

# Modificación de la densidad de los movimientos oculares rápidos bajo la administración de los agonistas y los antagonistas de los receptores a las benzodiazepinas

Moisés Alvarez-Rueda\*  
Robert Blois\*\*  
Helli Merica\*\*  
Jean-Michel Gaillard\*\*

## Summary

Benzodiazepines (BZ) have well known effects on most human sleep variables, but the underlying mechanism for their effect on rapid eye movements (REM) has not been fully understood. At present, the mechanism of action of BZ may be explained by their binding to selective sites localized in the central nervous system (CNS) and in the periphery, as well as the interaction with the receptors for neuromodulators such as adenosine (AD).

The present study was carried out to determine which of the binding sites described for BZ may play a role in the modifications observed with BZ in paradoxical sleep (PS) and REM.

Thirty two healthy volunteers of both sexes were studied under three different treatments, to determine the participation of flumazenil (FLU), an antagonist of central BZ receptors, PK 11195 (PK), an antagonist of peripheral BZ receptors, and caffeine (CAF), an antagonist of AD postsynaptic receptors, in the observed modifications on PS variables, generally brought about by the BZ.

The results show that the BZ studied, flunitrazepam and clonazepam, decreased the number and REM density (REMD), while FLU, PK and CAF were not capable of reversing this effect. Moreover FLU showed a tendency to decrease the REMD as an intrinsic effect.

The results show that the AD receptors are probably not involved in the modulation of REM, and indirectly suggest that the supramolecular complex (BZ-receptor, GABA-receptor and chloride channel) may participate in the modulation of REM. However, further studies, involving more specific ligands, would be required to confirm this interpretation.

## Resumen

Las benzodiazepinas (BZ) tienen efectos sobre algunas de las variables del sueño en el hombre, pero el mecanismo por el cual modifican los movimientos oculares rápidos (MOR), que ocurren durante el sueño paradójico (SP), no está suficientemente descrito. El mecanismo de acción de las BZ puede explicarse por su interacción con sitios de unión selectivos

localizados en el sistema nervioso central (SNC) y en la periferia, o por su interacción con los receptores descritos para neuromoduladores como la adenosina (AD).

El presente estudio se realizó para tratar de distinguir farmacológicamente cuál de los posibles sitios de unión descritos para las BZ participan en las modificaciones observadas con las BZ en el SP y en los MOR.

Treinta y dos sujetos voluntarios sanos, de uno y otro sexo, fueron estudiados bajo tres diferentes condiciones experimentales, para determinar la participación del flumazenil (FLU), un antagonista de los receptores centrales a las BZ, el PK 11195 (PK), un antagonista de los receptores periféricos a las BZ y la cafeína (CAF), un antagonista de los receptores postsinápticos a la AD, en las modificaciones del SP que generalmente inducen las BZ.

Los resultados muestran que las BZ estudiadas, flunitrazepam y clonazepam, disminuyen el número y la densidad de MOR (DMOR) y que el FLU, el PK y la CAF no revierten este efecto. Más aún, el FLU tiende a disminuir la DMOR como un efecto intrínseco.

Los datos obtenidos muestran que los receptores a la AD probablemente no participan en la regulación de los MOR e indirectamente sugieren que el complejo supramolecular (receptor a BZ, receptor a GABA y canal de cloro) puede participar en la modulación de los MOR, aunque es necesario realizar otros estudios con ligandos más específicos, para poder confirmar esta interpretación.

## Introducción

Las benzodiazepinas (BZ) tienen efectos sobre algunas de las variables del sueño en el hombre, pero todavía no se ha aclarado cuál es el mecanismo involucrado (20). Más aún, el efecto de las BZ sobre los movimientos oculares rápidos (MOR) no está suficientemente estudiado, aceptándose generalmente que las BZ tienden a disminuir la densidad de MOR (DMOR). Desafortunadamente, en los estudios realizados con el propósito de evaluar los efectos de los fármacos sobre el sueño, frecuentemente se olvidan de incorporar a la DMOR como una variable con una importancia similar a aquellas que regularmente se estudian bajo el efecto de BZ, como la latencia al sueño paradójico (SP), la disminución del SP y el aumento de la fase II de sueño de ondas lentas (SOL), a pesar

\* Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-167, 04510 México, D. F.

\*\* Departamento de Investigación Biológica y Psicofarmacología Clínica, Instituciones Universitarias de Psiquiatría en Ginebra, Suiza. (Jefe del Departamento: Profesor René Tissot).

de varias razones para considerar que la DMOR, como otras variables de los estados de sueño, tiene un substrato bioquímico, por lo que no deben ser observados en forma superficial (16, 38).

Varios estudios muestran que los MOR son modificados por diferentes fármacos psicotrópicos. Lavie (22) informa que el tratamiento crónico con levodopa, en pacientes con Enfermedad de Parkinson, provoca un aumento de la DMOR. Los fármacos antidepressivos modifican también la DMOR en los sujetos normales (26). En los pacientes deprimidos, sin embargo, estas modificaciones dependen del patrón observado antes del tratamiento y pueden predecir la respuesta a estos fármacos (15, 40). Estos pacientes, en general, muestran un aumento significativo de la DMOR (7, 9).

De acuerdo con los hallazgos actuales, las BZ interactúan con sitios de unión específicos de alta afinidad (receptores a BZ), que han sido identificados en el sistema nervioso central (SNC) con técnicas convencionales de radioligandos (3, 4, 25). Se han descrito dos tipos de receptores a las BZ: los centrales y los periféricos. Los receptores centrales a las BZ se encuentran acoplados al receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) y al canal de cloro. Este acoplamiento se conoce como el complejo supramolecular del receptor a las BZ. Este complejo es más sensible al GABA en el cerebro que en el hipocampo (34, 39); mientras que los receptores periféricos o los sitios de unión a las BZ no neuronales, también observados en el cerebro (8, 23, 24, 33), probablemente no están acoplados al receptor del GABA (27). Los sitios de unión a las BZ de tipo periférico fueron inicialmente observados en el riñón y en otros órganos (3). Sin embargo, la función de estos receptores es poco conocida (18).

El aislamiento de las imidazodiazepinas, que actúan como antagonistas de los receptores centrales a las BZ, aportó una poderosa herramienta para el estudio del mecanismo de acción de las BZ y planteó la posible existencia de ligandos endógenos para los receptores a las BZ (21). Sin embargo, casi no se han encontrado efectos farmacológicos con estos compuestos, y los efectos encontrados son discretos (6, 18).

Por otro lado, Phillis y cols., (29, 30) propusieron que uno de los mecanismos de acción de las BZ es el de inhibir la recaptura celular del neuromodulador adenosina (AD). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la cafeína (CAF), un antagonista de los receptores postsinápticos a la AD, antagoniza varios efectos del diazepam (31), si bien este mecanismo observado en estudios bioquímicos, aparentemente no participa en los efectos clínicos de las BZ.

El presente estudio se realizó para tratar de establecer farmacológicamente cuál de los receptores descritos para las BZ está más relacionado con las modificaciones observadas en el SP y en los MOR. Para esto, se utilizaron dos BZ: el flunitrazepam (FNZ), que tiene una misma afinidad por ambos receptores a las BZ (5, 35, 37) y el clonazepam (CNZ), que tiene una mayor afinidad por los receptores centrales (32, 33), y se analizó si producían modificaciones en el SP y en la DMOR, similares a las reportadas para las BZ en general (10, 20). También se examinó si algunas de estas modificaciones podían ser revertidas por el antagonis-

ta central de las BZ, el flumazenil (FLU) (21), o por el PK 11195 (PK), un compuesto nuevo sin relación química con las BZ, que actúa sobre los sitios de unión a las BZ de tipo periférico (23, 24). Asimismo, se estudió el efecto de la CAF, un antagonista de los receptores postsinápticos a la AD (28), con el fin de analizar si la AD está involucrada en las modificaciones provocadas por las BZ.

## Métodos

En este estudio participaron treinta y dos voluntarios sanos de uno y otro sexo. El margen de edad fue de 19 a 29 años. Los sujetos se seleccionaron después de una entrevista en la que se les practicó una historia clínica detallada, seguida de un examen clínico y pruebas de laboratorio (hematología, química sanguínea, examen de orina y pruebas de embarazo para las mujeres). Todos los sujetos tenían buena salud física y no tenían antecedentes de enfermedades graves, de traumatismos o de crisis convulsivas. No mostraban evidencia de alteraciones psiquiátricas actuales o anteriores y sus hábitos de sueño eran normales; no ingerían sustancias psicotrópicas o psicodislépticas. A los sujetos se les permitió continuar consumiendo café y alcohol, dentro de los índices razonables.

Después de explicarles el propósito del estudio en el que estuvieron de acuerdo en participar, firmaron una forma de consentimiento y recibieron instrucciones para mantener un estilo de vida regular, evitar las siestas, disminuir el ejercicio y evitar los hábitos irregulares de sueño, así como el consumo excesivo de café, alcohol, refrescos de cola y tabaco.

Los sujetos se asignaron en forma aleatoria a tres diferentes grupos experimentales, y de acuerdo con la técnica doble ciego, al momento de acostarse se les administraron los fármacos a las siguientes dosis:

- a) Flumazenil a la dosis de 100 mg, flunitrazepam a la dosis de 2 mg y la combinación flumazenil más flunitrazepam (n = 12 sujetos).
- b) PK 11195 a la dosis de 100 mg, flunitrazepam a la dosis de 2 mg y la combinación PK 11195 más flunitrazepam (n = 8 sujetos).
- c) Clonazepam a la dosis de 1.5 mg, cafeína a la dosis de 4.6 mg/kg y la combinación clonazepam más cafeína (n = 12 sujetos).

A cada grupo experimental se le administraron los fármacos a la misma hora; en las combinaciones se usaron las mismas dosis que cuando se administraba un solo fármaco, y los tratamientos y registros se espaciaron por lo menos quince días entre uno y otro.

A los sujetos de los tres grupos experimentales se les registró durante tres sesiones después de cada uno de los tratamientos descritos arriba, utilizando las técnicas de monitoreo convencional del sueño. Cada una de las tres sesiones consistió en 3 noches consecutivas: una noche con placebo prefármaco, una noche con fármaco y una noche con placebo post-fármaco. Cada sesión fué precedida de una noche de habituación, en la que no se llevaron registros.

Fueron utilizados el electroencefalograma (EEG), el electrooculograma (EOG) y el electromiograma (EMG). Los movimientos oculares se registraron con electrodos colocados sobre el canto externo de ambos ojos. El potencial del movimiento ocular se amplificó con las características siguientes: constante de tiempo de un segundo, ancho de banda de 0.16-15 cps y una amplitud de 200 mV/50 mcV. El sueño se registró en cintas magnéticas y las cintas fueron analizadas con un sistema previamente descrito por Gaillard y Tissot (11). La señal del EOG se analizó con un detector electrónico que es parte del sistema (11), y los movimientos oculares rápidos (MOR) se detectaron usando un umbral de amplitud de 37.5 mcV y una ventana umbral de 0.5 mcV/segundo.

Las densidades de MOR (DMOR) se calcularon por el método de regresión polinomial (12), la cual describe la evolución de las DMOR en cada episodio de sueño paradójico (SP) con respecto al tiempo. Las variables cuantificadas fueron:

- El número de los episodios de SP durante la noche.
- La duración total de cada episodio de SP y el tiempo total del SP a lo largo de la noche.
- El número total de MOR en cada episodio de SP y en toda la noche.
- La DMOR durante cada episodio de SP y durante toda la noche. La DMOR se definió como la relación entre el número de MOR y la duración total de SP.

Estas variables se analizaron en todas las condiciones, y las comparaciones se hicieron con la prueba de

análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Las diferencias significativas se establecieron a  $p \leq 0.05$ . En los casos en los que el ANOVA resultó estadísticamente significativo se utilizó la prueba de la menor diferencia significativa (MDS) a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$  (36).

## Resultados

Como se puede observar en la tabla 1, de las BZ estudiadas, el FNZ disminuyó significativamente los episodios de sueño paradójico (ESP) cuando se comparó con el grupo placebo prefármaco, con el CNZ, con el FLU y con la CAF. El PK también disminuyó los ESP cuando se comparó con el FLU y la CAF. La combinación PK más FNZ mostró la misma disminución de los ESP que se observó cuando se administró sólo el FNZ; incluso fué menor a la observada con la administración de la combinación FNZ-FLU.

La duración del sueño paradójico (DSP) disminuyó bajo la administración del CNZ, cuando se comparó con el FLU y el PK. La combinación PK-FNZ también mostró una disminución de la DSP cuando se comparó con el PK y el FLU. La administración combinada del CNZ y la CAF mostró una disminución significativa de la DSP cuando se comparó con el placebo prefármaco y con los tres antagonistas estudiados (tabla 1).

Tanto el FNZ como el CNZ disminuyeron la densidad de los movimientos oculares rápidos (DMOR). Este efecto no fué revertido por ninguno de los anta-

**TABLA 1**  
Modificaciones en los episodios del sueño paradójico, en la duración del sueño paradójico y en la densidad de los movimientos oculares rápidos inducidas bajo la administración de agonistas y antagonistas de las benzodiazepinas (n = 32). (Promedio  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Episodios de SP	Duración del SP	Densidad de MOR
Placebo prefármaco	4.70 $\pm$ 0.83	107.71 $\pm$ 21.07	6.06 $\pm$ 3.98
Flunitrazepam	4.10 $\pm$ 0.94 <sup>* a b c</sup>	98.95 $\pm$ 29.45	2.59 $\pm$ 2.46 <sup>* c d</sup>
Clonazepam	4.67 $\pm$ 0.75	93.33 $\pm$ 25.51 <sup>b c</sup>	2.64 $\pm$ 2.69 <sup>* c d</sup>
Flumazenil	4.83 $\pm$ 0.90	109.33 $\pm$ 23.59	4.38 $\pm$ 3.22 <sup>c</sup>
PK 11195	4.25 $\pm$ 0.66 <sup>b d</sup>	109.38 $\pm$ 25.12	7.58 $\pm$ 3.60
Cafeína	4.82 $\pm$ 0.83	104.82 $\pm$ 19.84	6.08 $\pm$ 3.77
Flumazenil + Flunitrazepam	4.50 $\pm$ 1.12	102.33 $\pm$ 36.28	2.06 $\pm$ 2.01 <sup>* b c d</sup>
PK 11195 Flunitrazepam	3.88 $\pm$ 0.60 <sup>* a b d e</sup>	93.75 $\pm$ 14.56 <sup>b c</sup>	2.80 $\pm$ 1.82 <sup>* c d</sup>
Clonazepam + Cafeína	4.36 $\pm$ 0.77	88.64 $\pm$ 23.13 <sup>* b c d</sup>	3.35 $\pm$ 2.33 <sup>* c d</sup>

Comparaciones con	Placebo prefármaco	* p < 0.05
	Clonazepam	a p < 0.05
	Flumazenil	b p < 0.05
	PK 11195	c p < 0.05
	Cafeína	d p < 0.05
	Flumazenil + Flunitrazepam	e p < 0.05

gonistas de las benzodiazepinas (BZ). Más aún, se observó que el FLU, antagonista de los receptores centrales a las BZ, produjo una moderada disminución de la DMOR cuando se comparó con el antagonista de los receptores periféricos a las BZ. Se puede observar que la CAF, un antagonista de los receptores a la adenosina, no modificó ninguna de las variables estudiadas; en la administración combinada, solo influyó sobre la disminución de la DSP, probablemente como un efecto aditivo, ya que esta disminución no fue observada en forma clara cuando se administró solo CNZ.

La evolución de la DMOR a lo largo de la noche se describe a través de la regresión polinomial (figura 1). El FNZ administrado solo o en combinación con el antagonista, disminuyó la evolución de la DMOR. Se hace notar que la regresión polinomial de FNZ más FLU está sobrepuesta totalmente a la de FNZ. La otra BZ, el CNZ, administrado solo o con la CAF tiene un efecto similar al del FNZ.

La figura 1 muestra que la evolución de las DMOR no se modificó ni por el PK ni por la CAF, pero el FLU mostró una evolución diferente a la observada con el placebo pre-fármaco. Los resultados no mostraron ninguna correlación significativa entre el número de MOR y la duración total de SP, en ninguna de las situaciones experimentales.

## Discusión

Los efectos del FNZ y del CNZ sobre el sueño, observados en este estudio, concuerdan con las observaciones anteriores del grupo de Gaillard empleando otras BZ (13,14). Estos efectos cumplen tres condiciones: disminución en el número de ESP, disminución en la DSP (13,14) y una disminución en el número de la DMOR. Este último efecto está probablemente relacionado con las concentraciones plasmáticas de los fármacos en el organismo, ya que éste no fué observado en las noches posteriores a la administración de los fármacos. De acuerdo con los hallazgos de Aserinsky (2), no se encontró una correlación directa entre el número de MOR y la DSP. Esto puede sugerir que están involucrados dos mecanismos diferentes en la producción del SP y en la de los MOR, por lo menos cuando se toma en cuenta para estos parámetros la evolución de toda la noche. Esta interpretación se apoya en la observación de que el FLU es capaz de antagonizar la disminución provocada por el FNZ en el número de ESP, pero es incapaz de revertir la disminución de la DMOR, como se esperarí de un antagonista central de las BZ. Zimmerman y cols. (41) también sugieren diferentes mecanismos para la DMOR y quizás para otras actividades fásicas del SP, que pueden estar más directamente involucrados con el proceso del sueño *per se*, en particular los osciladores endógenos que controlan la ritmicidad del SP. Los resultados de Antonioli (1) también sugieren la relativa independencia de la DMOR de otros parámetros del SP.

Bajo la hipótesis de que el FNZ se une a los dos tipos de receptores a las BZ (centrales y periféricas) y de que el FLU se une sólo a los receptores centrales de

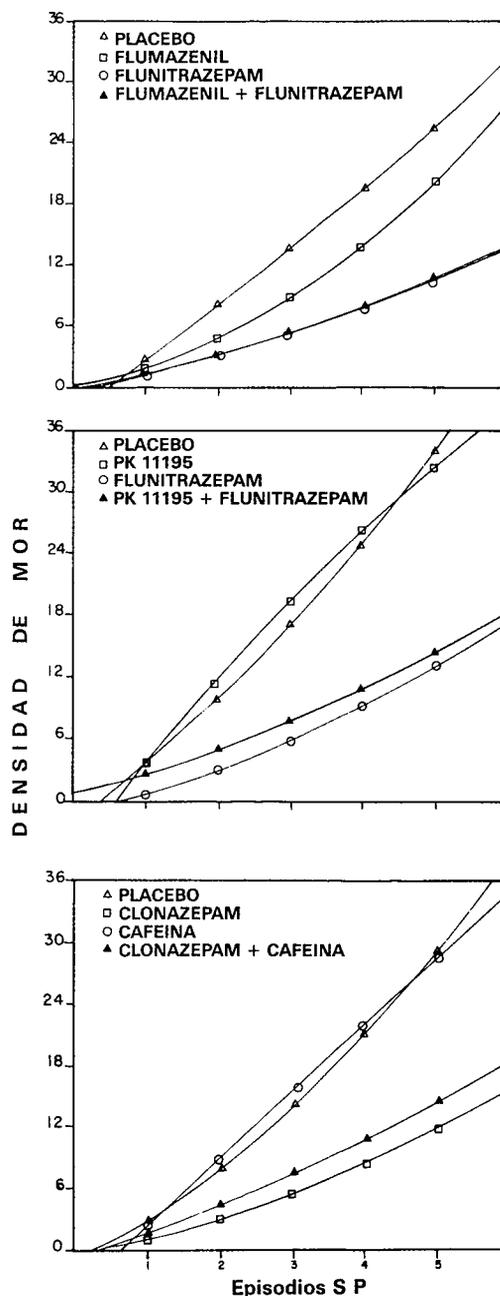


FIGURA 1. Tendencias de las densidades de MOR en los episodios sucesivos de sueño paradójico (regresión curvilínea) bajo la administración de:

- Flumazenil, flunitrazepam y flumazenil más flunitrazepam (N = 12).
- PK 11195, flunitrazepam y PK 11195 más flunitrazepam (N = 8).
- Clonazepam, cafeína y clonazepam más cafeína (N = 12).

La regresión curvilínea de flumazenil más flunitrazepam muestra la misma curva que flunitrazepam.

las BZ, se podría suponer que los llamados receptores periféricos, que se encuentran en el SNC (27) (especialmente en la glia), participan en las modificaciones de los MOR. Sin embargo, los resultados obtenidos

con el antagonista de los receptores a las BZ de tipo periférico, el PK, no apoyan esta hipótesis. Más aún, la disminución de los ESP podría sugerir la presencia de una sustancia endógena que actuara directamente sobre los receptores centrales, al estar ocupados los receptores periféricos; o bien, que las propiedades farmacológicas del PK fueran de tipo agonista-antagonista. La ausencia de efecto de la CAF sola, y la ausencia de interacción con el CNZ, puede indicar que los receptores a la AD probablemente no están involucrados en el efecto de las BZ sobre la modulación de los MOR, como sugieren Phillis (29, 30) y Polc (31) para los efectos generales de las BZ.

Los resultados del presente estudio sugieren que el complejo supramolecular (receptor a BZ, receptor a GABA y canal de cloro), puede participar en la modulación de los MOR. Así también, la combinación del FNZ y el FLU facilita la disociación del efecto de BZ sobre el SP y sobre los MOR. Esta disociación no está relacionada con la activación de los receptores periféricos de las BZ, dado que el PK no modifica el efecto del FNZ. Sin embargo, este resultado hace pensar en la posibilidad de que exista una heterogeneidad de los receptores centrales a las BZ. Hasta donde se sabe actual-

mente, esta heterogeneidad probablemente no se debe a las diferencias en la parte proteolítica del receptor, pero posiblemente puede estar relacionada con la glicosilación, que puede ser heterogénea en varias áreas del cerebro (19).

Otra alternativa para explicar los hallazgos del presente estudio puede ser la involucración del número de receptores presentes en la membrana neuronal de las células implicadas en la regulación del SP y en la de los MOR. Si el número de receptores a las BZ es mayor en las neuronas responsables de los MOR que en las responsables del SP, se puede considerar que es más difícil antagonizar el efecto de las BZ dentro del sistema de los MOR.

Además los resultados del presente estudio sugieren que el GABA puede estar involucrado en la regulación de los MOR, por medio del complejo supramolecular, aunque sería necesario llevar a cabo otros estudios con los compuestos recientemente desarrollados, que muestran propiedades agonistas y antagonistas mixtas, para poder establecer esta hipótesis.

Es posible que las modificaciones de los MOR reflejen más claramente el efecto ansiolítico de los fármacos que las modificaciones observadas sobre el SP.

## REFERENCIAS

- ANTONIOLI M, SOLANO L, TORRE A, VIOLANI C, COSTA M, BERTINI M: Independence of REM density from other REM sleep parameters before and after REM deprivation. *Sleep*, 4(2):221-225, 1981.
- ASERINSKY E: The maximal capacity for sleep: rapid eye movement density as an index of sleep satiety. *Biol Psychiat*, 1:147-159, 1969.
- BRAESTRUP C, SQUIRES R F: Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 74(9):3805-3809, 1977a.
- BRAESTRUP C, ALBRECHTSEN R, SQUIRES R F: High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269:702-704, 1977b.
- BRAESTRUP C, NIELSEN M: Multiple benzodiazepine receptors. *TINS*, 3:301-303, 1980.
- DARRAGH A, LAMBE R, O'BOYLE C, KENNY M, BRICK I: Absence of central effects in man of the benzodiazepine antagonist RO 15-1788. *Psychopharmacology*, 80:192-195, 1983.
- DUNCAN W C JR, PETTIGREW K D, GILLIN J C: REM architecture changes in bipolar and unipolar depression. *Am J Psychiatry*, 136(11):1424-1427, 1979.
- FILE S E, PELLOW S: RO 5-4864, a ligand for benzodiazepine micromolar and peripheral binding sites: antagonism and enhancement of behavioural effects. *Psychopharmacology*, 80:166-170, 1983.
- FOSTER F G, KUPFER D J, COBLE P, MCPARTLAND J: Rapid eye movement sleep density. An objective indicator in severe medical-depressive syndromes. *Arch Gen Psychiatry*, 33:1119-1123, 1976.
- GAILLARD J-M, SCHULZ P, TISSOT R: Effects of three benzodiazepines (nitrazepam, flunitrazepam and bromazepam) on sleep of normal subjects, studied with an automatic sleep scoring system. *Pharmakopsychiat*, 6(4):207-217, 1973a.
- GAILLARD J-M, TISSOT R: Principles of automatic analysis of sleep records with a hybrid system. *Comput Biomed Res*, 6:1-13, 1973b.
- GAILLARD J-M: Temporal organization of human sleep: general trends of sleep stages and their ultradian cyclic components. *L'Encephale*, V:71-93, 1979.
- GAILLARD J-M, BLOIS R: Effect of the benzodiazepine antagonist RO 15-1788 on flunitrazepam-induced sleep changes. *Br J Clin Pharmacol*, 15:529-536, 1983.
- GAILLARD J-M, SOVILLA J-Y, BLOIS R: The effect of clonazepam, caffeine and the combination of the two drugs on human sleep. En: Koella W P, Ruther E (eds). *Sleep 84*, 1985.
- GILLIN J C, WYATT R J, FRAM D, SNYDER F: The relationship between changes in REM sleep and clinical improvement in depressed patients treated with amitriptyline. *Psychopharmacology*, 59:267-272, 1978.
- GILLIN J C, SITARAM N: Rapid eye movement (REM) sleep: cholinergic mechanisms. *Psychological Medicine*, 14:501-506, 1984.
- HAEFELY W: Tranquilizers. En: Grahame-Smith D G (ed). *Psychopharmacology 2, Part 1: Preclinical Psychopharmacology*. Elsevier Science Publishers B V, 92-182, 1985a.
- HAEFELY W: Pharmacology of benzodiazepine antagonists. *Pharmacopsychiat*, 18:163-166, 1985b.
- HAEFELY W, MOHLER H: Comunicación personal. Octubre 6, 1986.
- HARVEY S C: Hypnotics and sedatives. En: Gilman A G, Goodman L S, Rall T W, y Murad F (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1985, págs. 339-371.
- HUNKELER W, MOHLER H, PIERI L, POLC P, BONETTI E P, CUMIN R, SCHAFFNER R, HAEFELY W: Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature*, 290:514-516, 1981.
- LAVIE P, BENTAL E, GOSHEN H, SHARF B: REM ocular activity in parkinsonian patients chronically treated with levodopa. *J Neural Transms*, 47:61-67, 1980.
- 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, 1-(2-chlorophenyl)-N-Methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci*, 32(16):1839-1847, 1983a.
- 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, 1-(2-chloro-phenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarbozamide. II. In vivo studies. *Life Sci*, 32(16): 1849-1856, 1983b.
25. MOHLER H, OKADA T: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science*, 198:849-851, 1977.
  26. PASSOUANT P, CADILHAC J, RIBSTEIN M: Monoamines et comportement. Les privations de sommeil avec mouvements oculaires par les anti-depresseurs. *Rev. Neurol (Paris)*, 127(1):173-192, 1972.
  27. PATEL J, MARANGOS P J: Differential effects of GABA on peripheral and central type benzodiazepine binding sites in brain. *Neurosci Lett*, 30:157-160, 1982.
  28. PHILLIS J W, EDSTROM J P, KOSTOPOULOS G K, KIRKPATRICK J R: Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol*, 57:1289-1312, 1979.
  29. PHILLIS J W, WU P H, BENDER A S: Inhibition of adenosine uptake into rat brain synaptosomes by the benzodiazepines. *Gen Pharmacol*, 12:67-70, 1981.
  30. PHILLIS J W, WU P H, COFFIN V L: Inhibition of adenosine uptake into rat brain synaptosomes by prostaglandins, benzodiazepines and other centrally active compounds. *Gen Pharmacol*, 14(5):475-479, 1983.
  31. POLC P, BONETTI E P, PIERI L, CUMIN R, ANGIOI R M, MOHLER H, HAEFELY WE: Caffeine antagonizes several central effects of diazepam. *Life Sci*, 28(20):2265-2275, 1981.
  32. RICHARDS J G, MOHLER H, HAEFELY W: Benzodiazepine binding sites: receptors or acceptors?. *TIPS*, junio, 233-235, 1982.
  33. SCHOEMAKER H, BOLES R G, HORST W D, YAMAMURA H I: Specific high-affinity binding sites for (3H) RO 5-4864 in rat brain and kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 225(1):61-69, 1983.
  34. SIEGHART W, KAROBATH M: Molecular heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Nature*, 286:285-287, 1980.
  35. SIEGHART W: Binding of various benzodiazepine receptor ligands to different benzodiazepine receptor subtypes. *Pharmacopsychiat*, 18:160-162, 1985.
  36. SOKAL R R, ROHLF F J: *Biometry*. Freeman W H, & Company (eds). San Francisco, Cal. USA, 1969.
  37. SPETH R C, WASTEK G J, JOHNSON P C, YAMAMURA H I: Benzodiazepine binding in human brain: Characterization using (3H) flunitrazepam. *Life Sci*, 22(10):859-866, 1978.
  38. STEVENS J R: Rapid eye movements of paradoxical sleep. Photic modulation of central monoamine activity. *TINS*, julio, 163-166, 1979.
  39. SUPAVILAI P, KAROBATH M: Heterogeneity of benzodiazepine receptors in rat cerebellum and hippocampus. *European J. Pharmacol*, 64:91-93, 1980.
  40. WHEATLEY D: Effects of drugs on sleep. En: Wheatley D. (ed). *Psychopharmacology of Sleep*. Raven Press, Nueva York, 1981, págs. 153-176.
  41. ZIMMERMAN J C, CZEISLER C A, LAXMINARAYAN S, KNAUER R S, WEITZMAN E D: REM density is dissociated from REM sleep timing during free-running sleep episodes. *Sleep*, 2(4):409-415, 1980.