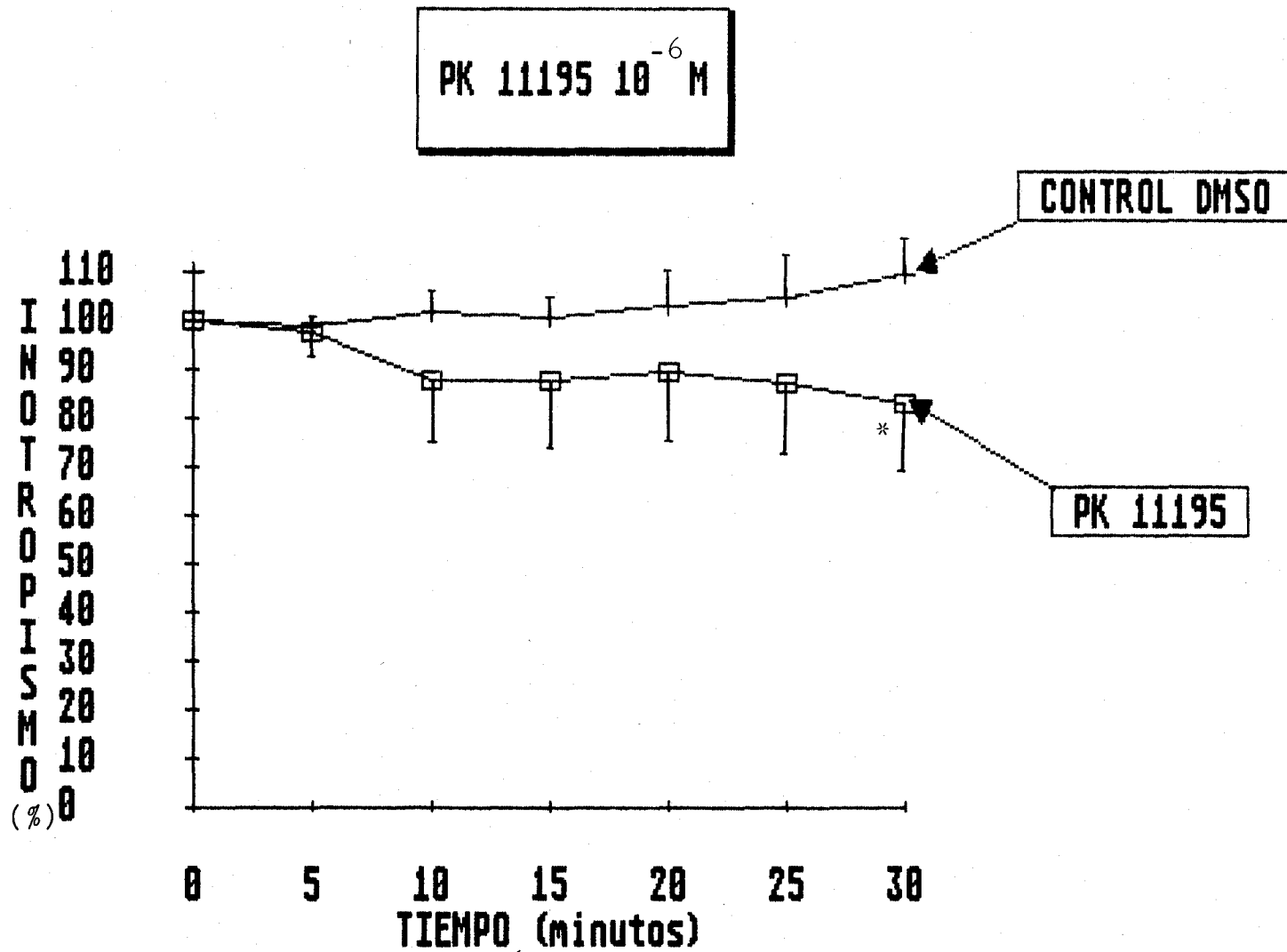


FIGURA 20: Efecto del PK 11195 10^{-6} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.05$)

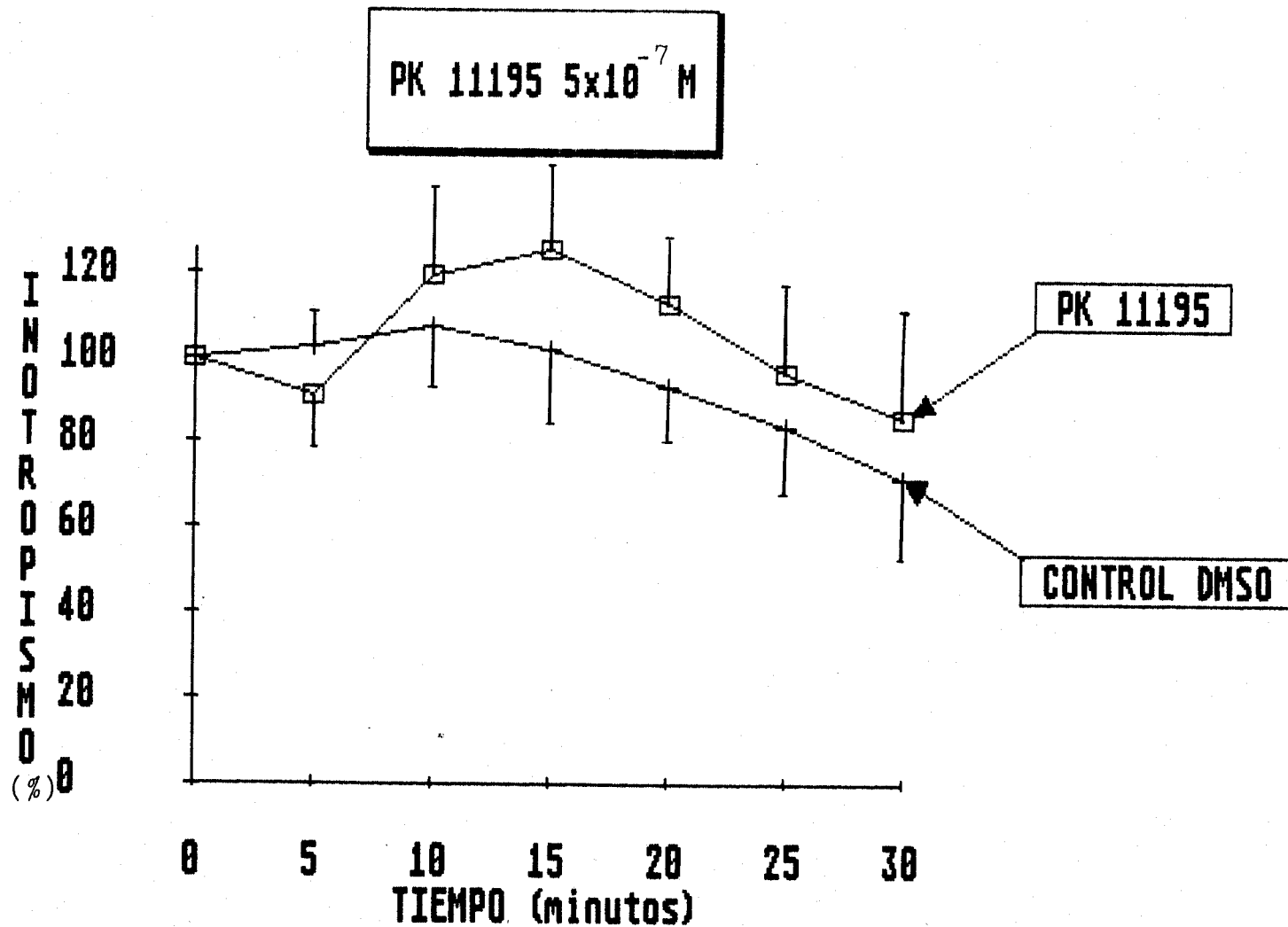


FIGURA 21: Efecto del PK 11195 5×10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

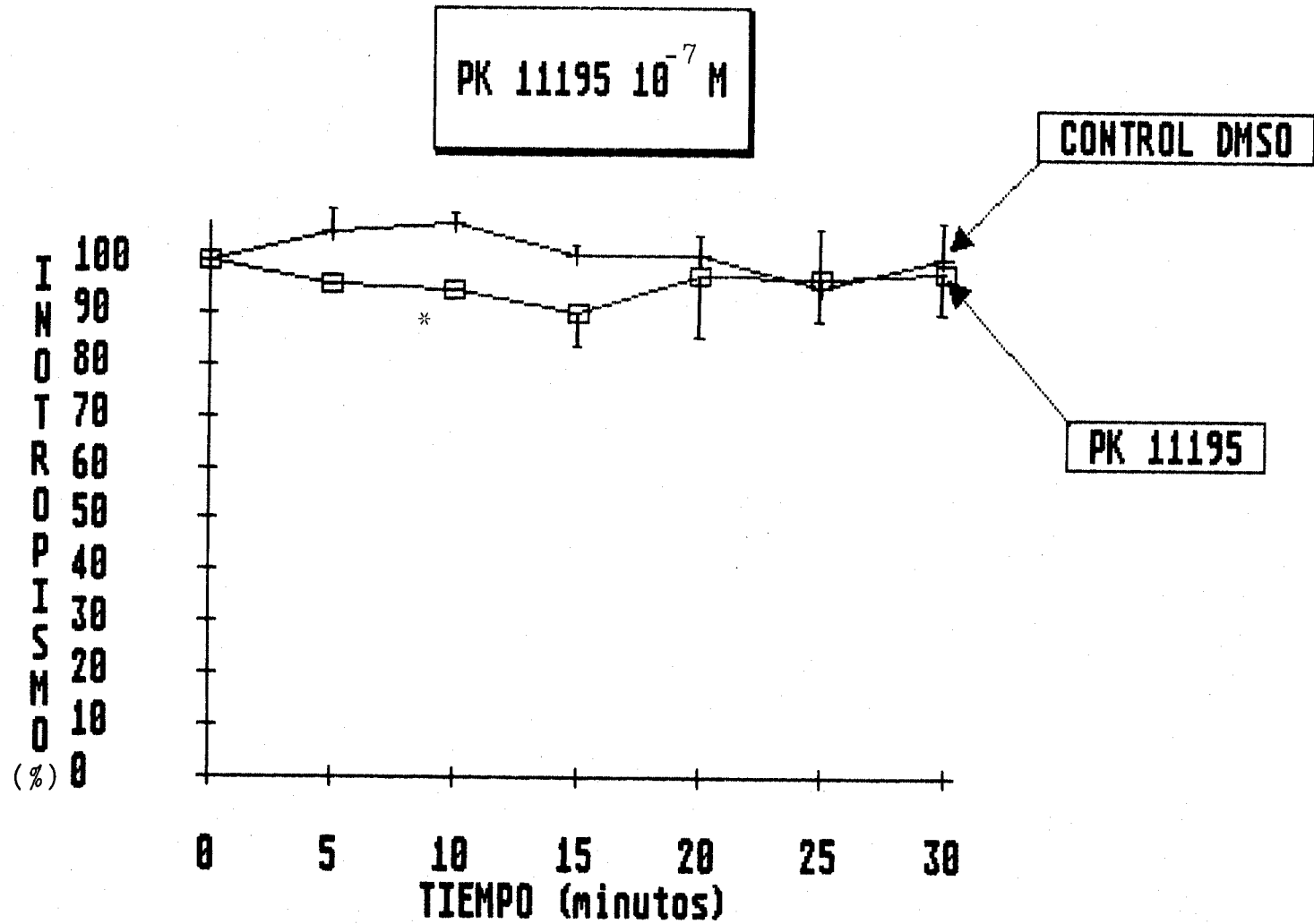


FIGURA 22: Efecto del PK 11195 10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.005$)

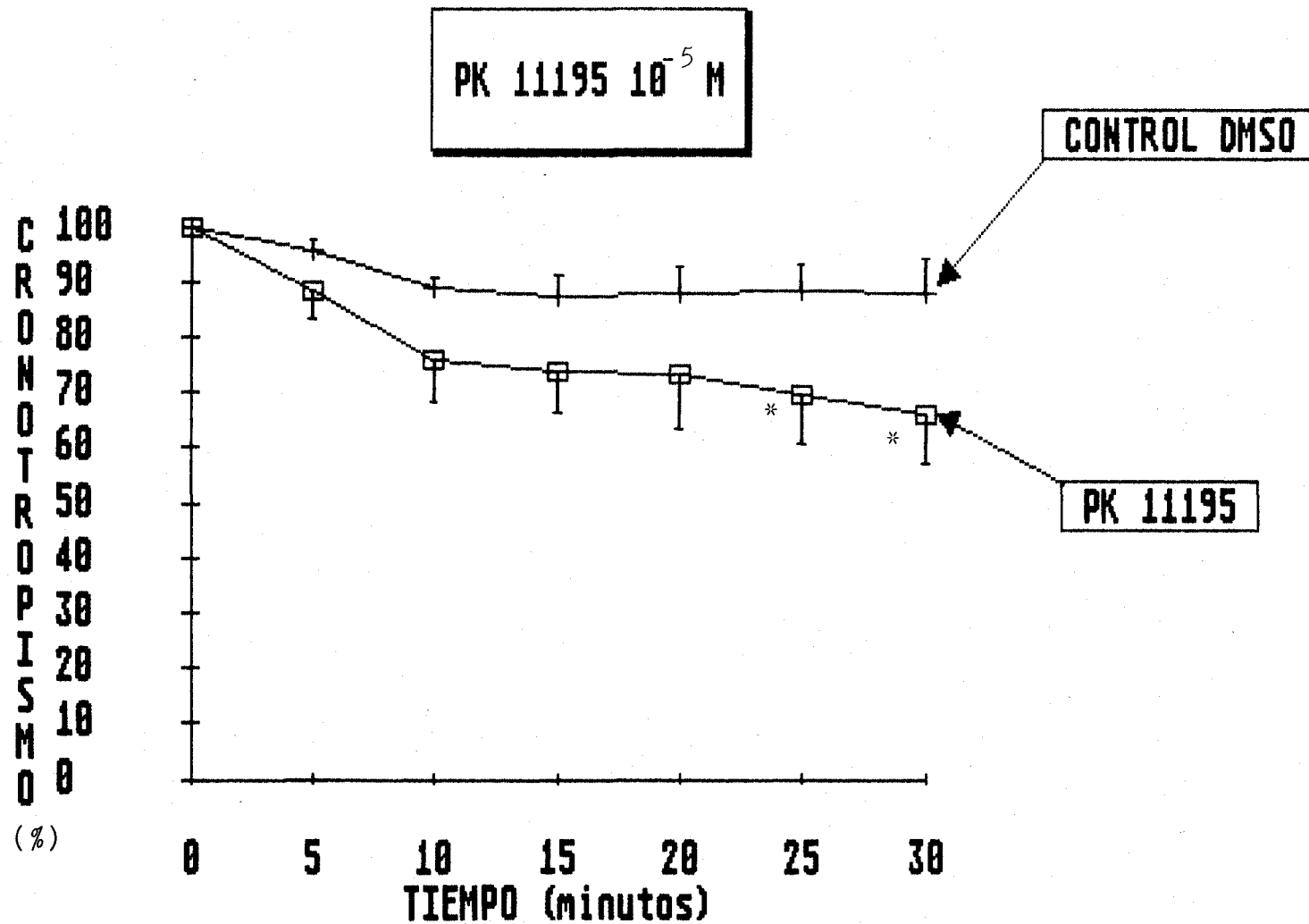


FIGURA 23: Efecto del PK 11195 10^{-5} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.05$)

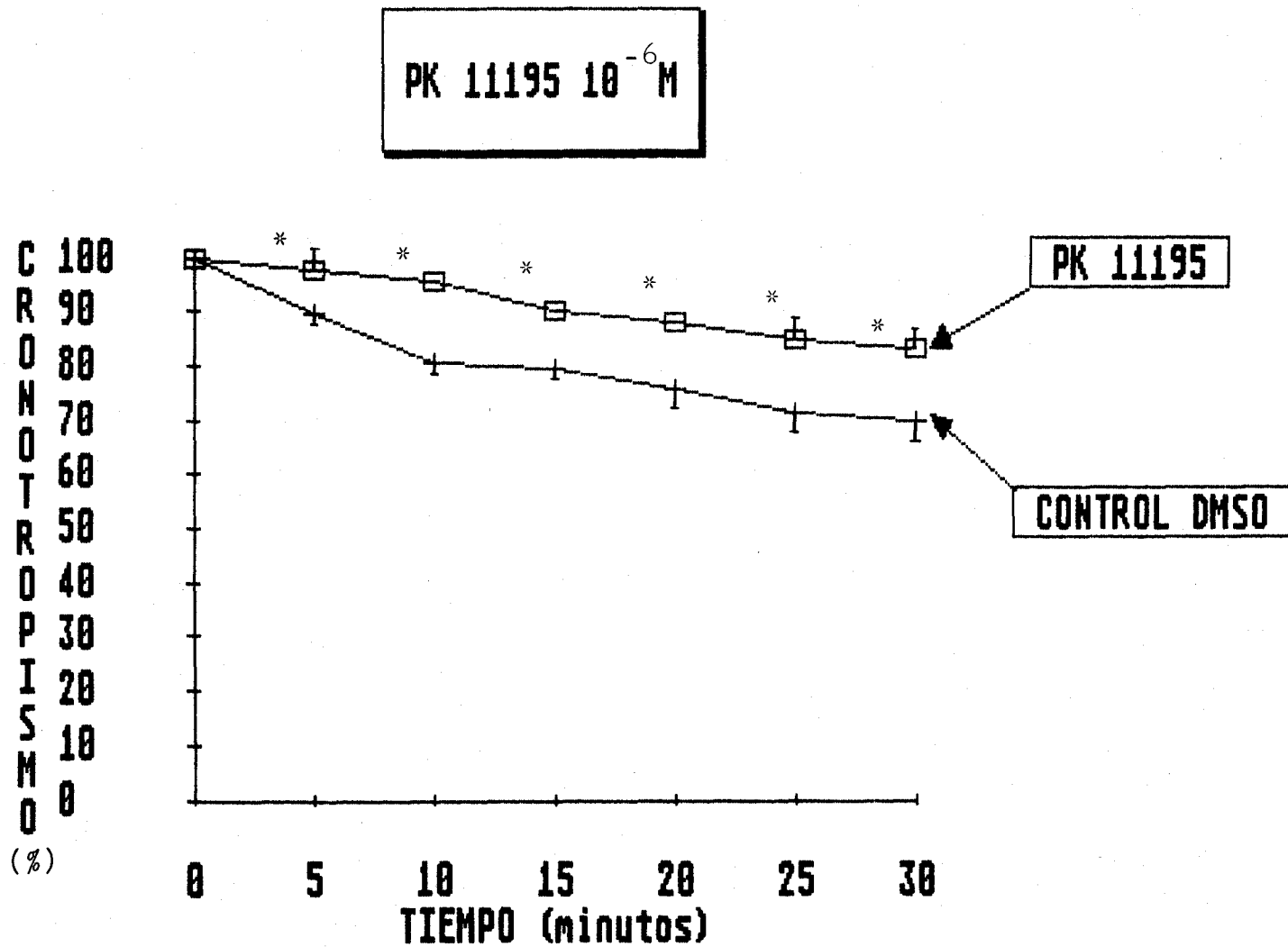
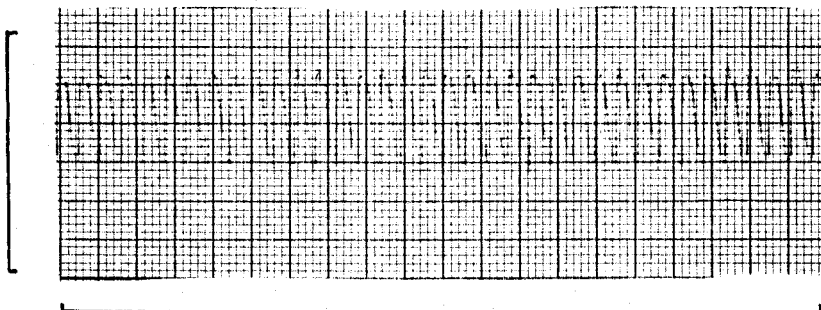


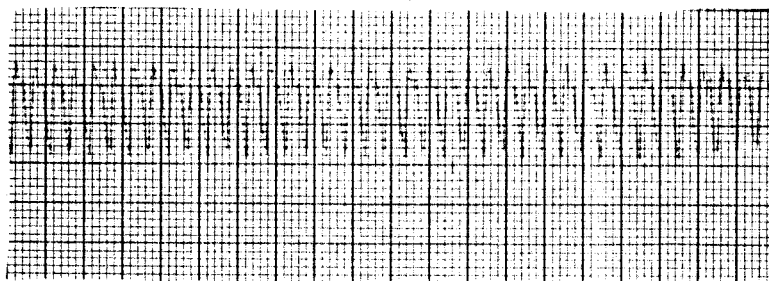
FIGURA 24: Efecto del PK 11195 10^{-6} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ ($p < 0.01$)

1 g.

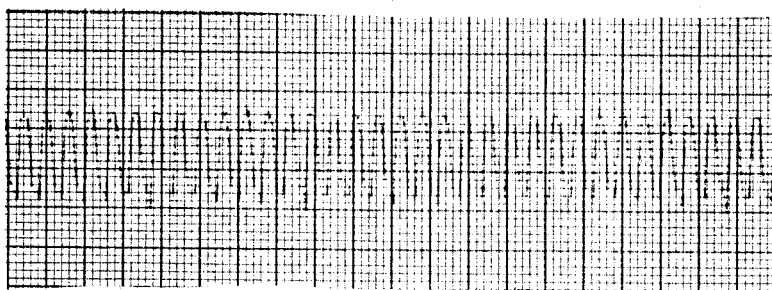


10 seg.

CONTROL

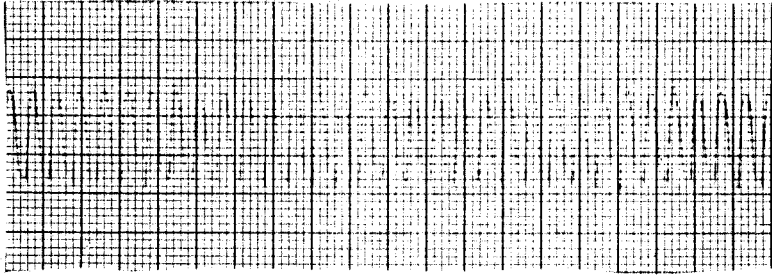


5 MINUTOS (tras fármaco)

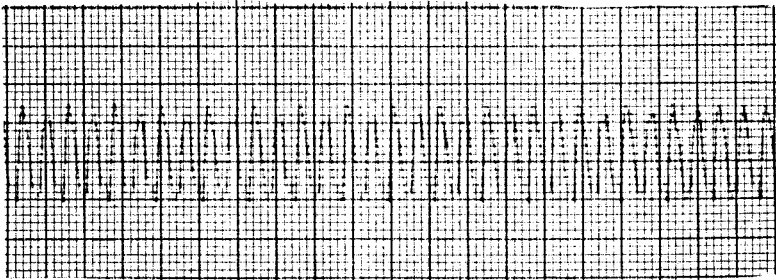


10 MINUTOS (tras fármaco)

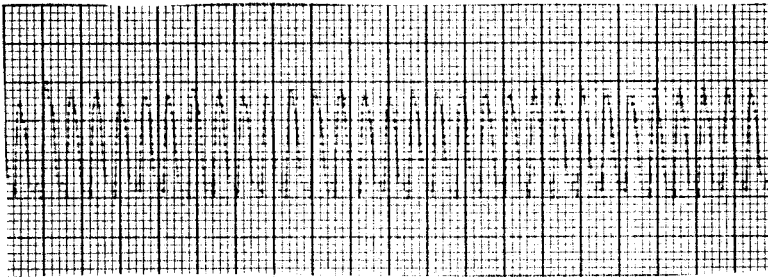
FIGURA 25: Registro experimental del efecto de PK 11195 (10^{-6} M) en corazón aislado de rata.



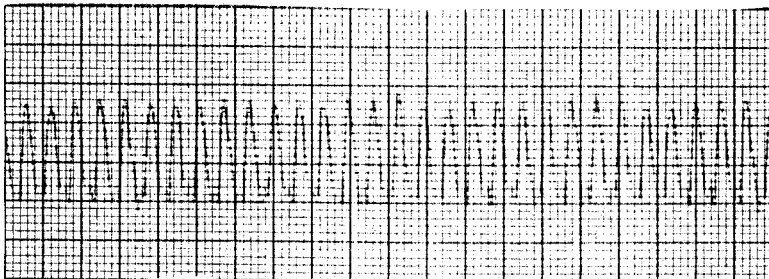
15 MINUTOS (tras fármaco)



20 MINUTOS (tras fármaco)

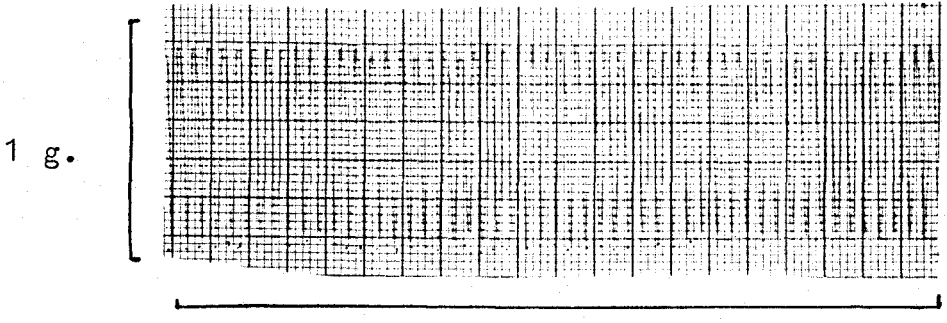


25 MINUTOS (tras fármaco)



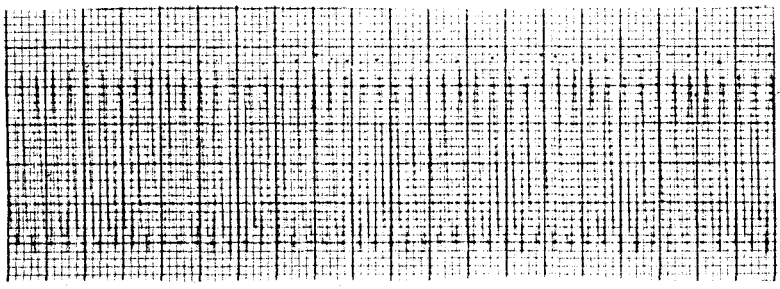
30 MINUTOS (tras fármaco)

FIGURA 25: Continuación.

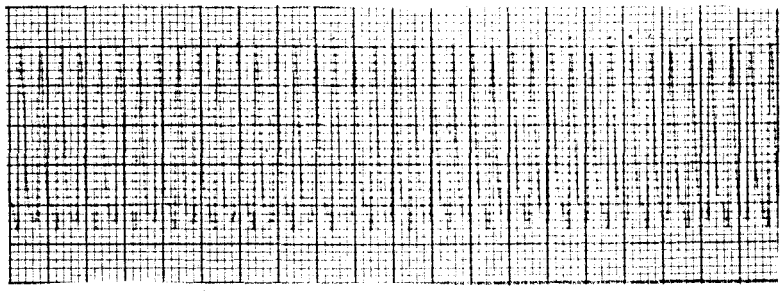


10 seg.

CONTROL

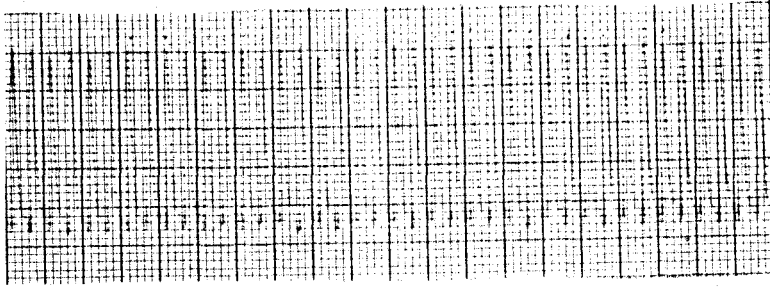


5 MINUTOS (tras fármaco)

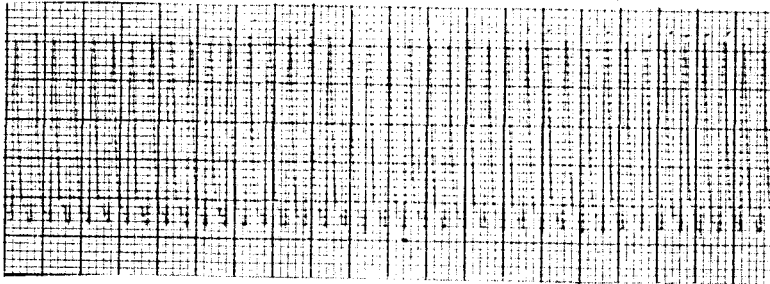


15 MINUTOS (tras fármaco)

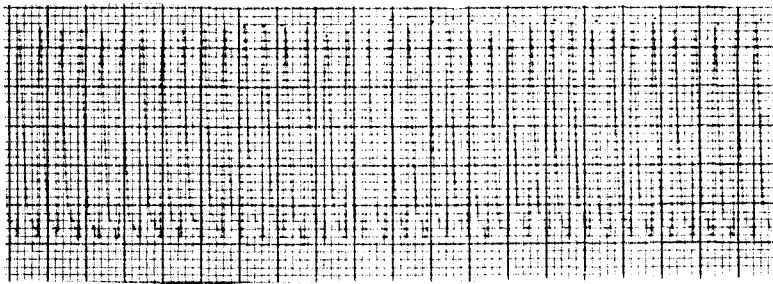
FIGURA 26: Registro experimental del efecto de DMSO (10^{-6} M) en corazón aislado de rata.



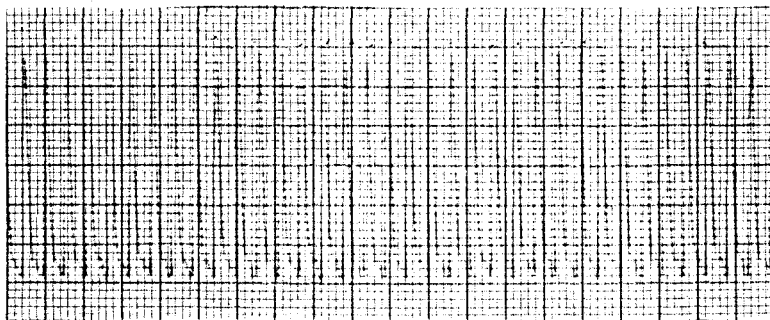
15 MINUTOS (tras fármaco)



20 MINUTOS (tras fármaco)



25 MINUTOS (tras fármaco)



30 MINUTOS (tras fármaco)

FIGURA 26: Continuación.

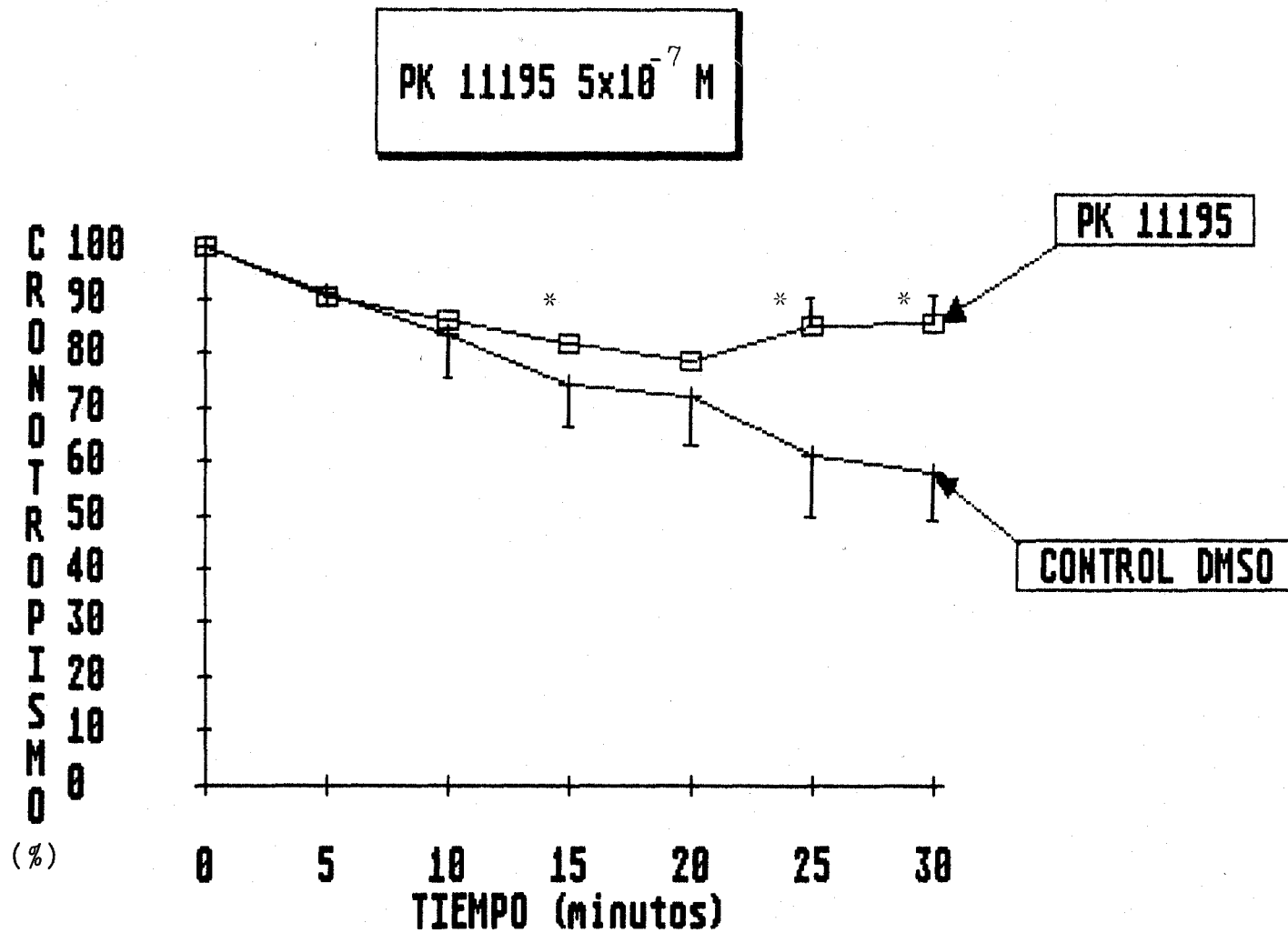


FIGURA 27: Efecto del PK 11195 5×10^{-7} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.005$)

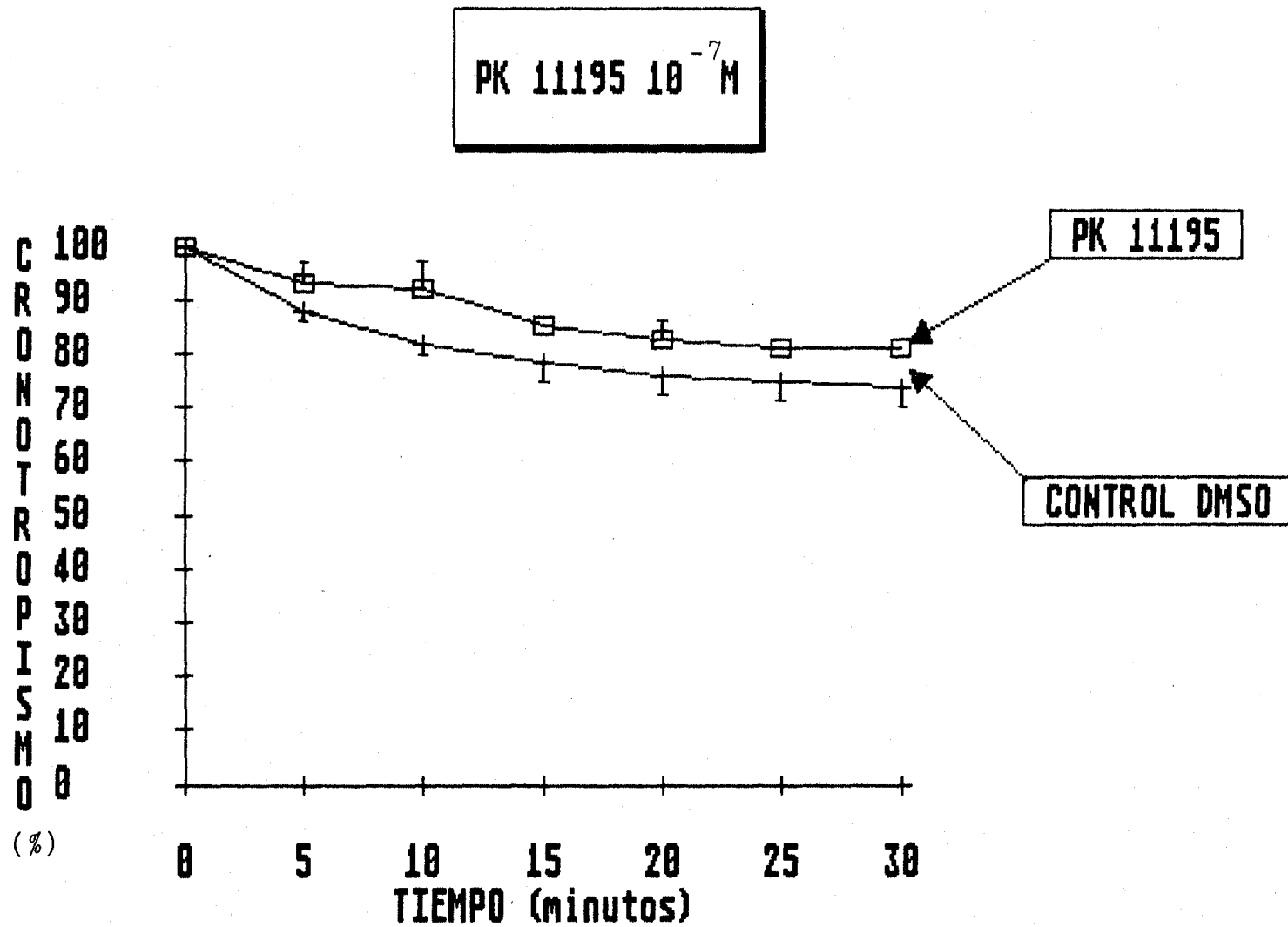


FIGURA 28: Efecto del PK 11195 10^{-7} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

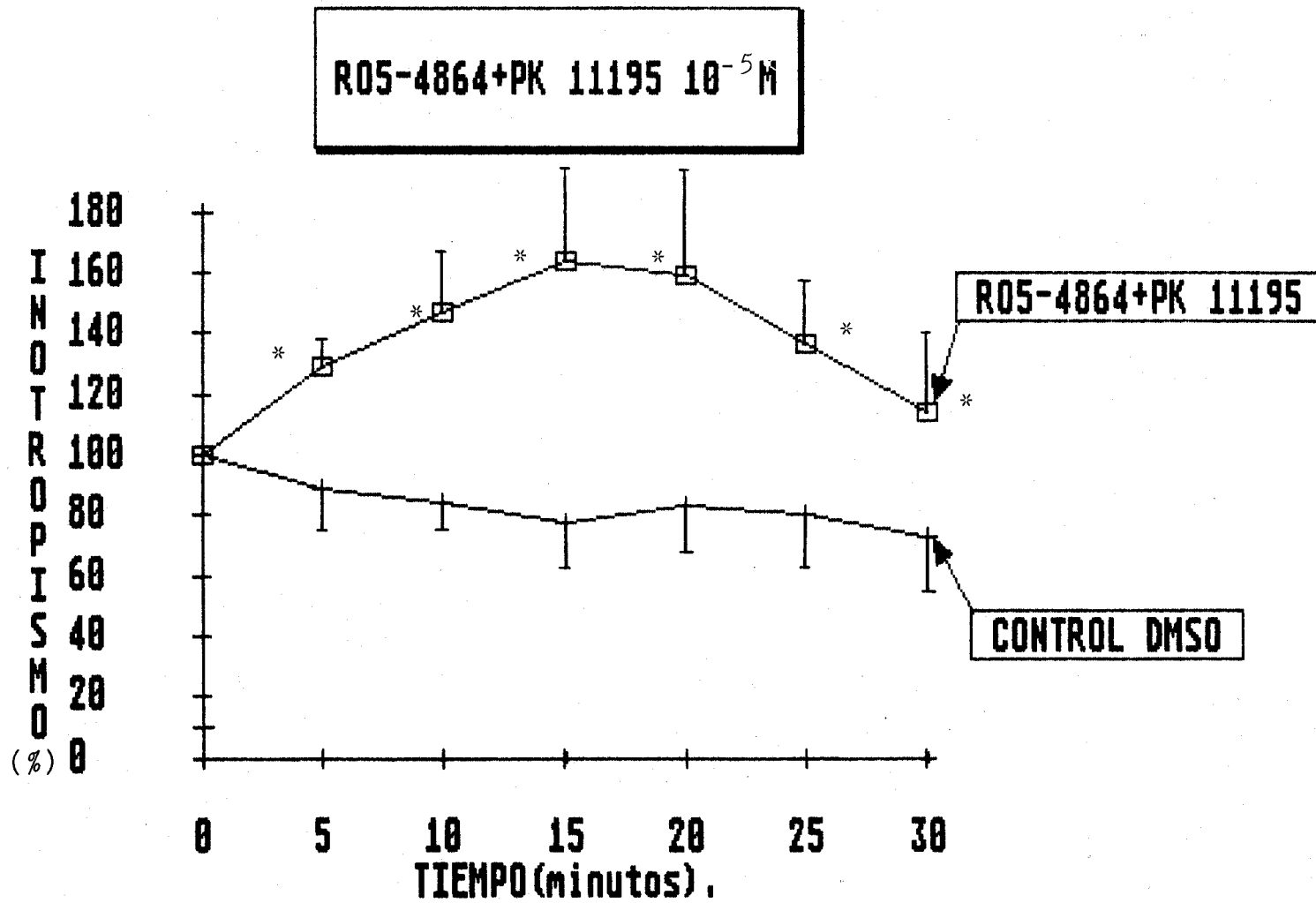
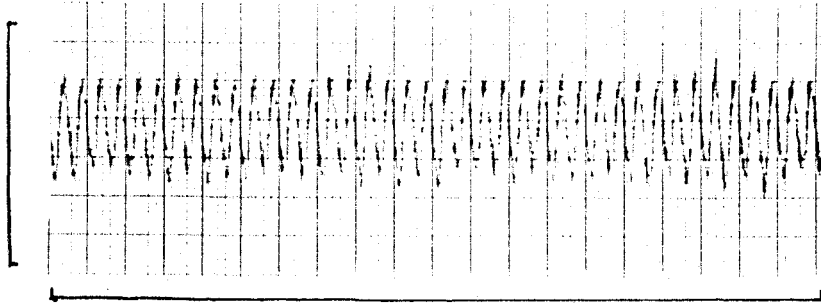


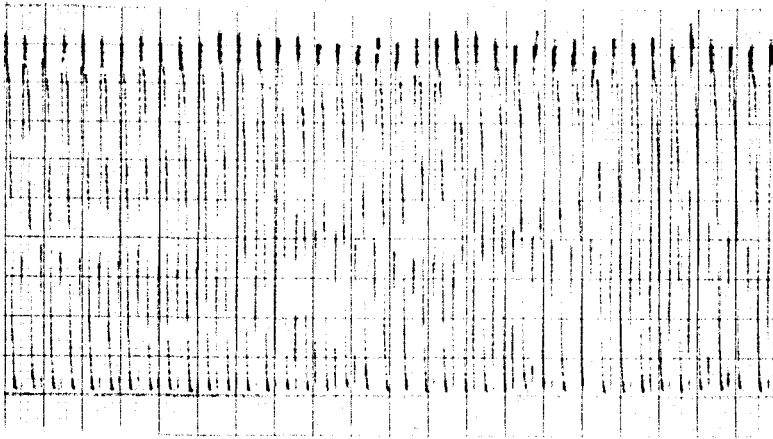
FIGURA 29: Efecto de R05-4864+PK 11195 10^{-5} M sobre el inotropismo cardiaco, \bar{X} +E.S.M. (*= $p < 0.04$)

1 g.

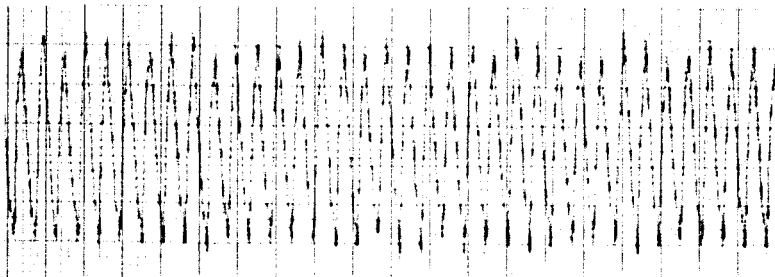


10 seg.

CONTROL

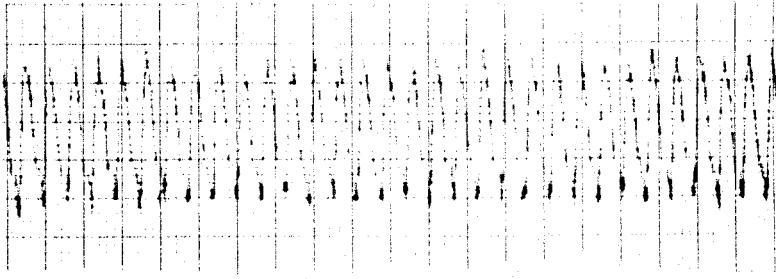


5 MINUTOS (tras fármaco)

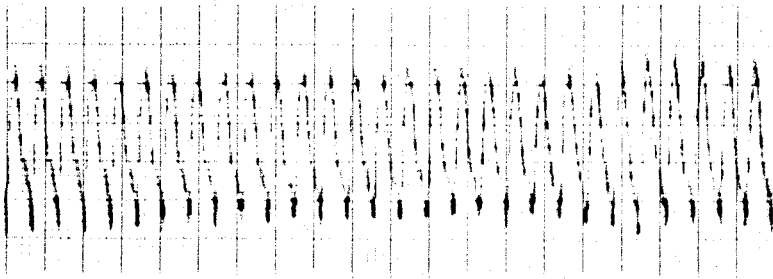


10 MINUTOS (tras fármaco)

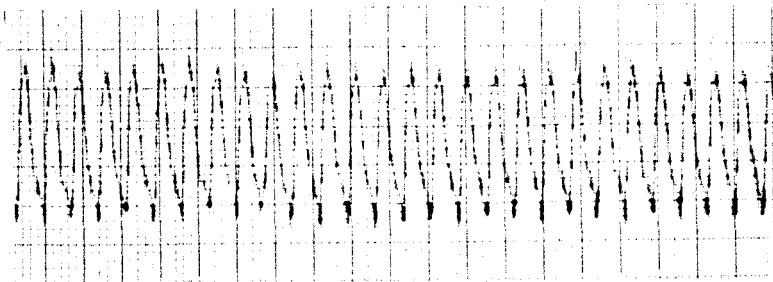
FIGURA 30: Registro experimental del efecto de RO5-4864+PK 11195 (10^{-5} M) en corazón aislado de rata.



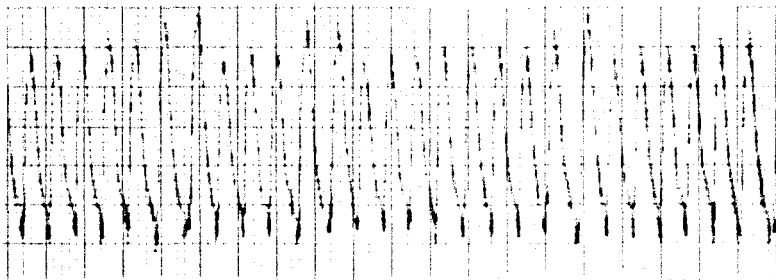
15 MINUTOS (tras fármaco)



20 MINUTOS (tras fármaco)



25 MINUTOS (tras fármaco)



30 MINUTOS (tras fármaco)

FIGURA 30: Continuación.

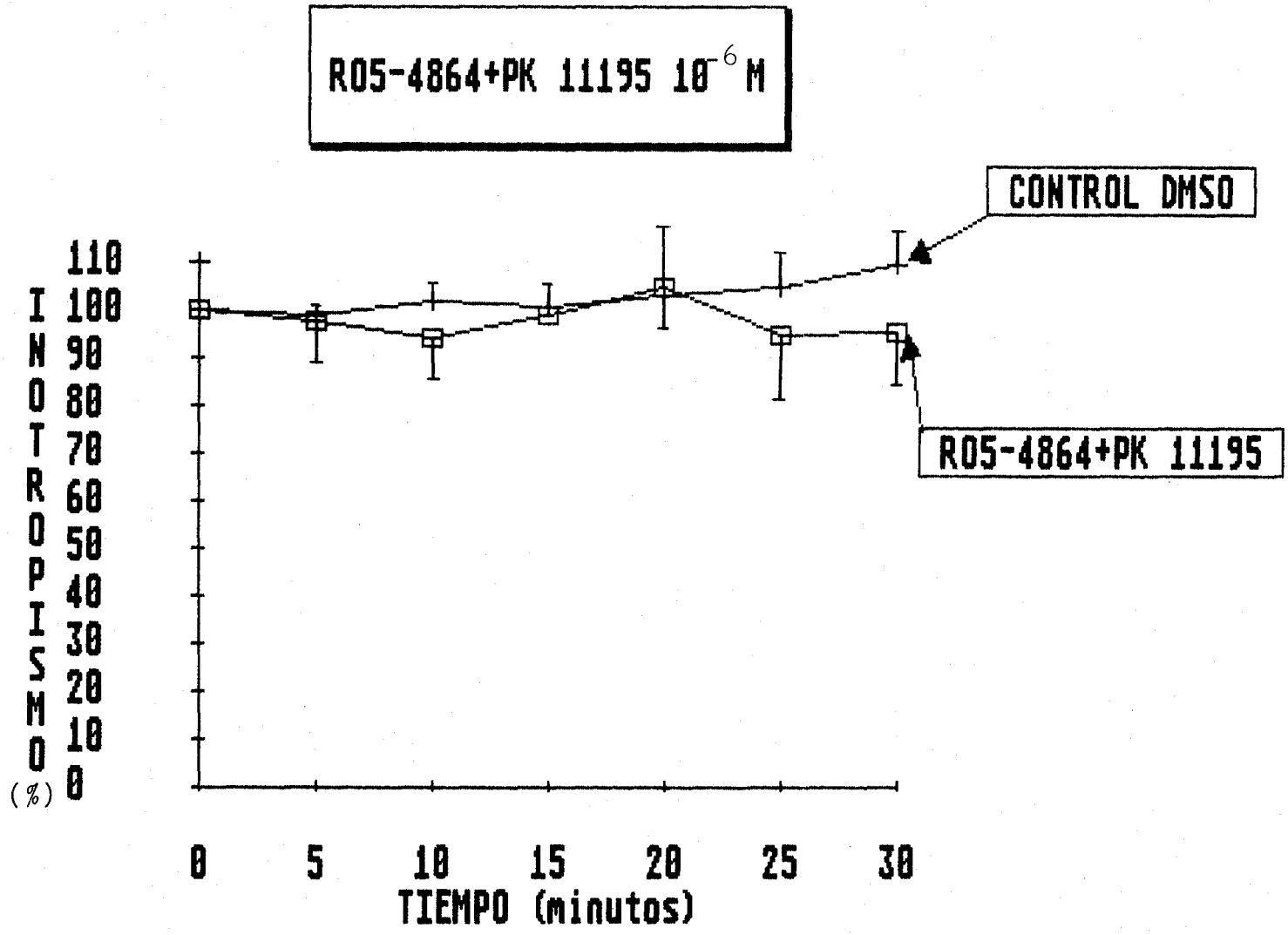


FIGURA 31: Efecto de R05-4864+PK 11195 10^{-6} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

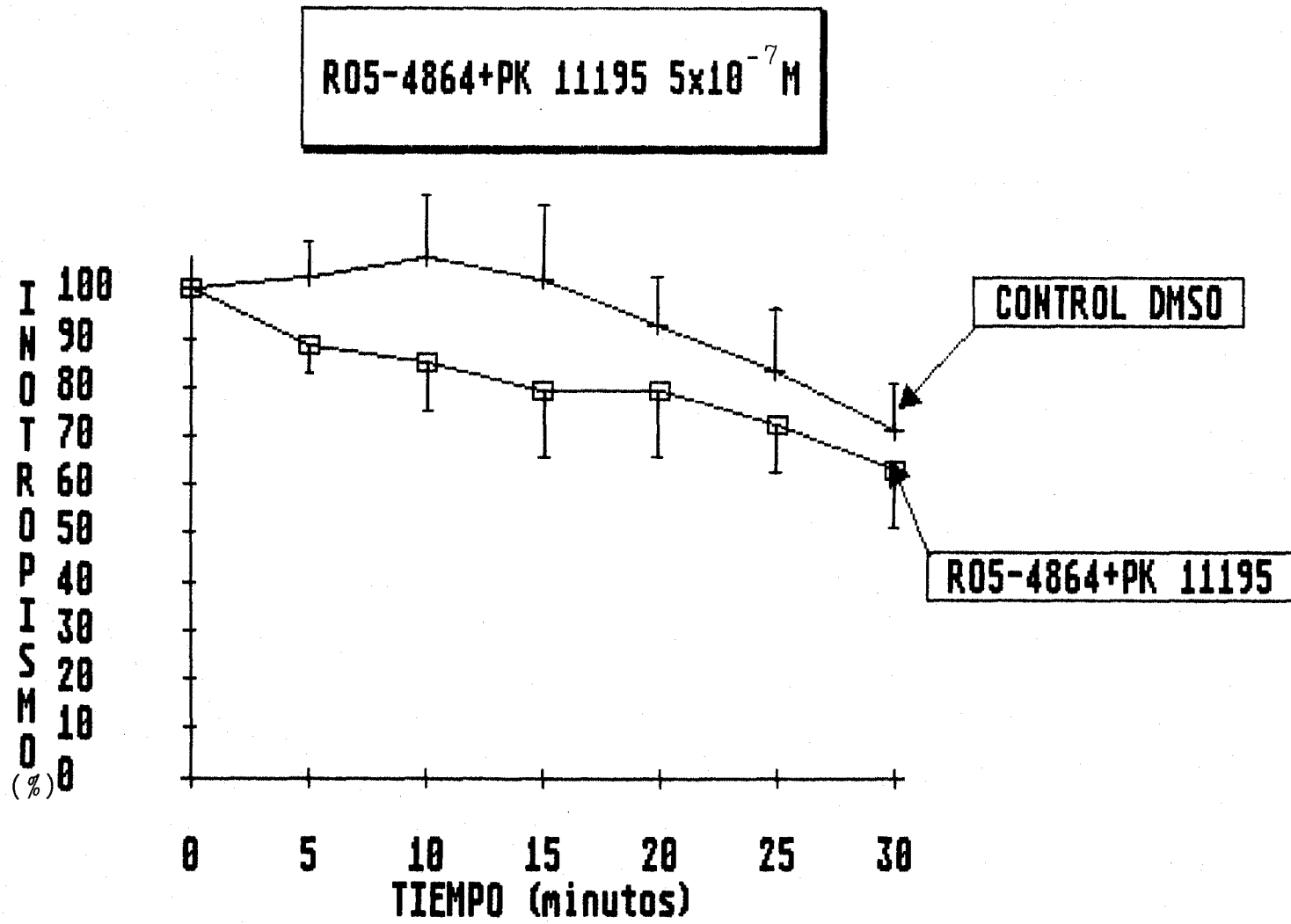


FIGURA 32: Efecto de R05-4864+PK 11195 5×10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$

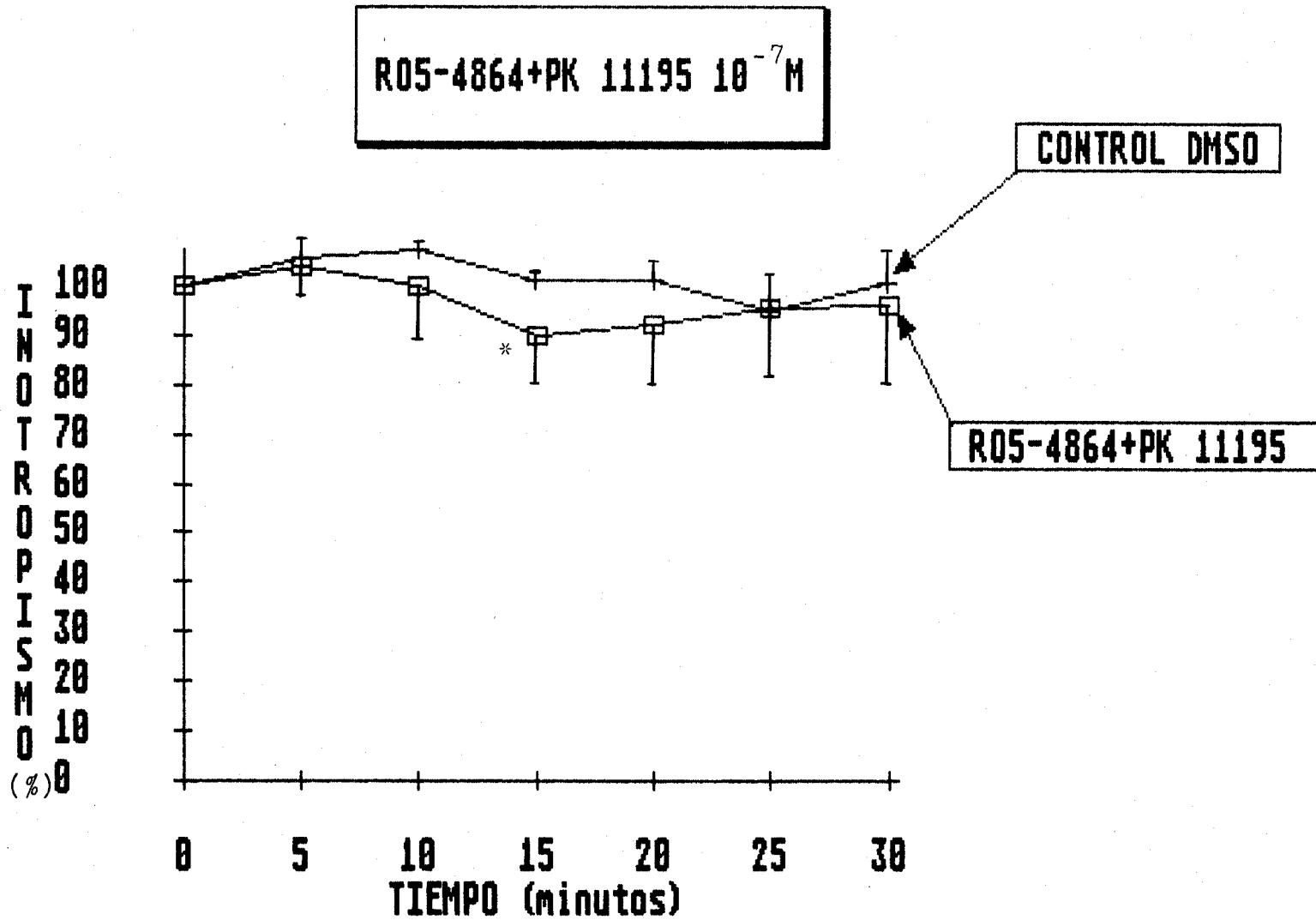


FIGURA 33: Efecto de R05-4864+PK 11195 10^{-7} M sobre el inotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (*= $p < 0.001$)

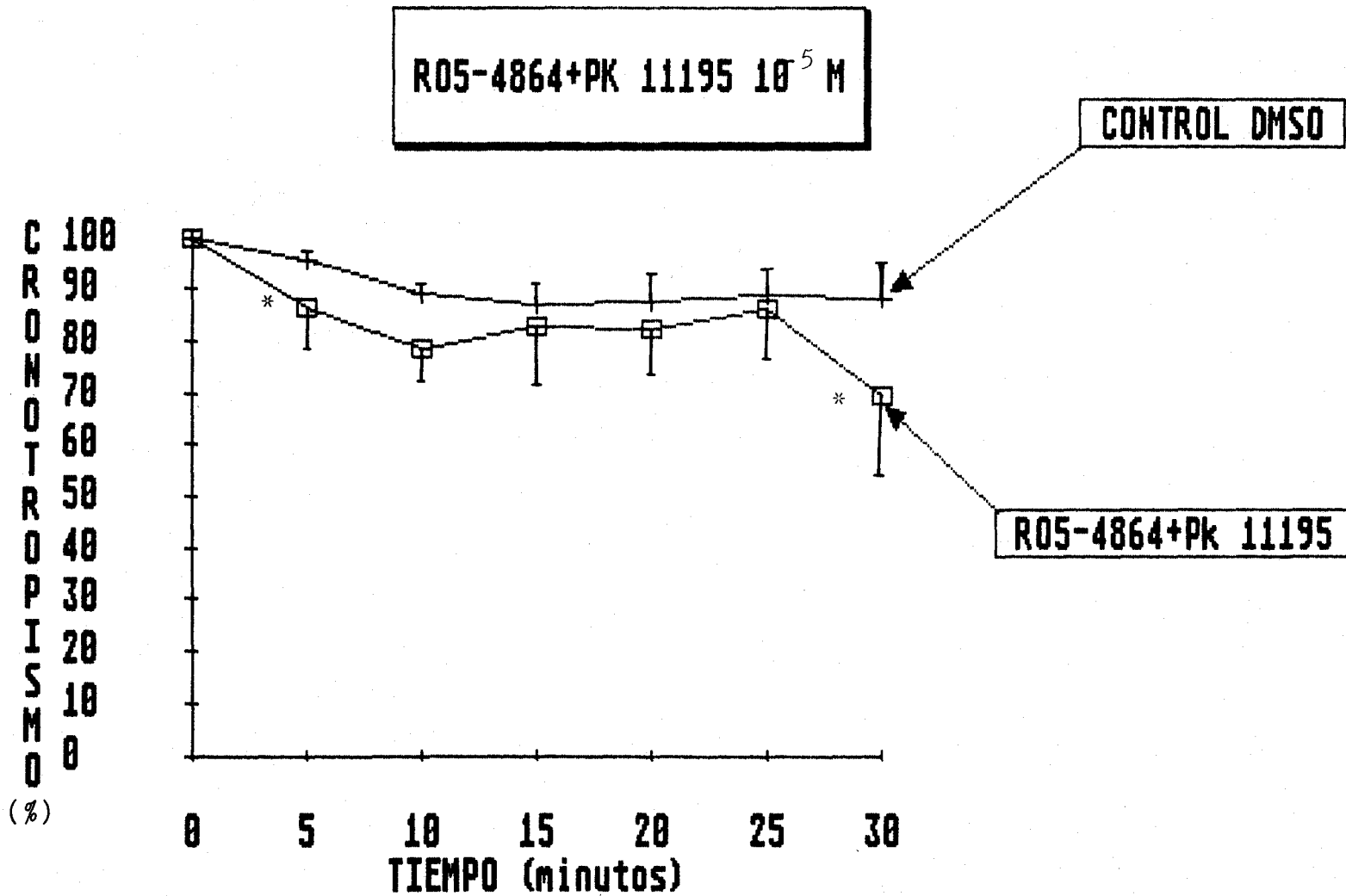


FIGURA 34: Efecto de R05-4864+PK 11195 10^{-5} M sobre el cronotropismo cardiaco, \bar{X} +E.S.M. (*= $p < 0.05$)

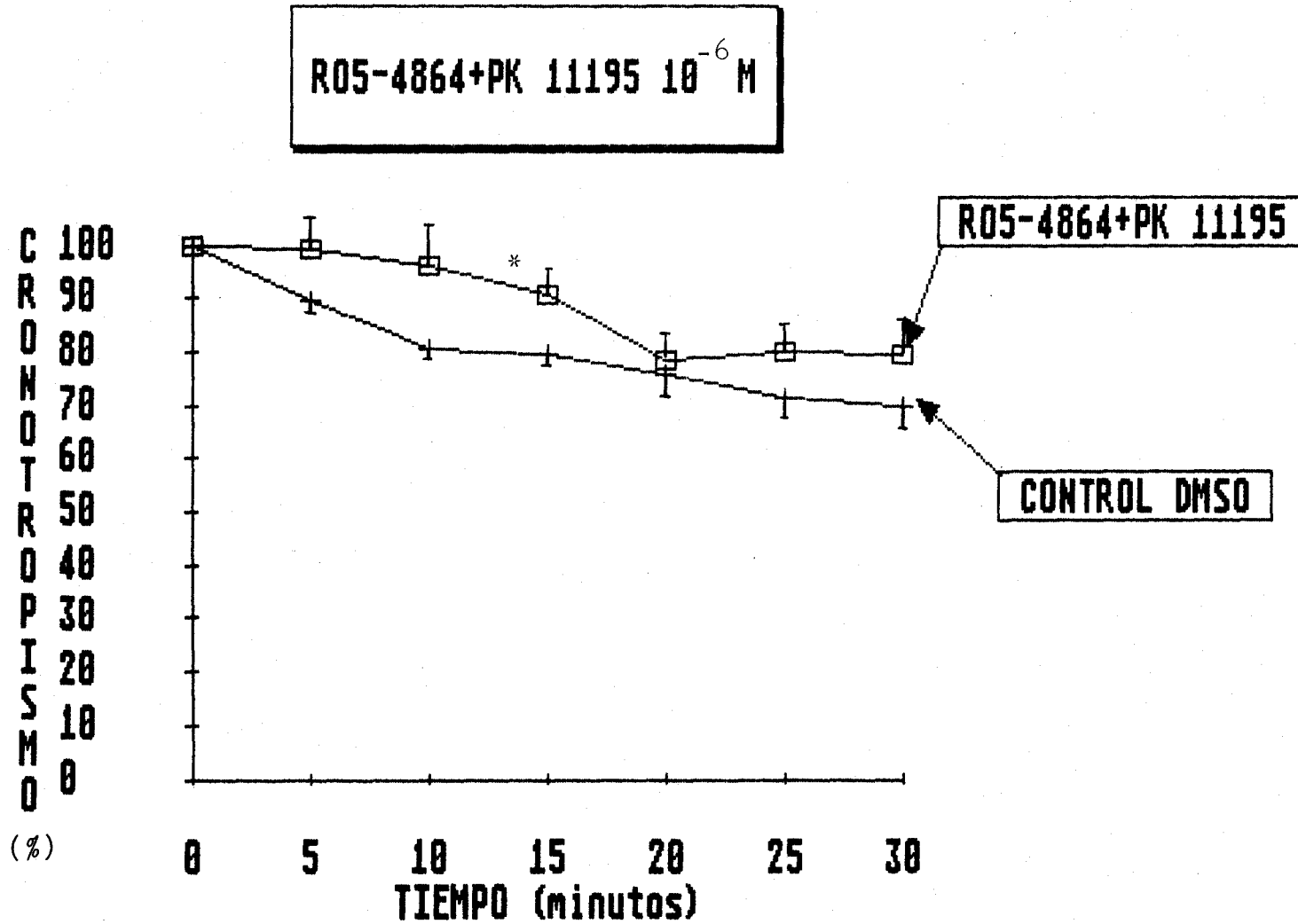


FIGURA 35: Efecto de R05-4864+PK 11195 10^{-6} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$.
 (*= $p < 0.005$)

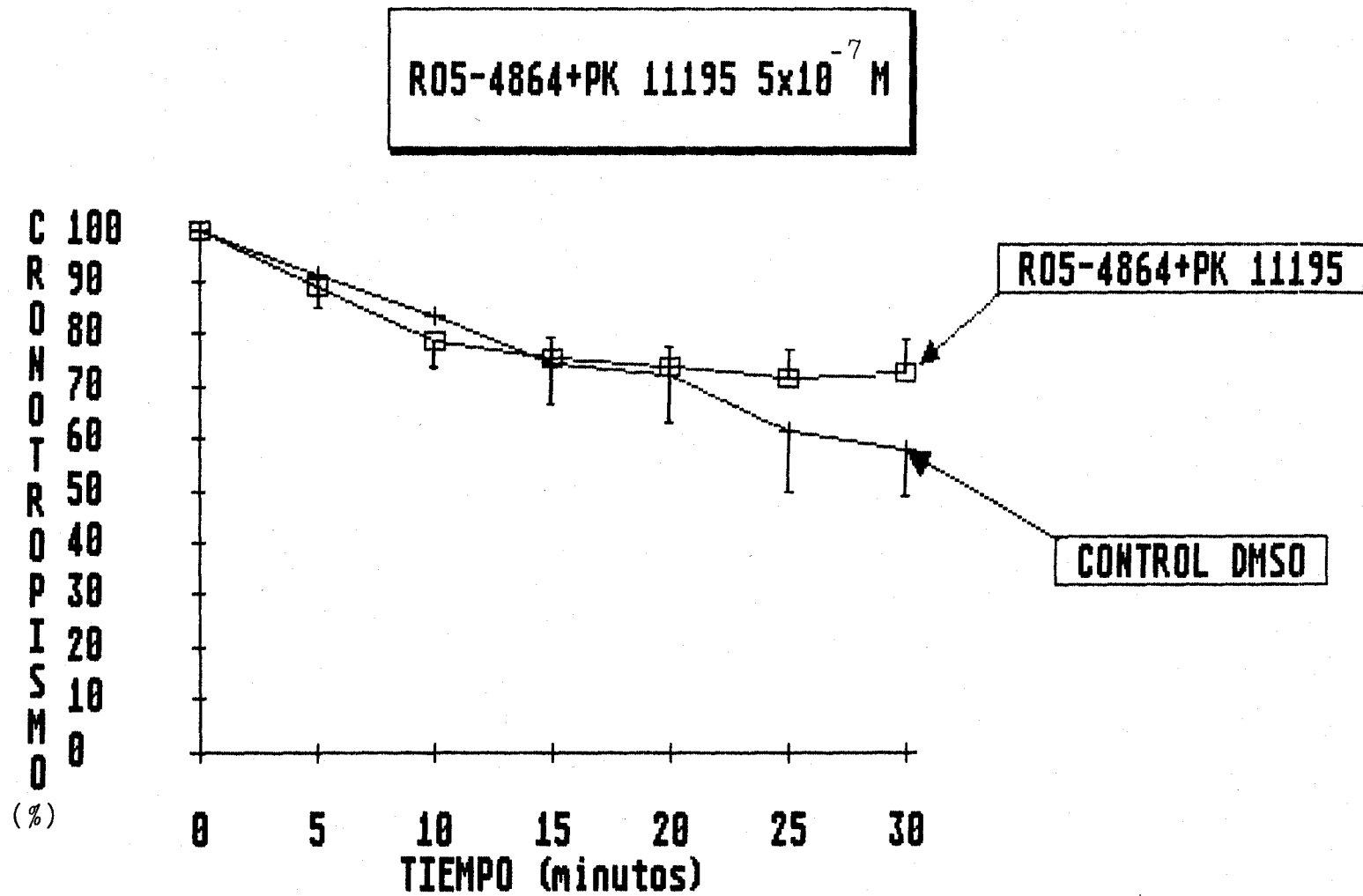


FIGURA 36: Efecto de R05-4864+PK 11195 5×10^{-7} M sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm \text{E.S.M.}$

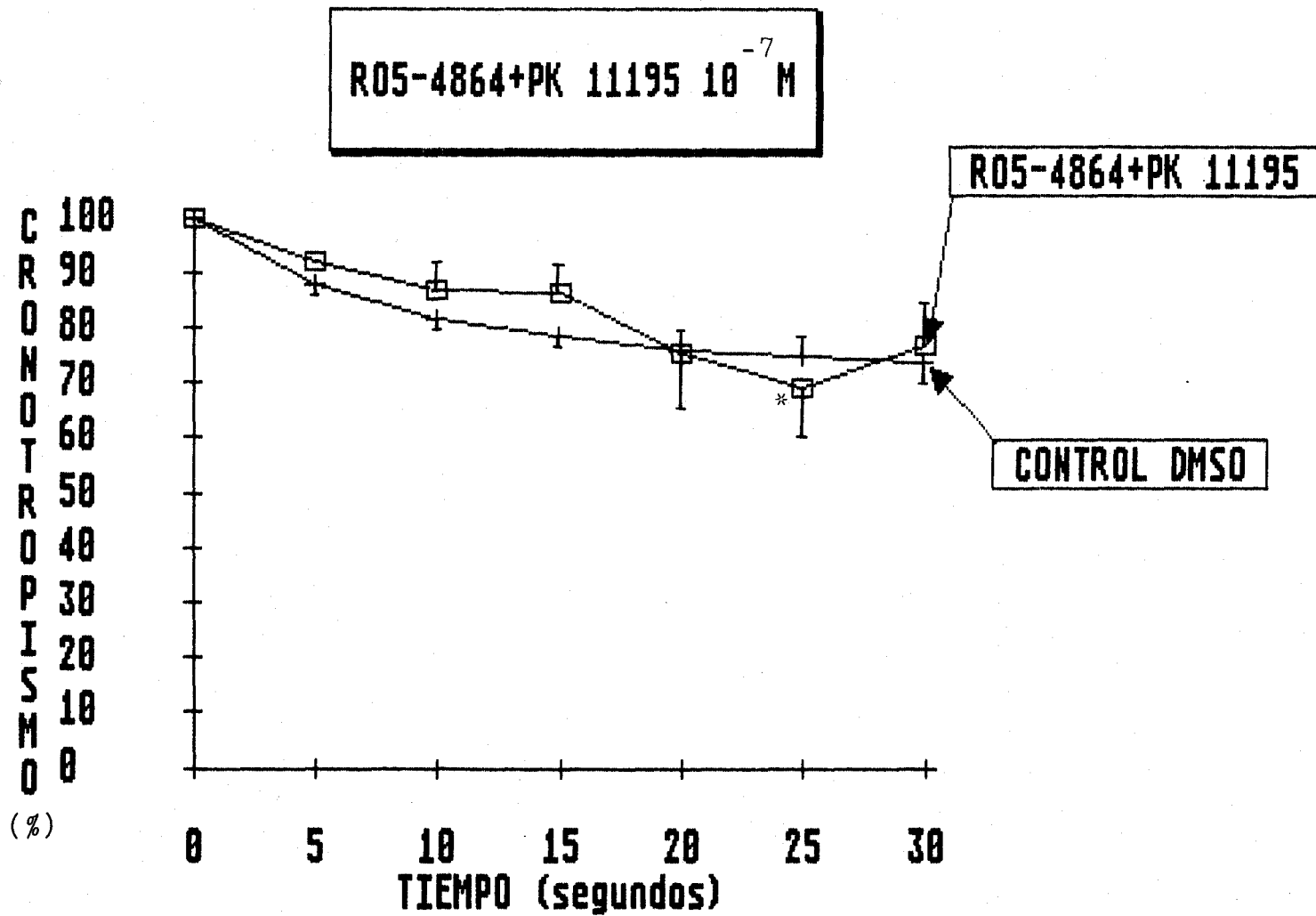
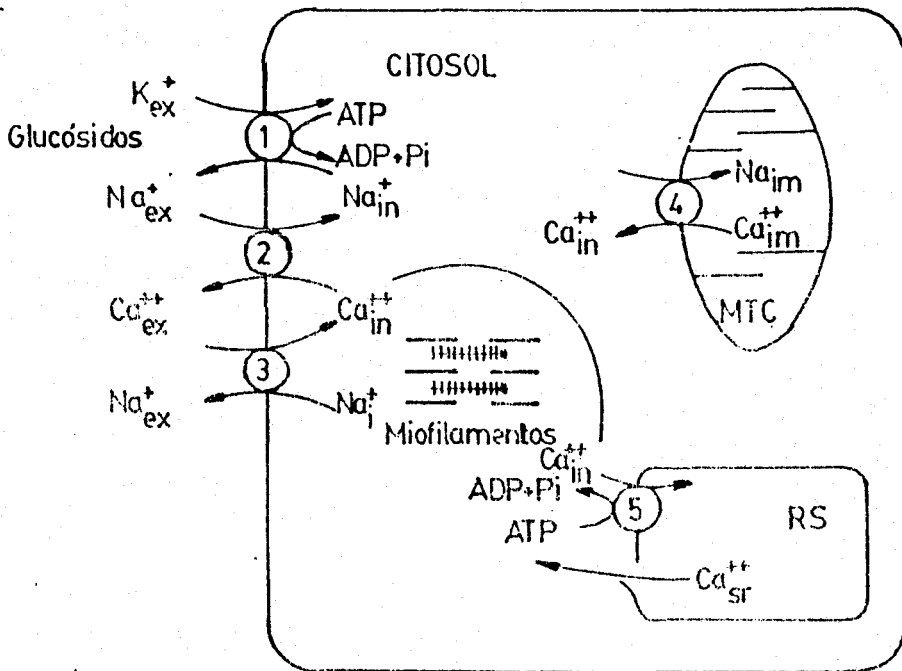


FIGURA 37: Efecto de R05-4864+PK 11195 sobre el cronotropismo cardiaco, $\bar{X} \pm E.S.M.$ (10^{-7} M) ($p < 0.05$)



- 1.- Enzima Na^+, K^+ -ATPasa
- 2.- Bomba de intercambio Ca^{++}/Na^+
- 3.- Bomba de intercambio Na^+/Ca^{++}
- 4.- Bomba de intercambio Na^+/Ca^{++} de la membrana mitocondrial
- 5.- Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico.

FIGURA 38: Esquema de la célula miocárdica con sus bombas de intercambio iónico (tomada de Blaustein y modificada por Encina) (183)



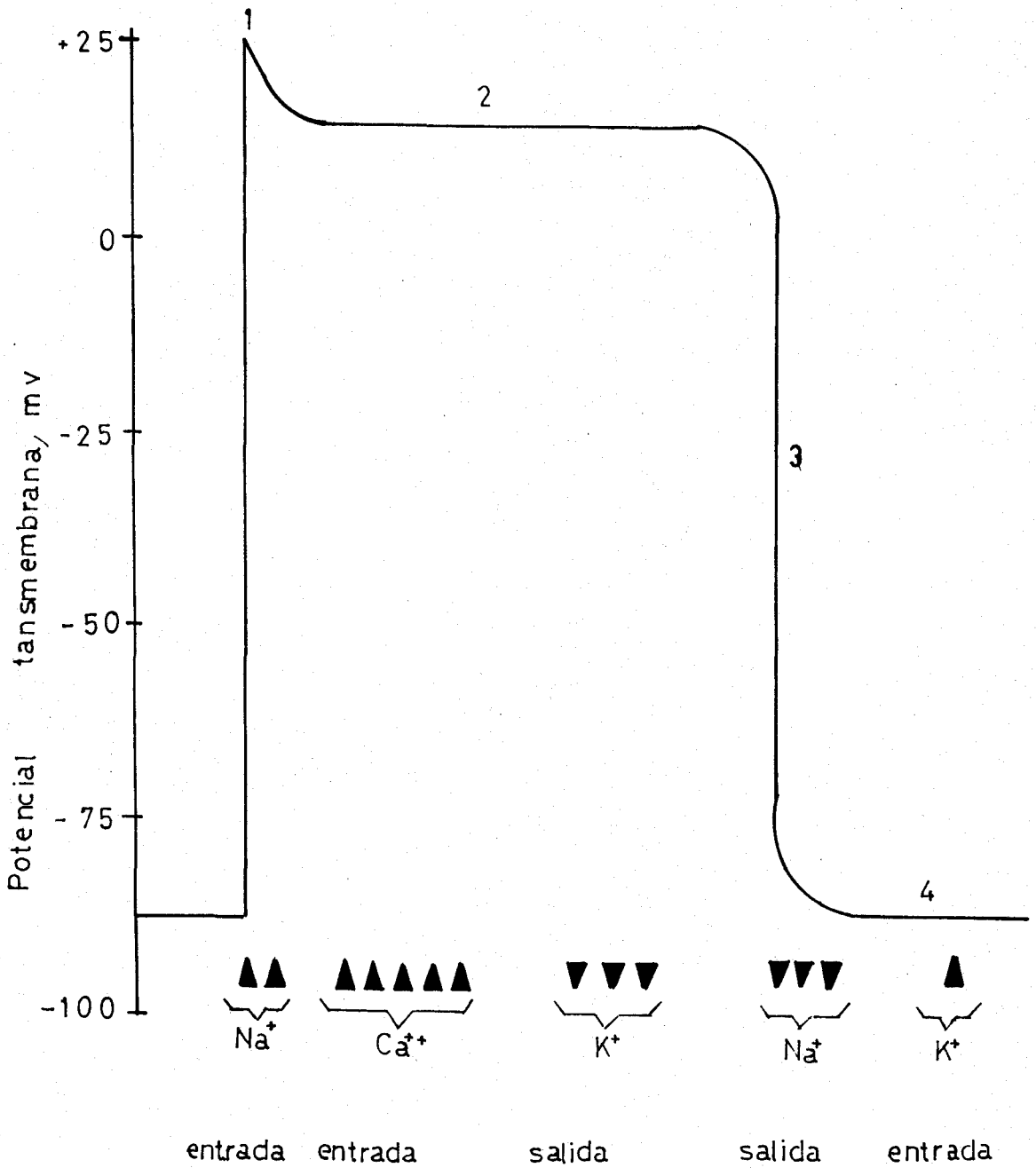
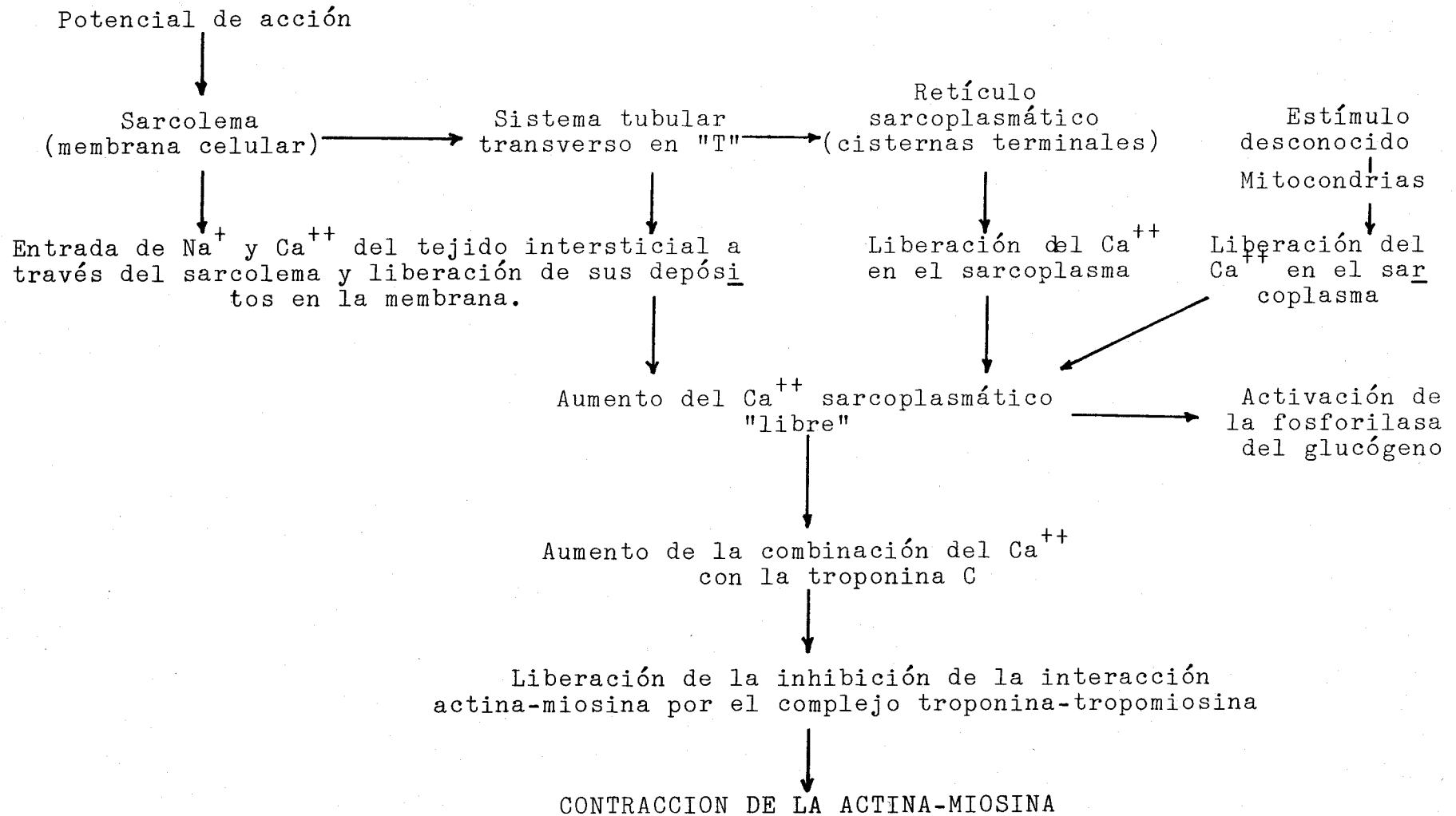


FIGURA 39: Flujos iónicos asociados con el potencial de acción de la célula miocárdica (182).

FIGURA 40: Acoplamiento excitación-contracción (182).



BIBLIOGRAFIA

- 1) COSTA, E. The role of GABA in the action of 1,4-benzodiazepine. Towards Understanding Receptors. 1^a ed. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 1.981.
- 2) GREENBLATT, D.S.; SHADER, R.I. Benzodiazepines in clinical practice. 1^a ed. Raven Press. Nueva York, 1.974.
- 3) GOODMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. The Pharmacological basis of Therapeutics. 7^a Ed. Macmill and Pub. Co, Nueva York, 1.985.
- 4) MEYERS, F.H.; JAWETZ, E.; GOLDFIELD, A. Manual de Farmacología Clínica. 4^a ed. El Manual Moderno, Méjico D.F., 1.978.
- 5) GUIDOTTI, A. Mecanismos sinápticos en la acción de las benzodiazepinas. En Psicofarmacología a los 30 años de progreso. 1^a ed. Editorial Espaxs, Barcelona, 1.982.
- 6) FLOREZ, J.; ARMIJO, J.A.; MEDIAVILLA, A. Compendio de Farmacología Humana. 2^a ed., Ed. Eunsa, Pamplona, 1.980.
- 7) HAIGH, J.R.M.; FEELY, M.; GENT, J.P. Tolerance to the anticonvulsant effect of clonazepam in mice: no concurrent change in plasma concentration. J. Pharm. Pharmacol. 38: 931-934, 1.986.
- 8) ANHOLT, R.R.H. Mitochondrial benzodiazepine receptors as potential modulators of intermediary metabolism. TIPS. 7: 506-511, 1.986.
- 9) FILE, S.E. Pro -and anti- convulsant properties of PK 11195, a ligand for benzodiazepine binding sites Br. J. Pharmacol. 83: 471-476, 1.984.
- 10) MOHLER, H.; RICHARDS, J.G. Autoradiographic visualization

and pharmacological characterization of (^3H)-RO5-4864 binding in the SNC. Br. J. Pharmacol. 79: 280, 1.983.

11) FILE, S.E.; MABBUTT, P.S. Behavioural effects of RO5-4864, a ligand for the micromolar benzodiazepine receptor Br. J. Pharmacol. 78: 76, 1.983.

12) SCHOEMAKER, H.; BOLES, R.G.; HORST, W.D.; YAMAMURA, H.I. Specific high-affinity binding sites for (^3H)-RO5-4864 in rat brain and kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther. 225: 61-69, 1.983.

13) ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. Identification and characterization of a novel benzodiazepine binding site in heart, skeletal muscle and ileal muscle using the ligand (^3H) RO5-4864. Clin. Res. 30: 18P, 1.982.

14) LE FUR, G.; VAUCHER, N.; PERRIER, M.L.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; UZAN, A. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, (^3H) RO5-4864 and (^3H) PK 11195 by thermodynamic studies. Life Sci. 33: 449-457, 1.983.

15) BRAESTRUP, C.; ALBRECHTSEN, R.; SQUIRES, R.F. High density of benzodiazepine receptors in human cortical areas. Nature 269: 702-704, 1.977.

16) CASTILLO-FERRANDO, J.R.; RUEDA, T.; SERRANO, J.S.; PEREZ-OJEDA, E. Papel de los receptores benzodiazepínicos en el inotropismo cardiaco. Rev. Esp. Cardiol. 37: 27, 1.984.

17) LE FUR, G.; GUEREMY, J.; BENAVIDES, M.; MESTRE, M.; MIZOULE, J.; DOBLE, A.; UZAN, A. Peripheral type benzodiazepine

- pine binding sites. En GABA and benzodiazepine receptors Ed. Lab. Pharmuka, Paris, 1.983.
- 18) LITTER, M. Hipnóticos no barbitúricos: Benzodiazepinas hipnóticas En Compendio de Farmacología. 3ª ed. Ed. "El Ateneo", Barcelona, 1.984.
- 19) R.-TRELLES, F.A. Fármacos ansiolíticos: benzodiazepinas. En LORENZO-VELAZQUEZ, B. Farmacología y su proyección a la clínica. 14ª ed. 417, 1.979.
- 20) HEVIA, A. Estudio del diacepán y triazolán en la agregación plaquetaria de ratas normales y ansiosas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 1.985.
- 21) KANGAS, L.; BREIMER, D. Clinical pharmacokinetics of nitrazepam Clin. Pharmacokinet. 6: 346, 1.981.
- 22) GREENBLATT, D.J.; DIVOLL, M.; ABERNATHY, D.R.; OCHS, H.R.; SHADER, R.I. Clinical pharmacokinetics of the newer benzodiazepines. Clin. Pharmacokinet. 8: 233-252, 1.983.
- 23) BAKKE, O.M.; KARAM, K. Time-course of transplacental passage of diazepam: influence of injection-delivery interval on neonatal drug concentration. Clin. Pharmacokinet. 7: 353, 1.982.
- 24) DARRELL, R.A.; GREENBLATT, D.J.; DIVOLL, M.; SMITH, R.B.; SHADER, R.I. The influence of obesity on the pharmacokinetics of oral alprazolam and triazolam. Clin. Pharmacokinet. 9: 177, 1.984.
- 25) ABERNETHY, D.P.; GREENBLATT, D.J. Pharmacokinetics of drugs in obesity. Clin. Pharmacokinet. 7: 108, 1.982.

- 26) GREENBLATT, D.J. Clinical pharmacokinetics of oxacepam and lorazepam. Clin Pharmacokinet. 6: 89, 1.981.
- 27) RONCARI, G.; ZIEGLER, W.H.; GUENTERT, T.W. Pharmacokinetics of the new benzodiazepine antagonist RO15-1788 in man following intravenous and oral administration. Br. J. Clin. Pharmacol. 22: 421-428, 1.986.
- 28) KALES, A.; BIXLER, E.O.; VELA-BUBNO, A.; SOLDATOS, C.R.; NIKLAUS, D.E.; MANFRED, R.L. Comparison of short and long half-life benzodiazepine hypnotics triazolam and quazepam. Clin. Pharmacol. Ther. 40: 378:386, 1.986.
- 29) RANDY, N.A.T.; KENNEDY, H.J.; NICHOLL, J.; TRIGER, D.R. Sedation for gastroscopy: a comparative study of midazolam and diazelmus patients with and without cirrhosis. Br. J. Pharmacol. 22: 643-647, 1.986.
- 30) KROBOTH, P.D.; SMITH, R.B.; STOHR, G.P.; JUHL, R.P. Pharmacodynamic evaluation of the benzodiazepine oral contraceptive interactions. Clin. Pharmacol. Ther. 38: 525-532, 1.985.
- 31) ALLEN, M.D.; GREENBLATT, D.J.; KARMAZ, J.S.; SHADER, R.I. Desmethyl-diazepam kinetics in the elderly after oral prazepam. Clin. Pharmacol. Ther. 28: 196-202, 1.980.
- 32) GREENBLATT, D.J.; DARRELL, R.A.; LOCNISKAR, A.; OCHS, H.R.; KARMAZ, J.S.; SHADER, R.I. Age, sex, and nitrazepam kinetics: Relation to antipyrine disposition. Clin. Pharmacol. Ther. 38: 697-703, 1.985.

- 33) FRIEDMAN, H.; GREENBLATT, D.J.; BURSTEIN, E.S.; HARTZMAN, J.S.; SHADER, R.I. Population study of triazolam pharmacokinetics Br. J. Clin. Pharmacol. 22: 639-642, 1.986.
- 34) BOWERY, N.G. The complex GABA receptor complex. TIPS. 5: 413-414, 1.984.
- 35) LADER, M.; BRUCE, M. States of anxiety and their induction by drugs. Br. J. Clin. Pharmacol. 22: 251-256, 1.986.
- 36) MARANGOS, P.S.; PAUL, S.M.; GREENLAW, O. Demonstration of an endogenous competitive inhibitor(s) of ³H-diazepam binding in bovine rat brain. Life Sci. 1.893-1.900, 1.978.
- 37) BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M. Searching for endogenous benzodiazepine receptors ligands. TIPS 1: 424-427, 1.980.
- 38) GRAY, J.A.; GREEN, A.R. Evidence for increased GABA_A receptors function in mouse frontal cortex following antidepressant administration. Br. J. Pharmacol. 89: 799P, 1.986.
- 39) WEISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: Antianxiety reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. Science. 177: 180-183, 1.972.
- 40) NUTT, J.M.; FRANKLIN, M.; GOSDEN, B.; MURDOCK, P. The effect of diazepam on indices of alpha₂ adrenoceptor function in man. Br. J. Clin. Pharmacol. 21: 588, 1.986.
- 41) HIGGINS, G.A.; JONES, B.S.; OAKLEY, N.R. The effects of discrete injections of muscimol and flurazepam into the dorsal raphe nucleus on two models of anxiety in the rat. Br. J. Pharmacol. 88: 294P. 1.986.
- 42) DEACON, R.; GARDNER, C.R. Benzodiazepines and 5HT ligands

- in a rat conflict test. Br. J. Pharmacol. 88: 330P, 1.986.
- 43) MOSER, P.C.; REDFERN, P.H. Benzodiazepines potentiate 5HT-receptor stimulation. J. Pharm. Pharmacol. 37: 97P, 1.985.
- 44) LLOYD, K.G.; MOREL, E.; PERRAULT, G.; ZIVKOVIC, B. GABA-dependent and GABA-independent effects of benzodiazepines and zolpidem. Br. J. Pharmacol. 87: 38P, 1.986.
- 45) LLOYD, K.G.; THURET, F.; PILL, A. Upregulation of GABA_B binding sites in rat frontal cortex: A common action of repeated administration of different classes of antidepressants and electroshock J. Pharmacol. Exp. Ther. 235: 191-199, 1.985.
- 46) COOPER, S.J. Bidirectional effects of behaviour of beta-carbolines acting at central benzodiazepine receptors. TIPS. 7: 210-212, 1.986.
- 47) NIELSEN, M.; BRAESTRUP, C.; 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, 1.977.
- 48) BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M. Ontogenic development of benzodiazepines receptors in the rat brain. Brain Res. 174: 170-173, 1.978.
- 49) REGAN, J.W.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. The benzodiazepine receptor: its development and its modulation by GABA. J. Pharmacol. Exp. Ther. 212: 137, 1.980.
- 50) MATSUMOTO, K.; KASUYA, M.; FUKUDA, H. DIDS, an anion

transport blocker, modulates ivermectin-induced enhancement of benzodiazepine receptor binding in rat brain. *Gen. Pharmac.* 5: 519-523, 1.986.

51) GUIDOTTI, A.; EBSTEIN, B.; COSTA, E. Benzodiazepine GABA recognition sites and their endogenous modulators as functional units of GABA receptors. *Abstr. 8th. Int. Congress Pharmacol.* pp663, 1.981.

52) IVERSEN, L.L. GABA and benzodiazepine receptors. *Nature.* 275: 477, 1.978.

53) TOLL, L.; KEYS, C.; SPANGLER, D.; COE, W. Computer-assisted determination of benzodiazepine receptors heterogeneity. *Eur. J. Pharmacol.* 99: 203-209, 1.984.

54) JACQMIN, P.H.; DELCOUR, V.; LESNE, M. Selective affinity of one enantiomer of suriclone demonstrated by a binding assay with benzodiazepine receptors *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 288: 26-32, 1.986.

55) MOHLER, H.; OKADA, T. Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nervous system. *Science.* 198: 849, 1.977.

56) SQUIRES, R.F.; BRAESTRUP, C. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature.* 266: 732-734, 1.977.

57) MORISHITA, S.I.; GOTO, M.; FUKUDA, H. Cerebellar cyclic nucleotides and the development of convulsion, with reference to the anticonvulsant activity of diazepam. *Gen. Pharmac.* 17: 343-346, 1.986.

58) STEINER, F.A.; FELIX, D. Antagonist effects of GABA and benzodiazepines on vestibular and cerebellar neurons. *Nature.*

260: 346-347, 1.976.

59) LOWENSTEIN, P.R.; ROSENSTEIN, R.; CAPUTTI, E.; CARDINALLI, D.P. Benzodiazepine binding sites in human pineal gland. Eur. J. Pharmacol. 106: 399, 1.985.

60) BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M. Multiple benzodiazepine receptors. TINS 3: 301-303, 1.980.

61) REGAN, J.W.; ROESKE, W.R.; DESHMUK, H.; YAMAMURA, H.I. Alterations in central and peripheral benzodiazepine receptors by monosodium glutamate (MSG) and by experimental hypertension, respectively. Abstr. 8th. Int. Congress. Pharmacol. pp663, 1.981.

62) PAUL, S.M.; ZATS, M.; SKOLNICK, P. Demonstration of brain-specific benzodiazepine receptors in rat retina. Brain Res. 187: 243, 1.980.

63) MULLER, W.E. The benzodiazepine receptor. Pharmacol. 22: 153-161, 1.981.

64) CILIAY, B.J.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. In vivo ³H-Flunitrazepam binding: Imaging of receptor regulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 238: 749-757, 1.986.

65) TIETZ, E.I.; ROSEMBERG, H.C.; CHIV, T.D. Autoradiographic localization of benzodiazepine receptor downregulation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 236: 284-292, 1.986.

66) COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Molecular mechanism in the receptor action of benzodiazepines. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19: 531-545, 1.979.



- 67) KAROBATH, M.; SPERK, G. Evidence for an endogenous factor interfering with ^3H -diazepam binding to rat brain membrane. *Eur. J. Pharmacol.* 49: 323-326, 1.978.
- 68) TOFFANO, G. Tissue distribution of the endogenous modulator for benzodiazepines and GABA binding. *Neuropharmacol.* 1.978.
- 69) DOBLE, A.; IVERSEN, L.L.; MARTIN, I.L. The benzodiazepine binding site; one receptor or two?. *Br. J. Pharmacol.* 75: 42, 1.982.
- 70) LO, M.M.S.; STITTMATER, S.M.; SNYDER, S.H. Physical separation and characterization of two types of benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 680-684, 1.982.
- 71) MOHLER, H.; BATTERBY, M.K.; RICHARDS, J.G. Benzodiazepine receptors protein identified and visualized in brain tissue by a photoaffinity label. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 1.666-1.670, 1.980.
- 72) LIPPA, A.S. Benzodiazepine receptors: cellular and behavioural characteristics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 831-843, 1.979.
- 73) KLEPNER, C.A.; LIPPA, A.S.; BENSON, D.I.; SARRO, M.C.; BEER, B. Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 457-462, 1.979.
- 74) WILLIANSO, M.J.; PAUL, S.M.; SKOLNICK, P. Labelling of benzodiazepine receptors in vivo. *Nature.* 275: 551-553, 1.978.
- 75) COSTA, T.; RODBARD, D.; PERT, C. Is the benzodiazepine

receptor coupled to a chloride ion channel?. Nature. 277: 315-317, 1.979.

76) HAVOUNDJIAN, H.; PAUL, S.M.; SKOLNICK, P. Acute stress-induced changes in the benzodiazepine/GABA receptor complex are confined to the chloride ionophore. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237: 787-793, 1.986.

77) GARDNER, C.R.; GUY, A.P. Do agents enhancing GABA receptor-coupled chloride ionophore function have anxiolytic properties?. Br. J. Pharmacol. 89: 798P, 1.986.

78) GREENBLATT, D.J.; DIVOLL, M.; ABERNATHY, D.R.; OCHS, H.R.; SHADER, R.I. Clinical pharmacokinetics of the newer benzodiazepines. Clin. Pharmacokinet. 8: 233-252, 1.983.

79) LITTLE, H.J. Benzodiazepine agonists and inverse agonists both decrease locomotor activity and body temperature but show mutual antagonism. Br. J. Pharmacol. 88: 293P, 1.986.

80) KUNCHANDY, J.; KULKARNI, J.K. Apparent pA_2 estimation of benzodiazepine receptor antagonists. Meth. Find. Clin. Pharmacol. 8: 553-55, 1.986.

81) SALETU, B.; GRUNBERGER, J.; LINZMAYER, L. Early clinical pharmacological trial with a novel partial benzodiazepine agonist/antagonist RO17-1812 using pharmaco-EEG and psychometry. Meth. Find. Clin. Pharmacol. 8: 373-389, 1.986.

82) VOLICE, L.; BIACIONI, T.M. Presence of two benzodiazepine-binding sites in the rat hippocampus. J. Neurochem. 38: 591-593, 1.982.

- 83) HOWELLS, R.D.; SIMON, E.J. Benzodiazepine binding in chicken retina and its interaction with GABA. Eur. J. Pharmacol. 67: 133-137, 1.980.
- 84) REGAN, J.W.; YAMAMURA, H.F.; YAMADA, S.; ROESKE, W.R. Renal benzodiazepine binding increases during deoxycorticosterone/salt hypertension in rats. Eur. J. Pharmacol. 67: 167, 1.980.
- 85) SIOMMONDS, M.A. Interactions of the benzodiazepines RO5-4864 with the GABA_A receptor complex. Br. J. Pharmacol. 4: 82-98, 1.984.
- 86) WILGENBURG, H. Effect of benzodiazepines on growth and decay of miniature endplate currents in the isolated rat diaphragm preparation. Br. J. Pharmacol. 88: 469P, 1.986.
- 87) MATSOKIS, N.; DALEZIOS, Y. Comparative aspects of cerebellar (³H)-flunitrazepam and (³H)-GABA binding. Gen. Pharmacol. 6: 689-693, 1.986.
- 88) LEDDA, F.; MANTELLI, L.; MUGELLI, A. Alfa-sympathomimetic amines and calcium-mediated actions potentials in guinea pig ventricular muscle. Br. J. Pharmacol. 69: 565-573, 1.980.
- 89) BENAVIDES, J.; GUILLOUX, F.; RUFAT, P. In vivo labelling in several rat tissues of peripheral types benzodiazepine binding sites. Eur. J. Pharmacol. 99: 1-7, 1.984.
- 90) GAVISH, M.; FARES, F. The effect of freezing and thawing or of detergent treatment on peripheral benzodiazepine binding: the possible existence of an endogenous ligand. Eur. J. Pharmacol. 107: 283-284, 1.985.

- 91) WALI, F.A. Neuromuscular effects of diazepam, interactions with gamma-aminobutyric acid and methonexitone". Br. J. Pharmacol. 83: 411, 1.984.
- 92) DAVIES, L.P. Peripheral benzodiazepine binding sites in heart and their interaction with dipyridamole. Eur. J. Pharmacol. 73: 209, 1.981.
- 93) TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T.; SPECTOR, S. Changes in platelet and renal benzodiazepine binding in spontaneously hypertensive rats. Eur. J. Pharmacol. 70: 587-588, 1.981.
- 94) YAMAGISHI, F.; HARUTA, K.; HOMMA, N.; IWATSUKI, R.; CHIBA, S. Effects of diazepam on pancreatic exocrine secretion in the dog. Arch. Int. Pharmacodyn. 280: 314-323, 1.986.
- 95) LUZZI, S.; SAGNESI, S.; FRANCHI-MICHELI, S.; ROSI, E.; CIUFFI, M.; ZILLETTI, L. Diazepam potentiates GABA-contraction in guinea-pig ileum. Arch. Int. Pharmacodyn. 279: 29-39, 1.986.
- 96) HEVIA, A.; FERNANDEZ-ALONSO, A.; SERRANO, J.S.; CASTILLO, J.R.; GAGO, J. Efectos in vivo del diazepam en la agregación plaquetaria de la rata ansiosa. Farmacol. Clin. Exp. 3: 247, 1.986.
- 97) TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T.; SPECTOR, S. Properties of (³H)-diazepam binding to rat peritoneal mast cells. Life Sci. 27: 171-178, 1.980.
- 98) RINEHART, R.K.; BARBAZ, B.; IYENGAR, S. Benzodiazepine interactions with central thyroid-releasing hormone binding

- sites: characterization and physiological significance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 178-185, 1.986.
- 99) WANG, J.K.T.; TANIGUCHI, T.; SPECTOR, S. Properties of (³H)-diazepam binding sites on rat blood platelet. *Life Sci.* 27: 1.881, 1.980.
- 100) TANIGUCHI, T.; WANG, J.K.T.; SPECTOR, S. (³H)-diazepam binding sites on rat heart and kidney. *Biochem. Pharmacol.* 31: 589-590, 1.982.
- 101) CLANACHAN, A.S.; MARSHALL, R.S.. Diazepam potentiates the coronary vasodilator actions of adenosine in anesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* 70: 66P, 1.980.
- 102) IKRAN, H.; RUBIN, A.P.; JEWKES, R.F. Effect of diazepam on myocardial blood flow of patients with and without coronary artery disease. *Br. Heart J.* 35: 626P, 1.973.
- 103) DANIECK, H.B. Cardiovascular effects of diazepam and chlordiazepoxide. *Eur. J. Pharmacol.* 32: 58P, 1.975.
- 104) ABEL, R.M.; REIS, R.L.; STROSCICK, R.N. The pharmacological basis of coronary and systemic vasodilator actions of diazepam (Valium). *Br. J. Pharmacol.* 39: 261-274, 1.970.
- 105) KEMPNER, P.S.; SKOLNICK, P. Speculations on the identity of the mitochondrial benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 76: 465-467, 1.981.
- 106) DOURISH, C.T.; HUTSON, P.H.; CURZON, G. Puttative anxiolytics 8-OH-DPAT, buspirone and TUXQ 7821 are agonists at 5HT_{1A} autoreceptor in the raphe nuclei. *TIPS.* 7: 212-214, 1.986.

- 107) ROBERTSON, B.; TAYLOR, W.R. Effects of GABA and (-)-baclofen on calcium and potassium currents in cat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 89: 661-672, 1.986.
- 108) CONSOLO, S.; GARATTINI, S.; LADINSKY, H. Mechanism of action of benzodiazepines. *Eur. J. Pharmacol.* 1: 363-368, 1.975.
- 109) MAGGI, C.A.; MANZINI, S.; MELI, A. GABA a receptor mediated neurogenic inhibition of motility in the small intestine of urethane-anaesthetized rats. *Gen. Pharmac.* 17: 167-171, 1.986.
- 110) CURTIS, D.R.; GAME, C.J.A.; LODGE, D. Benzodiazepines and central glycine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 56: 307-311, 1.976.
- 111) KAROBATH, M.; PICHETA, P.; LIPPISTH, M.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Stimulation of benzodiazepine receptor binding by a novel GABA receptor. *Nature.* 278: 748-749, 1.979.
- 112) GALLAGER, D.W. Benzodiazepine and GABA. *Sleep.* 5:S3-S11, 1.982.
- 113) NAMIMA, M.; OKAMOTO, K.; SALVAT, Y. Taurine acts on presynaptic autoreceptors for GABA in the cerebellum: effects on Ca^{2+} influx and GABA release. *Jap. J. Pharmacol.* 32: 746-749, 1.982.
- 114) MOHLER, H.; PIERI, L.; POLL, P.; SHCERSCHLICHT, R. Stereospecific CNS effects of the GABA-transaminase in-

- hibition L-cycloserine are potentiated by diazepam. Br. J. Pharmacol. 88: 324P, 1.986.
- 115) SKOUGAARD, D.; JENSEN, M.; LAMBERT, J.D.C. Electrophysiological studies in cultured mouse CNS neurones of the actions of an agonist and an inverse agonist at the benzodiazepine receptor. Br. J. Pharmacol. 88: 717-731, 1.986.
- 116) KUBO, T.; NAGURA, J.; KIHARA, M.; MISU, Y. Cardiovascular effects of L-glutamate and GABA injected into the rostral ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Arch. Int. Pharmacodyn. 279: 150-161, 1.986.
- 117) MACDONALD, R.; BARKER, J.L. Benzodiazepines specifically modulates GABA mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. Nature. 271: 563-564, 1.978.
- 118) COSTA, E.; GUIDOTTI, A.; TOFFANO, G. Molecular mechanism mediating the action of diazepam on GABA receptors. Br. J. Psychiatry 133: 239-248, 1.978.
- 119) BIGGIO, G.; BRODIE, B.B.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Mechanisms by which diazepam, muscimol and other drugs change the content of cGMP in cerebellar cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 174: 3592-3596, 1.977.
- 120) ABIDTOL, A.; ABATE, C.D.; ARIAS, A.; CUSIMANO, L.; GUZZO, G. Phosphate induced hypocalcemia experimental digitalis intoxication. Cardiovascular Res. 8: 99-105, 1.974.
- 121) STRAUGHAN, D.W. Barbiturates, benzodiazepines and the GABA system. Adv. Pharmacol. Ther. Ed. P. Simon. Pergamon Press, Londres, 2: 19-27, 1.978.

- 122) KOZHECHKIN, S.N.; OSTROUSKAYA, R.V. Are benzodiazepines GABA antagonists?. *Nature*. 269: 72-73, 1.977.
- 123) TALLMAN, J.F.; THOMAS, J.W.; GALLAGER, D.W. GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature*. 274: 383-385, 1.978.
- 124) KAROBATH, M.; SPERK, G. Stimulation of benzodiazepine receptor binding by GABA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76: 1004, 1.979.
- 125) MCALLISTER-WILLIAMS, R.H.; MITCHELL, R. Benzodiazepines regulates coupling to anion channels in only some GABA receptor complexes. *Br. J. Pharmacol.* 84: 60P, 1.985.
- 126) BOWERY, N.G.; HILL, D.R.; HUDSON, D.L. "Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br. J. Pharmacol.* 78: 191-206, 1.983.
- 127) GIOTTI, A.; LUZZI, S.; SAGNESI, S.; ZILLETTI, L. GABA_A and GABA_B receptor-mediated effects in guinea-pig illeum. *Br. J. Pharmacol.* 78: 469-478, 1.983.
- 128) KAPLITA, P.V.; WATERS, D.H.; TRIGGLE, D.J. GABA action in guinea-pig ileal myenteric plexus. *Eur. J. Pharmacol.* 79: 43-51, 1.982.
- 129) HAEFELY, W.S.; MOHLER, H. El mecanismo de acción de las benzodiacepinas. *Edit. Lab. Roche Nutley* 1.981.
- 130) GARDNER, C.R.; GUY, A.P. Do agents enhancing GABA receptor-coupled chloride ionophore function have anxiolytic properties?. *Br. J. Pharmacol.* 89: 798P, 1.986.

131) LE FUR, G.; GUILLOUX, F.; RUFAT, P.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, in vivo studies Life Sci. 32: 1849-1856, 1.983.

132) LE FUR, G.; PERRIER, M.L.; VAUCHER, N.; IMBAULT, F.; FLAMIER, A.; BENAVIDES, J.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, in vitro studies. Life Sci. 32: 1.839-1.847, 1.983.

133) REGAN, J.W.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. (³H)-flunitrazepam binding to bovine retina and the effect of GABA, thereon. Neuropharmacol. 19: 413, 1.980.

134) ANTONACCIO, M.J.; TAYLOR, D.G. Involvement of central GABA receptors in the regulation of blood pressure and heart rate of anesthetized cats. Eur. J. Pharmacol. 46: 283-298, 1.977.

135) MIÑANO, F.J.; DURAN, J.A.; SERRANO, J.S.; HERNANDEZ, J. Acción del GABA en las arritmias inducidas por Cl₂Ca en la rata anetesiada. Arch. Farmacol. Toxicol. 10: 57-64, 1.984.

136) STANTON, H.C. Mode of action of GABA on the cardiovascular system. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 143: 195-204, 1.963.

137) VEMULLAPALLI, S.; BARLETTA, M. The role of the sympathetic nervous system in the cardiovascular effects of systemically administered GABA. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 267: 46-58, 1.984.

- 138) LOSCHER, W. Cardiovascular effects of GABA, GABA-amino-transferase inhibitors and valproic acid following systemic administration in rats, cats and dogs: Pharmacological approach to localize the site of action. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 257: 32-58, 1.982.
- 139) BILLINGSLEY, M.; SURIA, A. Effects of peripherally administered GABA and other aminoacids on cardiopulmonar responses in anesthetized rats and dogs. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 255: 131-140, 1.982.
- 140) HERNANDEZ, J.; MIÑANO, F.J.; SERRANO, J.S. Efecto del GABA sobre el automatismo experimental inducido en el ventriculo derecho aislado de rata. J. Pharm. Pharmacol. 13: 145-146, 1.982.
- 141) SERRANO, J.S.; HERNANDEZ, J.; MIÑANO, F.J. Compared efficacy of quinidine, GABA upon a model of ventricular automaticity. Meth. Find. Clin. Pharmacol. 5: 251-254, 1.983.
- 142) BILLINGSLEY, M.; SURIA, A.; GILMAN, R.; SHOKES, L.; SHARVARI, M. Evidence for GABA involvement in the peripheral control of blood pressure and vascular resistance. Brain Res. Bull. 5: 329, 1.980.
- 143) DE FEUDIS, F.V. GABA, an inhibitory neurotransmitter that is involved in cardiovascular control. Pharmacol. Res. Com. 14: 567-575, 1.982.
- 144) DE FEUDIS, F.V. GABA and neurocardiovascular mechanism. Neurochem. Int. 3: 113-122, 1.981.

145) GIULIANI, S.; MAGGI, C.A.; MELI, A. Differences in cardiovascular responses to peripherally administered GABA as influenced by basal conditions and type of anaesthetic. Br. J. Pharmacol. 88: 659-670, 1.986.

146) ANDO, S.; ISHII, K.; MAKINO, M.; AKUTAGAWA, M.; TANAKA, T. Mechanism of peripheral action of benzodiazepines. Abstr. 8th. Int. Congress Pharmacol. 509pp, 1.981.

147) MESTRE, M.; BELIN, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Modulation of voltage-operated, but not receptor-operated, calcium channels in the rabbit aorta by PK 11195, an antagonist of peripheral-type benzodiazepine receptors. J. Cardiovasc. Pharmacol. 8: 729-734, 1.986.

148) HAEFELY, W.E. Aspectos conductuales y neurofarmacológicos de las sustancias utilizadas en la ansiedad y estados afines. En Psicofarmacología a los 30 años de progreso. 1ª ed. Ed. Espaxs, Barcelona, 123: 1.515, 1.982.

149) SEIDEL, W.; COHEN, S.A.; BLIWISE, N.G.; ROTH, T.; DEMENT, W.C. Dose-related effects of triazolam and flurazepam on a circadian rhythm insomnia. Clin. Pharmacol. Ther. 40: 314-320, 1.986.

150) RICKELS, K.; MORRIS, R.J.; MAURIELLO, R.; ROSENFELD, H.; CHUNG, H.R.; NEWMAN, H.M.; CASE, W.G. Brotizolam, a triazolothienodiazepine, in insomnia. Clin. Pharmacol. Ther. 40: 293-299, 1.986.

152) BELL, H.E.; BERTINO, J.J.Jr. Constant diazepam infusion in the treatment of continuous seizure activity. Pharm. Inter-

national 6: 7P, 1.982.

153) LLEWIN, R.S.; WERDMULLER, B.F.M.; VAN WILGENBURG, H. Direct effects of diazepam at neuromuscular junction. Br. J. Pharmacol. 88: 460P, 1.986.

154) SUGIMOTO, J.; NAGATA, M.; IKEDA, Y. The effects of diazepam on rat isolated heart muscle. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 5: 655-663, 1.978.

155) AVERY, G.S. Drug treatment. 2^a ed. ADIS Press Australasia Pty Limited, Livingstone, 2^a edición, 1.980.

156) HOLLISTER, L.E. Ansiolíticos. En Farmacología clínica de drogas psicoterapéuticas. 1^a ed. Editorial Médica Panaméricana, Madrid 1.982.

157) MARKS, J. Las benzodiazepinas. Uso, uso excesivo, uso indebido y abuso. 1^a edición, español, MTP Press Limited, Lancaster. 1.979.

158) FRITZ, S.; SCHNEIDER, H.H.; STEPHENS, D.N.; WEIDMANN, R. Tolerance to the anxiolytic action of diazepam in rats. Br. J. Pharmacol. 88: 336P, 1.986.

159) LITTLE, H.S.; NUTT, D.J.; TAYLOR, J.C. Does chronic benzodiazepine administration cause a withdrawal shift across the whole benzodiazepine ligand spectrum?. Br. J. Pharmacol. 89: 796P, 1.986.

160) GHONEIM, M.M.; HINRICHS, J.V.; MEWALDT, S.P. Comparison of two benzodiazepines with differing accumulation. Behavioural changes during after 3 weeks of dosing. Clin. Pharmacol.

Ther. 39: 491-500, 1.986.

161) RYAN, C.P.; BOISSE, N.R. Benzodiazepines tolerance, physical dependence and withdrawal: Electrophysiological study of spinal reflex function. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231: 464, 1.984.

162) GALLAHER, E.J.; HENAVER, J.A.; JACQUES, C.J.; HOLLISTER, L.E. Benzodiazepine dependence in mice after ingestion of drug-containing food pellets. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237: 462-467, 1.986.

163) GALLAGER, D.W.; HENINGER, K.; HENINGER, G. Periodic benzodiazepine antagonist administration prevents benzodiazepine withdrawal symptoms in primates. Eur. J. Pharmacol. 132: 31-38, 1.986.

164) McNICHOLAS, L.F.; MARTIN, W.R.; PRUITT, T.A. N-Desmethyldiazepam physical dependence in dogs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 235: 368-376, 1.985.

165) KENAKIN, T.P. The potentiation of cardiac responses to adenosine by benzodiazepines. J. Pharmacol. Exp. Ther. 222: 752-758, 1.982.

166) BARKER, P.H.; CLANACHAN, D.S. Inhibition of adenosine accumulation into guinea pig ventricle by benzodiazepines. Eur. J. Pharmacol. 78: 241-244, 1.982.

167) MATLIB, M.A.; LEE, S.W.; DEPOVER, A.; SCHWARTZ, A. A specific inhibitory action of certain benzothiazepines and benzodiazepines on the sodium-calcium exchange process of heart and brain mitochondria. Eur. J. Pharmacol. 89: 327-328,

1.983.

168) ANHOLT, R.R.H.; De SOUZA, E.B.; OSTER-GRANITE, M.L.; SNYDER, S.H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: Autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 517-526, 1.985.

169) MESTRE, M.; CARRIOT, T.; BELIN, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral benzodiazepine receptors in a guinea pig heart preparation. *Life Sci.* 35: 953, 1.984.

170) HOLLK, M.; OSTERRIEDER, W. The peripheral, high affinity benzodiazepine binding site is not coupled to the cardiac Ca^{2+} channel. *Eur. J. Pharmacol.* 118: 293-301, 1.985.

171) MESTRE, M.; CARRIOT, T.; BELIN, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; DOBLE, A.; LE FUR, G. Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral benzodiazepine receptors are coupled to Ca channels in the heart. *Life Sci.* 36: 391-400, 1.985.

172) DOBLE, A.; BENAVIDES, J.; FERRIS, O.; BERTRAND, P.; MENAGER, J.; VAUCHER, N.; BURGEVIN, M.C.; UZAN, A.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Dihydropyridine and peripheral type benzodiazepine binding sites: subcellular distribution and molecular size determination. *Eur. J. Pharmacol.* 119: 153-167, 1.985.

173) MESTRE, M.; BOUETARD, G.; UZAN, A.; GUEREMY, C.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; LE FUR, G. PK 11195, an antagonist of

peripheral benzodiazepine receptors, reduces ventricular arrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion in the dog. Eur. J. Pharmacol. 112: 257-260, 1.985.

174) STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY UNIVERSITY OF EDINBURG. Pharmacological experiments on isolated preparations. E. and S. Livingstone Ltd. Edimburgo y Londres, 1.968.

175) KITCHEN, I. Textbook of in vitro practical Pharmacology". 1st ed. Blackwell Scientific Publications. Londres 1.984.

176) DECKER, N.; SCHWARTZ, J. Postjunctional Alpha-1 and Alpha-2 adrenoceptors in the coronaries of the perfused guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 251-257, 1.985.

177) JUILLIERE, Y.; ROYER, R.J.; ZANNAD, F. Differential effects of isoprenaline, dopamine, digoxin and amrinone on the guinea-pig isolated, perfused, working heart. Br. J. Pharmacol. 78: 120P, 1.983.

178) PEREZ, M.D.; PARKA, L.; LASTRA, L.; BARRIGON, S. Efecto del DMSO sobre la contractilidad y las propiedades electrofisiológicas del ventrículo aislado de conejo. Farmacol. Clin. Exp. 3: 197, 1.986.

179) SHLAFERT, M.; KAROW, A.M.Jr. Pharmacological effects of DMSO on the mammalian myocardium. Ann. N.Y. Acad. Sci. 243: 110-121, 1.975.

180) SIEGL, P.K.S. Overview of cardiac inotropic mechanisms. J. Cardiovasc. Pharmacol. 8: S1-S10, 1.986.

181) GREENBLAT, D.J.; SHADER, R.I.; DIVOLL, M.; HARMAT, J.J.

- Benzodiazepines: A summary of pharmacokinetic properties. Br. J. Clin. Pharmacol. 11: 11S-16S, 1.981.
- 182) HURST, J.W. El corazón. 2^a ed. Editorial Toray, Barcelona. 1.981.
- 183) ENCINA, J.L. Interacción farmacodinámica de la digoxina y betametildigoxina con el diazepam en la aurícula aislada de rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina de Sevilla. 1.986.
- 184) BLAUSTEIN, M.P. The cellular basis of cardiotonic steroid action. TIPS. 6: 289-292, 1.985.
- 185) HESS, P.; LANSMAN, B.; NILIUS, B.; TSIEN, R.W. Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. J. Cardiovasc. Pharmacol. 8: S11-S21, 1.986.
- 186) MORITOKI, H.; FUKUDA, H.; KOTANI, M.; VEYANA, T.; ISHIDA, Y.; TAKEI, M. Possible mechanism of action of diazepam as an adenosine potentiator. Eur. J. Pharmacol. 113: 89-98, 1.985.
- 187) DAUGHERTY, A.; WOODWARD, B. The effect of calcium on cyclic nucleotide levels in the rat isolated heart. Br. J. Pharmacol. 70: 69-70, 1.980.
- 188) DAVIES, L.P.; LAMBERT, J.B.; MARWOOD, J.F. Studies on several pyrrolo (2,3-d)pyrimidine analogues of adenosine which lack significant agonist activity at A₁ and A₂ receptors but have potent pharmacological activity in vivo. Biochem. Pharmacol. 35: 3021-3029, 1.986.

- 189) NAKANISHI, N.; NAKAMATA, N.; SUZUKI, T. Effects of calcium channel blockers on electrical and mechanical activities in rabbit myocardium. Abstrh. 8th. Int. Congress. Pharmacol. pp501, 1.981.
- 190) REEVES, J.P.; SUTKO, J.L. Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 591-594, 1.979.
- 191) KNORR, A.; WAGNER, J.; SCHUEMANN, H.J. On the importance of external calcium for sinus node automaticity in spontaneously beating guinea-pig atria. Arch. Farmacol. Toxic. 5: 79-87, 1.979.
- 192) LE FUR, G.; UZAN, A.; BENAVIDES, J.; RENAULT, C.; GUEREMY, C. Peripheral benzodiazepine binding sites: in vivo and in vitro labelling by (^3H)-PK 11195. Soc. Neurosci. Abstracts. 9: 405, 1.983 .
- 193) BENAVIDES, J.; QUARTERONET, D.; IMBAULT, F.; MALGOURIS, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; DUBROEUCQ, M.C.; GUEREMY, C.; LE FUR, G. Labelling of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat brain by using ^3H -PK 11195 an isoquinoline carboxamida derivative. Kinetic studies and autoradiographic localization. J. Neurochem. 41: 1744, 1.983.
- 194) BENAVIDES, J.; PERRIER, M.L.; VAUCHER, N.; MALGOURIS, C.; UZAN, A.; RENAULT, C.; GUEREMY, C.; DUBROEUCQ, M.C.; LE FUR, G. (^3H)-PK 11195: A new specific ligand for labelling the peripheral benzodiazepine binding sites in rat kidney . Mol. Pharmacol. 1.983.

SECRETARÍA

INSCRIPCIÓN PARA EL GRADO DE DOCTOR

Curso 19 **86** a 19 **87**

D. **GUILLERMO MACHUCA PORTILLO**

natural de **Sevilla** provincia de

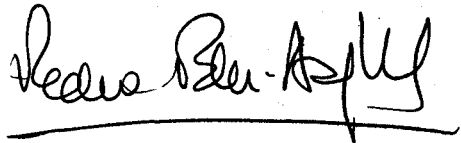
Sevilla de **26** años de edad, ha satis-

fecho los derechos correspondientes para el Grado de Doctor y en virtud de lo que resulta de su expediente académico, el Ilmo. Sr. Decano le ha admitido al ejercicio del mencionado grado, pudiendo con esta papeleta, y previa citación, presentarse ante el Tribunal examinador.

Para la identificación personal, el alumno exhibirá la CARTA DE IDENTIDAD ESCOLAR.

Sevilla **15** de **junio** de 19**87**

El Secretario de la Facultad,

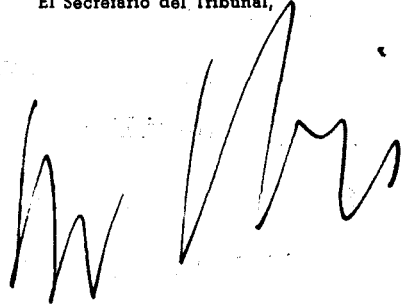


Reunido el Tribunal examinador, fue leída la Tesis por el graduando,
y después de contestar a las objeciones formuladas por los señores
Jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de

Apt 15 "cum laude"

Sevilla 24 de junio de 1987

El Secretario del Tribunal,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal de Examen por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para otorgar la Tesis Doctoral de
D.
titulada

acordó otorgarle la calificación de

Sevilla, de 19.....

El Vocal,



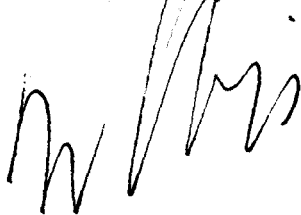
El Presidente

B. Galeana

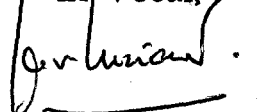
El Vocal,



El Secretario



El Vocal,



El Doctorado,

