UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

# POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO Y SUCCINILCOLINA "IN VIVO"

Mª del Buensuceso Ocaña Ocaña

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

## ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1988 a 1989 Folio 58 Número 114

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de Da. María del Consuelo Ocaña Ocaña, el espirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: "Potenciación por antagonistas del calcio del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina "in vivo""

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto "cum laude" por unanimidad

Granada 7 de julio de 1989

EL PRESIDENTE,

A. MORENO

Fdo.: Ángel Carlos Moreno

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: M. García Morillas

EL VOCAL,

Fdo.:

EL VOCAL,

F. LOPEZ TIMONEDA

Fdo.: F. López Timoneda

EL VOCAL,

Fdo.:

FIRMA DEL GRADUANDO.

M. Ocaña

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
Y TERAPEUTICA

AVDA. MADRID S/N
18012 GRANADA
ESPAÑA
TELEF. (9)58 20 11 62

D. RAIMUNDO CARLOS GARCIA, CATEDRATICO DE ANESTESIA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICA: Que Dª Mª del Buensuceso Ocaña Ocaña ha realizado la tesis Doctoral "POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO Y SUCCINILCOLINA "IN VIVO" bajo mi dirección, durante los cursos: 1987-88 y 1988-89.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a doce de Junio de mil novecientos ochenta y nueve.

Raimundo Carlos Garcia

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
Y TERAPEUTICA

AVDA. MADRID S/N.
18012 GRANADA
ESPAÑA
TELEF. (958 20 11 62

D. JOSE MANUEL BAEYENS CABRERA, PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICA: Que Dª Mª del Buensuceso Ocaña Ocaña ha realizado la tesis Doctoral "POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO Y SUCCINILCOLINA "IN VIVO" bajo mi dirección, durante los cursos: 1987-88 y 1988-89.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a doce de Junio de mil novecientos ochenta y nueve.

José M. Baeyens

José Manuel Baeyens

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
Y TERAPEUTICA

AVDA. MADRID S/N.
18012 GRANADA
ESPAÑA
TELEF. (9)58 20 11 62

Dª Mª ESPERANZA DEL POZO GAVILAN, PROFESORA AYUDANTE LRU DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICA: Que Dª Mª del Buensuceso Ocaña Ocaña ha realizado la tesis Doctoral "POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO Y SUCCINILCOLINA "IN VIVO" bajo mi dirección, durante los cursos: 1987-88 y 1988-89.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a doce de Junio de mil novecientos ochenta y nueve.

M. del Pozo

Mª Esperanza del Pozo

A MIS PADRES

Quiero expresar mi agradecimiento a Raimundo Carlos Garcia, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto de investigación.

A José Manuel Baeyens, por poner a mi disposición sus conocimientos sobre el tema, demostrando su calidad investigadora, espíritu crítico e interés en este proyecto, ofreciendome además de su ayuda, su amistad.

A Esperanza del Pozo, por andar a mi lado y seguir conmigo cada uno de los pasos de esta tesis, habiendo sabido ser una buena guía para este proyecto y una mejor amiga para mí.

A Aureliano, que colaboró en la parte experimental, consiguiendo que se pudiera llevar a cabo al facilitarme todo el material necesario para ello, siempre con ese buen humor que le caracteriza.

A Manolo Barrios, por intentar que mi lucha con el ordenador no fuera tan desigual y especialmente por su amabilidad y simpatía haciendo que el trabajo experimental a veces tan desalentador, no lo fuera tanto.

Por último a todos mis compañeros de este equipo de investigación, así como a los miembros de este Departamento que también colaboraron en su medida en este trabajo y sobre todo por sus muestras de ánimo.

# INDICE

INTRODUCCION

A. UNION NEUROMUSCULAR

1. ASPECTOS ANATOMICOS ..... 2

2. ASPECTOS FUNCIONALES ..... 4

2.1. Procesos Presinápticos ..... 4

a) Modalidades de liberación de acetilcolina ..... 4

b) Papel del calcio en la liberación de acetilcolina... 6

c) Modulación por receptores Presinápticos ..... 8

2.2. Procesos Postsinápticos ..... 10

a) Receptores Postsinápticos ..... 10

b) Papel del calcio en los procesos postsinápticos .... 12

B. BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES

1. CONCEPTO Y RECUERDO HISTORICO ..... 13

2. ESTRUCTURA QUIMICA Y CLASIFICACION ..... 14

2.1. Bloqueantes competitivos ..... 16

2.2. Bloqueantes despolarizantes ..... 16

2.3. Grupo mixto ..... 16

3. MECANISMO DE ACCION Y EFECTOS FARMACODINAMICOS NEUROMUSCULARES ..... 17

3.1. Bloqueantes competitivos ..... 18

a) Acciones postsinápticas ..... 18

b) Acciones presinápticas ..... 20

3.2. Bloqueantes despolarizantes ..... 24

3.3. Carasterísticas del bloqueo neuromuscular ..... 27

a) Bloqueo competitivo ..... 28

b) Bloqueo despolarizante ..... 29

4. EFECTOS FARMACODINAMICOS NO NEUROMUSCULARES..... 29

4.1. Efectos en la liberación de histamina ..... 30

4.2. Efectos sobre el sistema nervioso vegetativo ..... 31

a) Interacción con receptores nicotínicos ganglionares. 32

b) Interacción con receptores muscarínicos ..... 33

c) Efectos adrenérgicos ..... 35

d) Efecto anticolinesterasa ..... 36

4.3. Efectos sobre el sistema cardiovascular ..... 36

5. FARMACOCINETICA ..... 37

5.1. Bloqueantes competitivos ..... 37

5.2. Bloqueantes despolarizantes ..... 41

6. INTERACCIONES FARMACOLOGICAS ..... 43

6.1. Interacciones que aumentan el efecto de los bloqueantes neuromusculares ..... 45

a) Interacciones con anestésicos generales ..... 45

b) Interacciones con anestésicos locales ..... 46

c) Interacciones con antibióticos ..... 47

d) Interacciones con fármacos diversos ..... 48

6.2. Interacciones que disminuyen el efecto de los bloqueantes neuromusculares ..... 50

a) Interacciones con fármacos inhibidores de la colinesterasa ..... 50

b) Interacciones con aminopiridinas ..... 51

c) Interacciones con otros fármacos ..... 51

6.3. Interacciones de los bloqueantes neuromusculares entre sí ..... 52

**C. FISIOLOGIA DEL CALCIO**

1. Homeostasis del calcio ..... 55

2. Canales lentos ..... 57

3. Tipos de canales lentos ..... 58

a) Canales voltage-dependientes (VOCs) ..... 59

b) Canales operados por receptor (ROCs) ..... 61

**D. ANTAGONISTAS DEL CALCIO**

1. CONCEPTO Y RECUERDO HISTORICO ..... 64

2. ESTRUCTURA QUIMICA ..... 66

3. CLASIFICACION ..... 68

4. MECANISMO DE ACCION ..... 72

4.5. Localización de la acción a nivel celular ..... 74

4.6. Sitios de unión ..... 76

5. EFECTOS FARMACODINAMICOS ..... 80

5.1. Efectos cardíacos ..... 81

I. Actividad eléctrica cardíaca ..... 81

II. Efectos en la contractilidad cardíaca ..... 83

III. Otros efectos cardíacos ..... 83

5.2. Efectos vasculares ..... 84

I. Efectos en vasos coronarios ..... 84

II. Efectos en vasos periféricos ..... 84

5.3. Efectos hemodinámicos globales ..... 85

5.4. Efectos en músculo liso extravascular ..... 86

I. Efectos en vías aéreas ..... 86

II. Efectos en músculo liso intestinal ..... 87

III. Efectos a nivel uterino ..... 88

5.5. Efectos en placa motora ..... 88

6. FARMACOCINETICA ..... 97

6.1. Verapamil ..... 97

6.2. Diltiazem ..... 100

6.3. Nicardipina ..... 102

7. INTERACCIONES FARMACOLOGICAS ..... 105

7.1. Interacciones con fármacos cardiovasculares ..... 105

7.2. Interacciones con fármacos no cardiovasculares ..... 107

7.2.1. Interacciones con bloqueantes neuromusculares .. 107

7.2.2. Interacciones con fármacos que actúan en el SNC. 109

a) Interacciones con opiáceos ..... 109

b) Interacciones con anestésicos generales ..... 110

c) Interacciones con estimulantes del SNC ..... 112

7.3. Otras interacciones ..... 114

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS ..... 115

MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL

I.1. Animales ..... 119

I.2. Fármacos ..... 119

a) Anestésicos ..... 119

b) Fármacos estudiados ..... 119

I.3. Aparatos y material fungible ..... 120

**II. METODO**

II.1. Disección y montaje de la preparación ..... 121

II.2. Estimulación y registro ..... 122

II.3. Administración de fármacos ..... 123

**III. REPRESENTACION GRAFICA Y ESTADISTICA** ..... 125

**RESULTADOS**

**I. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO**

I.1. Efectos de pancuronio ..... 128

I.2. Efectos de verapamil asociado a pancuronio ..... 131

I.3. Efectos de diltiazem asociado a pancuronio ..... 134

I.4. Efectos de nicardipina asociada a pancuronio ..... 137

I.5. Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio ..... 140

I.6. Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a pancuronio ..... 142

**II. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON INFUSION CONTINUA DE SUCCINILCOLINA**

II.1. Efectos de la infusión continua de succinilcolina ... 145

II.2. Efectos de verapamil asociado a succinilcolina en infusión continua ..... 147

II.3. Efectos de diltiazem asociado a succinilcolina en infusión continua ..... 150

II.4. Efectos de nicardipina asociada a succinilcolina en infusión continua ..... 153

II.5. Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina en infusión continua ..... 156

II.6. Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a succinilcolina en infusión continua.. 158

**III. COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON BOLOS REPETIDOS DE SUCCINILCOLINA**

III.1. Efectos de succinilcolina administrada en bolos repetidos ..... 161

III.2. Efectos de verapamil asociado a succinilcolina .... 163

III.3. Efectos de diltiazem asociado a succinilcolina .... 166

III.4. Efectos de nicardipina asociada a succinilcolina .. 169

III.5. Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina ..... 172

III.6. Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a bolos repetidos de succinilcolina ..... 174

**IV. EFECTOS DE LA ASOCIACION DE ANTAGONISTAS DEL CALCIO Y BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES**

IV.1. Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina administrada en infusión continua y en bolos repetidos ..... 176

IV.2. Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a pancuronio y succinilcolina administrada en infusión continua y en bolos repetidos ..... 179

**DISCUSION**

I. Del efecto de los antagonistas del calcio sobre las contracciones del músculo esquelético inducidas con estimulación eléctrica del nervio..... 182

II. De la potenciación por antagonistas del calcio del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio..... 184

III. De la potenciación por antagonistas del calcio del bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina..... 189

a) Interacción entre los antagonistas del calcio y succinilcolina administrada en infusión continua ..... 190

b) Interacción entre los antagonsitas del calcio y succinilcolina administrada en bolos repetidos ..... 192

**CONCLUSIONES** ..... 196

**BIBLIOGRAFIA** ..... 199

# INTRODUCCION

## A. UNION NEUROMUSCULAR

### 1. ASPECTOS ANATOMICOS

La unión neuromuscular es una estructura anatomo-fisiológica especializada que permite la transformación de un impulso eléctrico en actividad mecánica (contracción muscular) por medio de un neurotransmisor (acetilcolina).

Las modernas técnicas histológicas y estudios electrofisiológicos con implantación de microelectrodos han permitido precisar la estructura y la relación funcional entre la extremidad de la fibra nerviosa y la célula muscular (Kienlen, 1984).

La porción presináptica de la unión neuromuscular esta formada por la terminación axónica de la fibra nerviosa motora cuya membrana celular forma uno de los bordes de la hendidura sináptica (membrana presináptica). Junto a esta zona se encuentran las vesículas que contienen el neurotransmisor, las cuales estan dispuestas según un patrón de formaciones triangulares, cuyo vértice esta próximo a la superficie sináptica y engloba una parte especializada de la membrana presináptica llamada "zona activa" que se corresponde con el lugar de liberación del neurotransmisor (Standaert, 1982) (fig. A).

En el lado de la fibra muscular, placa motora en sentido estricto, se encuentra la membrana postsináptica formando unos pliegues que permiten diferenciar dos zonas: las hendiduras sinápticas secundarias en las que la membrana postsináptica se

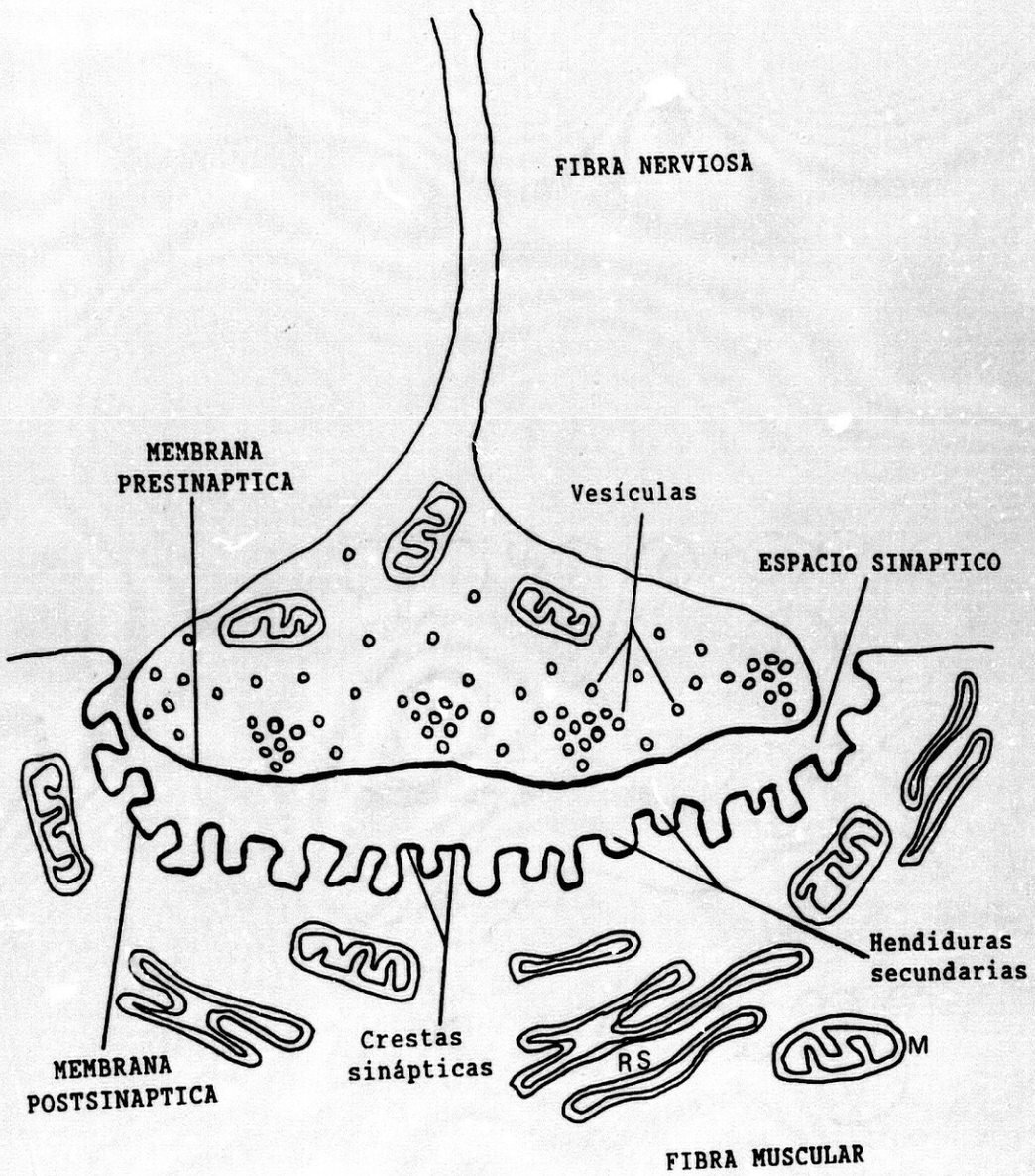



Fig. A. Representación esquemática de la unión neuromuscular

enfrenta a sí misma y las crestas sinápticas orientadas hacia la membrana presináptica y sobre las que se vacian las vesículas (Standaert, 1982) (fig. A).

Entre la terminación nerviosa y la fibra muscular existe una solución de continuidad o espacio sináptico que contiene mucopolisacáridos resultantes, posiblemente, de la fusión de los revestimientos de las partes pre y postsináptica (Kienlen, 1984).

## 2. ASPECTOS FUNCIONALES

La teoría de la transmisión sináptica aceptada por la mayoría de los fisiólogos es la "teoria cuántica", la cual sostiene que el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico en paquetes (cuantos) y cada uno de ellos equivaldría al contenido de una vesícula presináptica.

Para el estudio de la transmisión neuromuscular distinguiremos entre los procesos que tienen lugar tanto en la vertiente pre como en la postsináptica.

### 2.1. *Procesos Presinápticos*

a) Modalidades de liberación de acetilcolina

El impulso nervioso fisiológico provoca una liberación sincrónica de cuantos de neurotransmisor (acetilcolina) al espacio sináptico. Esta liberación de acetilcolina provocada por la despolarización de la terminación nerviosa se conoce como

**liberación inducida de acetilcolina vesicular.** El neurotransmisor liberado de la vesícula abierta, cruza la hendidura sináptica y se une a los receptores nicotínicos de la placa motora provocando una despolarización pasajera (potencial de placa motora o *e.p.p.*) que excita la fibra muscular (Standaert, 1982). En esta liberación inducida de acetilcolina existe un margen de seguridad ya que la cantidad de neurotransmisor liberado por un impulso nervioso es unas cuatro o cinco veces mayor que el necesario para conseguir la despolarización de la placa motora (Paton y Waud, 1967).

Cuando la unión neuromuscular esta en reposo, se producen espontáneamente pequeñas despolarizaciones en la placa motora (potenciales miniatura de placa motora o *m.e.p.p.s.*) debidas a la liberación de neurotransmisor de una vesícula presináptica: **liberación espontánea de acetilcolina vesicular.** Estos *m.e.p.p.s.* no desencadenan ninguna respuesta contráctil y su función parece ser la de ejercer control trófico de la placa motora (Standaert, 1982). La frecuencia de aparición de los *m.e.p.p.s.* (1-4 Hz) depende de varios factores, a saber, temperatura, presencia de fármacos, inhibidores del transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial y fundamentalmente de la concentración intracelular de calcio (Duncan y Statham, 1977; Publicover y Duncan, 1979; Alnaes y Rahaminoff, 1975).

Existe también una **liberación espontánea de acetilcolina no vesicular** producida por la difusión molecular del neurotransmisor a través de la membrana presináptica. Este tipo de liberación es mucho mayor, en cantidad, que la liberación espontánea de acetilcolina vesicular, puesto que constituye más del 95% de la liberación espontánea. Su función a nivel de la unión

neuromuscular no se conoce, si bien podría actuar también como sistema trófico sobre la fibra muscular. Este proceso es mediado por una ATPasa de la membrana y provoca unas pequeñas variaciones del potencial de membrana, "ruido de acetilcolina", por la unión de una o varias moléculas del neurotransmisor al receptor nicotínico postsináptico (Katz y Miledi, 1970).

b) Papel del calcio en la liberación de acetilcolina

La liberación espontánea de acetilcolina no vesicular en la terminación nerviosa esta modulada por la función estabilizadora de la membrana que tienen los iones calcio y magnesio. Así cuando disminuye la concentración de $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$ en el interior celular aumenta la inestabilidad de la membrana presináptica y se libera más acetilcolina no vesicular (Bowman y Rand, 1980).

La liberación espontánea de acetilcolina vesicular también depende de la concentración de calcio libre intracelular en la terminación nerviosa, aunque en sentido inverso que la anterior, puesto que se ha observado un incremento de la frecuencia de los *m.e.p.p.s.* cuando se incuba la preparación con el ionóforo del calcio A 23187, con teofilina (que aumentaría la liberación de calcio de las organelas intracelulares) o bien si aumenta la concentración de calcio del medio extracelular (que depararía un aumento en el influjo de este catión al interior celular) (Baker et al., 1971; Baker et al., 1969; Duncan y Statham, 1977).

El calcio iónico también juega un importante papel en la liberación inducida de acetilcolina vesicular, de hecho sustancias que bloquean la entrada de calcio (lantano y bario) inhiben también la liberación de acetilcolina (Silinsky, 1977; Mellow et al., 1982). El potencial de acción *per se* no desencadena la liberación de acetilcolina, sino que lo hace el flujo de calcio iónico iniciado por éste (Katz y Miledi, 1966; Standaert, 1982). Cuando el potencial de acción llega a su máxima despolarización comienza una corriente de calcio que persiste hasta que la membrana vuelve a su potencial normal por la salida de potasio. La entrada de calcio en la terminación nerviosa se realiza a favor de un gradiente electroquímico a través de canales específicos, los cuales son objeto de estudio en otra sección de la introducción.

El mecanismo por el cual el calcio libera acetilcolina parece ser un proceso de fusión entre la vesícula y la membrana celular, que tiene lugar en presencia de este ión (Jones, 1985).

La relación entre la concentración extracelular de calcio y la amplitud del potencial de placa motora (*e.p.p.*) se puede expresar de forma logarítmica, obteniendose una recta con una pendiente próxima a 4, lo que sugiere la cooperación de cuatro iones calcio para liberar un cuanto de acetilcolina (Dodge y Rahaminoff, 1975).

c) Modulación por receptores presinápticos de la liberación de acetilcolina

Se ha demostrado la existencia de diferentes tipos de receptores en la terminación nerviosa; entre ellos los más estudiados son los receptores colinérgicos nicotínicos que tienen un canal ionóforo asociado, selectivo para el sodio y que es bloqueado por tetrodotoxina.

Durante mucho tiempo se pensó que la activación fisiológica de estos receptores no tiene efecto sobre la frecuencia de los *m.e.p.p.s.* o sobre el contenido cuántico de los *e.p.p.s.* (Bowman y Rand, 1980). Sin embargo, años más tarde, abordando el mismo problema con métodos no electrofisiológicos consistentes en la incubación de preparaciones frénico-hemidiafragma con 3H-colina bajo condiciones de estimulación eléctrica que provocaba en la terminación nerviosa una liberación de 3H-acetilcolina calcio-dependiente, se demostró que la liberación de 3H-acetilcolina era modulada por receptores nicotínicos, ya que los agonistas (DMPP, nicotina y citosina) aumentaron su liberación, mientras que los antagonistas (tubocurarina, hexametonio y pancuronio) la disminuyeron (Vizi et al., 1987). A partir de estos experimentos se ha hablado de autorreceptores nicotínicos, que transportados hasta su localización presináptica a través de los axones, son capaces de desencadenar un mecanismo de feedback nicotínico positivo, por el que acetilcolina puede aumentar su propia liberación (autofacilitación nicotínica), aunque se requiere una estimulación nerviosa previa o una concentración umbral de acetilcolina para

iniciar este proceso. La autofacilitación nicotínica es frecuencia-dependiente (Wessler, 1989).

Estos receptores nicotínicos pueden ser desensibilizados tanto por concentraciones elevadas de agonistas o por exposiciones prolongadas a ellos, así como por inhibidores de las colinesterasas (Wessler, 1989).

Recientemente se ha confirmado la existencia de receptores muscarínicos a nivel presináptico, puesto que agonistas muscarínicos (oxotremorina) inhiben la liberación evocada de 3H-acetilcolina, y antagonistas del receptor muscarínico elevan esta liberación (Wessler, 1989). No obstante, estos receptores al ser estimulados por agonistas pueden tener funciones facilitadoras e inhibidoras según las diferentes condiciones de estimulación. De esta manera, la liberación del neurotransmisor, evocada por estimulación intermitente o por periodos cortos de estimulación continua, es controlada por autoinhibición muscarínica, mientras que en períodos largos de estimulación nerviosa continua, cuando los receptores nicotínicos no actúan, serían los receptores muscarínicos los que activarían la liberación del neurotransmisor (autofacilitación muscarínica) (Wessler, 1989).

En resumen, la liberación del transmisor evocada por períodos cortos de estimulación nerviosa esta regulada por procesos de autofacilitación nicotínica y autoinhibición muscarínica, los cuales son simultaneamente activados, suponiendo este segundo mecanismo junto a la desensibilización del receptor nicotínico un freno a la liberación excesiva de acetilcolina (Wessler, 1989).

## 2.2. *Procesos Postsinápticos*

La acetilcolina sale de las vesículas abiertas, cruza el espacio sináptico e interacciona con los receptores nicotínicos de la membrana postsináptica o bien es destruída por acetilcolinesterasas.

### a) Receptores Postsinápticos

El receptor nicotínico existente en la placa motora es una estructura compuesta por subunidades de varios tipos, de las cuales sólo las subunidades α son reconocidas por acetilcolina, estas subunidades se disponen conformando un canal asociado al receptor (Taylor, 1985).

Cuando la acetilcolina interacciona con el receptor tiene lugar un cambio conformacional que facilita la liberación de calcio de la superficie interna de la membrana. Como consecuencia de la disminución de la función estabilizadora del calcio a nivel de la membrana aumenta el trasiego de sodio y potasio y en menor grado de calcio, produciendose una despolarización (*e.p.p.*) que excita la fibra muscular (Bregestovski et al., 1979).

La acción de acetilcolina sobre los receptores termina antes de que el potencial de acción alcance su valor máximo ya que la duración del efecto de acetilcolina sobre la permeabilidad iónica es ligeramente más larga que la duración de su interacción con los receptores (Bowman y Rand, 1980).

La unión de una molécula de agonista al receptor aumenta la afinidad para otras moléculas de neurotransmisor; en general, se necesitará más de una molécula de acetilcolina unida al receptor para abrir el canal iónico aunque no se excluye la posibilidad de que una sóla molécula de transmisor pueda activar al receptor (Dreyer, 1982).

Tras estudios experimentales con α-bungarotoxina (polipéptido procedente del veneno de algunas serpientes, que se une de forma estable y duradera al receptor nicotínico postsináptico) se han caracterizado algunas propiedades del receptor nicotínico de la placa motora. Se ha sabido que existe un margen de seguridad también a este nivel; si el 45% o menos de los receptores son bloqueados por α-bungarotoxina, la fibra muscular aún tendría una respuesta máxima a la estimulación nerviosa, pero si se bloquean más del 45% de estos receptores se desarrollaría una parálisis (Paton y Waud, 1967; Chang, 1978).

El efecto de acetilcolina sobre la placa motora puede terminar por dos mecanismos : enzimático y no enzimático. El mecanismo enzimático se lleva a cabo por el enzima acetilcolinesterasa localizado en los pliegues sinápticos y cuya acción es inactivar por hidrólisis la acetilcolina ligada al receptor y parte de la que esta libre en el espacio sináptico. El mecanismo no enzimático consiste en una difusión fuera de la placa motora de la acetilcolina restante, lo que se realiza en un breve periodo de tiempo (Bowman y Rand, 1980).

b) Papel del calcio en los procesos postsinápticos

El grado de despolarización de la placa motora depende de la concentración de calcio, pues este ión es capaz de estabilizar la membrana disminuyendo la permeabilidad para otros iones (especialmente sodio) y aumentando el umbral de excitabilidad. Por ello cuando aumenta el calcio extracelular disminuye el grado de despolarización por acetilcolina (Waud y Waud, 1980).

Por otro lado, el proceso de contracción muscular se desarrolla dependiendo del aumento de la concentración intracitoplásmica de calcio, que al inactivar a la troponina y activar una ATPasa produce la energía necesaria para la formación de los puentes de actina-miosina. El aumento de la concentración intracitoplásmica de calcio se debe fundamentalmente a la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, hecho fundamental para el proceso de contracción muscular (Braunwald, 1982).

Por otro lado el influjo de calcio del espacio extracelular, aunque no es suficiente para la activación de proteínas contráctiles, aumenta la concentración de calcio en el reticulo sarcoplásmico (Blinks et al., 1978; Potreau y Raymond, 1978; Nicola-Siri et al., 1980) y además se comporta como activador de la liberación de calcio de este retículo, con lo que la concentración de calcio extracelular influirá indirectamente en el acoplamiento excitación-contracción (Braunwald, 1982; Chiarandini et al., 1980).

## B. BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES

### 1. CONCEPTO Y RECUERDO HISTORICO

Son un grupo de fármacos cuya acción principal consiste en la interrupción de la transmisión nerviosa a nivel de la unión neuromuscular en músculo esquelético y cuyo uso clínico más extendido consiste en conseguir una relajación muscular adecuada durante las intervenciones quirúrgicas.

El primer bloqueante neuromuscular estudiado fue el curare, usado durante siglos por los indios del Amazonas como veneno para producir la muerte por parálisis de los músculos respiratorios.

Fue a partir de 1940 cuando más progresaron las investigaciones sobre el curare, realizándose estudios químicos y farmacológicos para aislar el producto activo y caracterizarlo. Tras ser utilizado en distintas situaciones médicas y psiquiátricas se reconoció su uso primordial en cirugía (Taylor, 1985).

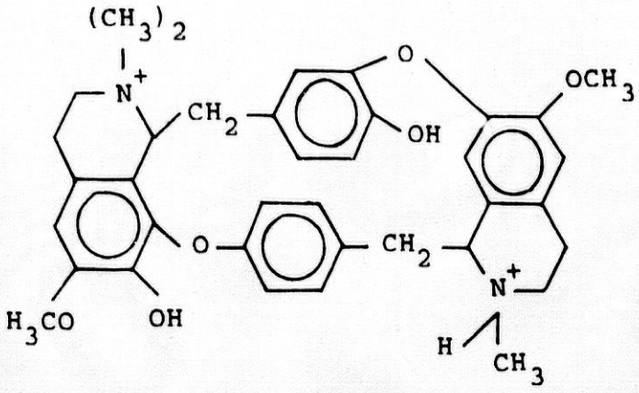
Una vez aislados los principios activos del curare, los alcaloides d-tubocurarina y toxiferonas fueron los primeros bloqueantes neuromusculares utilizados como tales en clínica. A partir de aquí se sintetizaron otros derivados como metocurina. Pancuronio fue sintetizado en 1964 y se demostró que su potencia era unas cinco veces superior a la de d-tubocurarina (Speight y Avery, 1972).

La actividad bloqueante neuromuscular de succinilcolina no se observó en principio, por experimentarse en animales curarizados; fue en 1949 cuando se puso de manifiesto su acción bloqueante (Dorkins, 1982; Lee, 1985). Posteriormente se sintetizaron nuevos fármacos, como decametonio y hexametonio (Taylor, 1985).

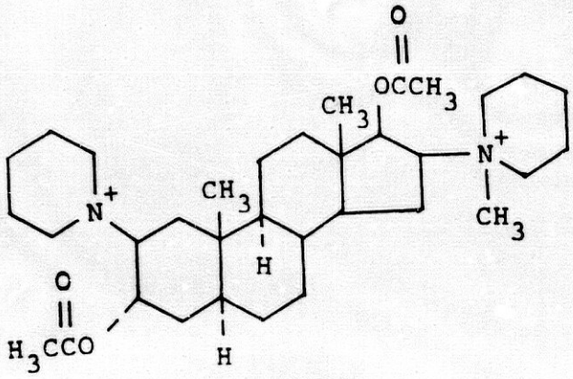
La denominación más usada para este grupo de fármacos es la de "bloqueantes neuromusculares", ya que indica tanto su acción farmacológica como su sitio de acción; también se les ha designado como "relajantes musculares" lo cual sólo hace referencia a su efecto clínico que puede ser compartido por otros agentes que actuando directamente sobre el músculo, no ocasionan un bloqueo neuromuscular; así mismo se les ha llamado "curarizantes" aludiendo a su origen y por compartir las mismas acciones y efectos que el curare (Taylor, 1985).

## 2. ESTRUCTURA QUIMICA Y CLASIFICACION

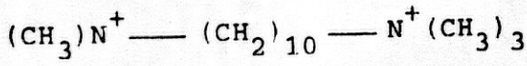
Bovet en 1951 propuso una clasificación de los bloqueantes neuromusculares basada en sus caraterísticas moleculares de volumen y flexibilidad y en las diferencias electrofisiológicas de acción sobre la placa motora (Taylor, 1985), distinguiendo entre bloqueantes competitivos y bloqueantes despolarizantes.



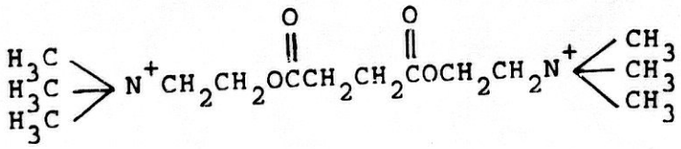
D-TUBOCURARINA



PANCURONIO



DECAMETONIO



SUCCINILCOLINA

Fig. B. Estructura química de los bloqueantes neuromusculares competitivos y despolarizantes

## 2.1. *Bloqueantes competitivos*

También llamados no despolarizantes o curariméticos. Esta denominación se debe a que todos ellos comparten un mismo mecanismo de acción, consistente en un bloqueo de la acción de acetilcolïina por un mecanismo competitivo por los receptores postsinápticos de la placa motora, impidiendo la despolarización de ésta. Se trata de moléculas rígidas y relativamente voluminosas, de ahí su denominación como "paquicurares". Al observar su molécula, se ve que la mayor parte de la masa molecular se reparte entre los grupos amonio cuaternario que poseen o bien entre los sustituyentes de estos grupos (Bowman y Rand, 1980) (fig. B).

En este grupo se incluye: d-tubocurarina, pancuronio, vecuronio, atracurio, metocurina, fazadinio, alcuronio, gallamina y otros recientemente descubiertos (pipecuronio y mivacurio) (Taylor, 1985).

## 2.2. *Bloqueantes despolarizantes*

También conocidos como bloqueantes no competitivos o acetilcolinométicos. Todos ellos comparten su capacidad para provocar una despolarización persistente de la placa motora y la zona de la membrana que la rodea, que tras una fase breve de excitación de la fibra muscular supera el voltaje umbral para la generación de potenciales de acción e imposibilita la aparición de nuevas despolarizaciones.

Son de molécula pequeña y flexible, de ahí su denominación como "leptocurares" (fig. B), con dos grupos metilos por lo menos y un tercer grupo etilo en cada nitrògeno cuaternario; si estos grupos metilo se sustituyen por etilos, disminuye su capacidad despolarizante y es reemplazada por una actividad agonista parcial primero y una actividad bloqueante no despolarizante despues (Bowman y Rand, 1980; Taylor, 1985).

Dentro de este grupo se incluye: decametonio, succinilcolina (suxametonio), suxetonio, oxipentodinio, dioxonio y carbolonio.

### 2.3. *Grupo mixto*

Constituído por una serie de fármacos que comparten carasterísticas de los dos grupos principales de bloqueantes neuromusculares. Este grupo incluye: benzoquinonio. diohexadecano, hexacarbacolina y anetocurario.

## 3. MECANISMO DE ACCION Y EFECTOS FARMACODINAMICOS NEUROMUSCULARES

Claude Bernard a mediados del siglo pasado localizó el sitio de acción del curare a nivel de la unión entre el nervio y el músculo. Posteriormente el lugar de acción celular y el mecanismo de acción de los bloqueantes neuromusculares ha quedado bien definido por las técnicas modernas, incluyendo la aplicación microiontoforética de fàrmacos y el registro eléctrico intracelular (Taylor, 1985).

Así hoy en día se sabe que el lugar exacto sobre el que fundamentalmente actúan los bloqueantes neuromusculares, es la vertiente postsináptica. Sin embargo, se ha observado que estos agentes también son capaces de afectar algunas funciones presinápticas, existiendo diversas opiniones sobre la importancia relativa de estas acciones frente a las postsinápticas, admitiendose no obstante, la importancia al menos cuantitativa de éstas últimas (Auerbach y Betz, 1971).

Para el estudio del mecanismo de acción distinguiremos entre los dos grupos principales de bloqueantes neuromusculares.

### 3.1. *Bloqueantes competitivos*

Se estudiaran tanto sus acciones a nivel postsináptico como presináptico.

#### a) Acciones postsinápticas

Estos fármacos son capaces de combinarse con los receptores colinérgicos nicotinícos de la membrana postsiráptica, antagonizando la acción de acetilcolina, por medio de un mecanismo competitivo. Así, una molécula de d-tubocurarina competirá con una molécula de acetilcolina por un mismo sitio receptor, ya que la unión de una sóla molécula del fármaco al receptor es suficiente para dejarlo en estado no funcional (Bowman y Rand, 1980; Taylor, 1985).

El bloqueo de la respuesta contráctil del músculo esquelético a acetilcolina y a los agonistas nicotínicos producido por d-tubocurarina, pancuronio y compuestos estructuralmente similares podría ser debido a un bloqueo de receptores nicotínicos o de los canales iónicos de la membrana (Bowman y Rand, 1980; Buckett et al., 1968; Durant et al., 1979b). Si d-tubocurarina se aplica directamente sobre la placa motora de una fibra muscular, ésta resulta insensible a la estimulación eléctrica del nervio y a la de acetilcolina, pero mantiene su sensibilidad a los iones potasio, con lo cual se demuestra que la acción de d-tubocurarina es selectiva sobre los receptores de acetilcolina no afectando directamente la sensibilidad de la membrana ni el proceso de contracción muscular (Taylor, 1985).

Se ha comprobado en preparaciones de músculo de gato que para observar la reducción de la respuesta contráctil inducida con estos fármacos se precisa el bloqueo de un gran número de receptores; así, al menos el 80% de los receptores tendrían que ser ocupados, y el 90% de ellos para conseguir un bloqueo completo (Paton y Waud, 1967).

En preparaciones de rata se observó que d-tubocurarina se disocia del receptor con rapidez, lo que demuestra que el equilibrio de ocupación es un equilibrio dinámico, estando influenciado por una serie de factores (liberación espontánea de acetilcolina y estados del receptor con diferente afinidad por élla) (Hull, 1982).

Además, en la velocidad de comienzo y desaparición de los efectos de los bloqueantes neuromusculares influyen varios

factores, relativamente bien definidos para d-tubocurarina, cuya velocidad de actuación es más lenta que la de acetilcolina por su tendencia a fijarse a varios receptores sucesivamente antes de salir de la hendidura sináptica por difusión. También la densidad de receptores de la placa motora y la microcinética del fármaco en la unión neuromuscular juegan un importante papel (Armstrong y Lester, 1979).

A pequeñas concentraciones d-tubocurarina actúa competitivamente con acetilcolina por el sitio de reconocimiento del receptor nicotínico y es capaz de influir sobre el canal iónico asociado al receptor. Así se observa que reduce la frecuencia de apertura del canal, sin afectar la conductancia ni la duración de apertura del mismo (comportamiento correspondiente a un antagonismo competitivo). Sin embargo, a mayores concentraciones el canal es bloqueado de una forma no competitiva (Dreyer, 1982; Taylor, 1985).

Este bloqueo se puede producir tanto si el canal esta en estado abierto como cerrado, por lo que será mayor en todos aquellos casos en los que ocurra mayor número de transiciones de un estado a otro como sucede cuando se utilizan altas frecuencias de estimulación nerviosa. Esta propiedad se conoce con el nombre de uso-dependencia (Shaker et al., 1982; Dreyer, 1982).

b) Acciones presinápticas

Se trata de un punto controvertido, ya que algunos autores lo apoyan (Foldes et al., 1981) y otros lo rebaten (Clark et al., 1983); sin embargo, se ha demostrado tras experimentos "in vivo" en gatos (mediante la colocación de electrodos) que tanto

vecuronio como atracurio tienen acciones presinápticas (Baker et al., 1986), así como pancuronio administrado a dosis bloqueantes (Baker et al., 1988).

Dichas acciones consisten en una disminución de la liberación inducida del neurotransmisor producida por un bloqueo de los receptores nicotínicos de la terminación nerviosa y por tanto, por un bloqueo de los canales iónicos asociados (Bowman et al., 1985; Stanec y Baker, 1984).

El efecto de algunos bloqueantes neuromusculares sobre la liberación inducida de acetilcolina es bifásico, así a concentraciones no paralizantes (bajas) aumentan la liberación y la disminuyen a concentraciones paralizantes.

Concentraciones no paralizantes de d-tubocurarina aumentan el contenido cuántico del primer *e.p.p.* de un tren de impulsos, lo que se explica porque sus grupos fenólicos hidroxilados aumentan la liberación de acetilcolina, facilitando la entrada de calcio o potenciando sus acciones intracelulares. Metocurina no produce este efecto (los grupos fenólicos hidroxilados han sido enmascarados por metilación). Sin embargo, éste no es el único ni el más importante de los requirimientos estructurales para ejercer efectos presinápticos, ya que benzoquinonio que no posee grupos fenólicos tiene un efecto sobre la replección y el tamaño del depósito de acetilcolina disponible mayor que el de d-tubocurarina, lo que apoya la idea que benzoquinonio tiene una mayor acción presináptica que aquélla (Blaber, 1973).

A concentraciones paralizantes d-tubocurarina disminuye la liberación inducida de acetilcolina, al parecer al disminuir el almacén disponible de acetilcolina. Esto contrarresta el aumento de la liberación que se observa con concentraciones bajas y es, junto con las accicnes en los canales asociados al receptor postsináptico, responsable del aumento de la potencia de d-tubocurarina conforme aumenta la frecuencia de estimulación (Gergis et al., 1971; Galindo, 1972; Blaber, 1973).

Pancuronio, de estructura esteroidea, a bajas concentraciones produce un aumento de la liberación espontánea de acetilcolina sin afectar la liberación evocada (Gergis et al., 1972). A concentraciones paralizantes pancuronio y gallamina provocan una inhibición de la liberación inducida de acetilcolina (Gergis et al., 1971; Gergis et al., 1972; Galindo, 1972), es decir se comportan igual que d-tubocurarina.

Por otro lado se ha propuesto, tras experimentos en preparaciones de músculo esquelético, que con frecuencias altas de estimulación se ponen de manifiesto más facilmente las posibles acciones presinápticas de los bloqueantes neuromusculares. Así cuando se utilizan frecuencias de estimulación elevadas, d-tubocurarina produce una mayor disminución de la amplitud de los *e.p.p.s.* (Bowman et al., 1985) y su bloqueo es revertido en menor medida por inhibidores de colinesterasas y 4-aminopiridinas que cuando se utilizaron frecuencias de estimulación menores (Foldes et al., 1981). En apoyo de esta idea, en pacientes anestesiados se ha encontrado una disminución progresiva en las respuestas electromiográficas a trenes de cuatro impulsos (Williams et al., 1980).

En preparaciones "in vitro" tratadas con d-tubocurarina, el mantenimiento de la contracción muscular y la amplitud de los *e.p.p.s.* decaen progresivamente durante una estimulación tetánica breve (Day et al., 1983). Pancuronio en cambio, afecta sobre todo a la tensión máxima de una tetanización y no al mantenimiento de la misma (Stanec y Baker, 1984). Sin embargo, ésto varía según los distintos tipos de fibras musculares (fibras de contracción rápida o lenta) (Choi et al., 1984a).

De estos resultados surgió la hipótesis de que la inhibición de la movilización a través de receptores colinérgicos presinápticos sería responsable del desvanecimiento tetánico ("fade") y de la progresiva disminución de los trenes de cuatro (Bowman et al., 1985), mientras que la depresión tetánica máxima se produciría por una acción sobre los receptores colinérgicos postsinápticos, proponiendose que los bloqueantes neuromusculares tienen afinidad, diferente para cada uno de ellos, por ambos sitios de acción.

Sin embargo, el desvanecimiento tetánico también se podría explicar por un bloqueo mantenido de los canales, especialmente en el caso de d-tubocurarina, dado el largo tiempo de "destaponamiento" que precisa. Esto disminuiría el número de receptores que pueden ser activados y por tanto la amplitud de los *e.p.p.s.*. Además, así se podrían explicar las diferencias de efecto entre pancuronio y d-tubocurarina sobre la contracción simple y la tetánica, sin recurrir a una acción presináptica (Dreyer, 1982).

### 3.2. *Bloqueantes despolarizantes*

Succinilcolina y decametonio también se unen a los receptores nicotínicos postsinápticos, pero en vez de bloquearlos inicialmente despolarizan la membrana por apertura de los canales asociados al receptor de igual manera que hace acetilcolina; además, persisten en la unión neuromuscular por lo que la despolarización dura mucho tiempo, dando lugar a un periodo de excitación repetitiva que se manifiesta por fasciculaciones transitorias, seguido de un bloqueo neuromuscular. Esta secuencia de excitación-depresión varía de unas especies animales a otras y también entre los distintos músculos dentro de una misma especie (Taylor, 1985).

Los fenómenos eléctricos que acontecen en la membrana plasmática varían dependiendo del bloqueante utilizado y/o tipo de especie animal. Así, en el músculo gracilis del gato se ha comprobado que decametonio produce una despolarización inmediata y persistente de la placa motora y la zona de la membrana que la rodea (Volle y Henderson, 1975), mientras que en diafragma de rata se observó una recuperación espontánea de la despolarización inducida con los agentes despolarizantes (Creese y Mitchell, 1981).

En los músculos de contracción rápida del gato "in vivo" y en humanos, la fase inicial de la actuación de los bloqueantes despolarizantes corresponde a un agonismo parcial. Sin embargo, el mecanismo de acción de este tipo de bloqueantes resultó ser más complejo cuando se observó en otras preparaciones, que tras la fase inicial despolarizante este bloqueo podía tener características de bloqueo no despolarizante (Durant y Katz, 1982).

Para describir los dos tipos de efectos observados con succinilcolina, Jenden (1954) utilizó los términos de bloqueo de fase I y bloqueo de fase II y éste último correspondería con el llamado bloqueo "dual" (comparte carasterísticas de bloqueo despolarizante y de bloqueo competitivo).

La fase de bloqueo dual varía de unas especies animales a otras y de unos músculos a otros dentro de la misma especie. Así succinilcolina y decametonio en el hombre y en los músculos de contracción rápida del gatc producen un bloqueo despolarizante puro, mientras que en los músculos de contracción lenta del gato y en músculos de otros mamíferos, inducen un bloqueo dual (Bowman y Rand, 1980; Choi et al., 1984b). Además, el modo de acción de succinilcolina depende de la duración de la administración apareciendo el bloquec de fase II tras inyecciones repetidas o tras infusión continua (Lee, 1985).

En 1975, Lee aplicó la estimulación "tren de cuatro" para el estudio de estos dos tipos de bloqueo, pues permitía obtener determinaciones repetidas sin alterar la imagen del bloqueo, sustituyendo así a la estimulación tetánica. Algunos autores analizan la razón entre el cuarto y el primer componente de este tipo de estimulación ($T_4/T_1$); si esta razón es superior a 0.7 se habla de bloqueo de fase I y se dirá bloqueo de fase II cuando esta razón sea inferior a 0.3 (Kienlen, 1984). Otros autores valoran la desaparición de las respuestas a cada uno de los estímulos que componen el tren de cuatro; así el bloqueo no despolarizante se caracteriza por la desaparición del componente $T_4$ cuando $T_1$ llega al 75% de bloqueo y cuando $T_1$ alcanza el 90% de

bloqueo, los componentes $T_4$, $T_3$ y $T_2$ no se observan. Por el contrario, en el bloqueo despolarizante se mantienen todas las respuestas al tren de estímulos, incluso cuando se alcanzan altos grados de bloqueo (Ali, 1985).

En preparaciones "in vitro" de músculo esquelético, se ha comprobado como algunos agentes despolarizantes producen una despolarización fugaz, tras la cual, la placa motora se repolariza rapidamente. Sin embargo, el bloqueo que comienza durante la despolarización se mantiene aún despues de la repolarización (Durant y Katz, 1982).

Esto podría reflejar la desensibilización del receptor colinérgico en presencia de un agonista que llevaría al receptor de un estado activo funcional a uno inactivo (Bowman y Rand, 1980; Durant y Katz, 1982). Este tipo de bloqueo podría corresponder con la fase II "in vivo", aunque es difícil determinar si ocurre en este tipo de preparaciones algún grado de desensibilización de receptores (Taylor, 1985).

La desensibilización podría ser producida por el desequilibrio iónico a través de la membrana, causado por la despolarización prolongada (Bowman y Rand, 1980). Además, el proceso de desensibilización es inherente a los receptores nicotínicos, pues durante el bloqueo por desensibilización la membrana de la fibra muscular puede ser despolarizada por otros medios (ej: aumentando los niveles de potasio) (Bowman y Rand, 1980).

Se ha observado una desensibilización cruzada a todos los agonistas nicotínicos; además los receptores se recuperan de forma lenta al retirar los agonistas o los bloqueantes despolarizantes (Dreyer, 1982).

En preparaciones de músculo aislado, la velocidad y el grado de desensibilización del receptor inducidos por un bloqueante despolarizante pueden ser modificados por varios fármacos. Los anestésicos inhalatorios (éter y halotano) y el hexafluorenio (inhibidor de la acetilcolinesterasa plasmática) aumentan la velocidad de instauración de la desensibilización, así como el SKF-525 A. Por el contrario, catecolaminas, estimulantes α-adrenérgicos y nistatina, disminuyen el grado de desensibilización (Bowman y Rand, 1980; Volle y Henderson, 1975).

El mecanismo de acción de succinilcolina no parece depender exclusivamente de acciones postsinápticas sino que más bien es mixto estando implicados efectos pre y postsinápticos. Primero tiene lugar una despolarización de la placa motora por un efecto directo acetilcolinométicо y liberación masiva de acetilcolina por medio de la estimulación de los receptores presinápticos, lo que lleva a un bloqueo de fase I. Posteriormente se establece un bloqueo no despolarizante o de fase II, en el que junto a desensibilización de receptores postsinápticos, probablemente tenga lugar un bloqueo de receptores presinápticos colinérgicos, que impediría la liberación de acetilcolina (Kienlen, 1984).

### 3.3. *Carasterísticas del bloqueo*

Resumiendo lo anterior, se pueden esquematizar las carasterísticas de los tipos de bloqueo que producen los bloqueantes neuromusculares.

a) Bloqueo competitivo

Es propio de los bloqueantes neuromusculares competitivos, siendo d-tubocurarina el fármaco representativo. También se produce en la fase II del bloqueo despolarizante. Sus rasgos caraterísticos son los siguientes:

- No va precedido de fasciculaciones, pues estos fármacos no tienen efecto estimulante sobre la placa motora
- Producen "desvanecimiento tetánico", es decir, no se mantiene la meseta de la contracción tetánica, sino que decae progresivamente
- Causan facilitación post-tetánica de la contracción
- Existe reversión del bloqueo tras añadir cloruro potásico al medio
- El pretratamiento con d-tubocurarina provoca un efecto aditivo; mientras que el tratamiento previo con decametonio no tiene efecto o revierte la parálisis
- Los agentes anticolinesterasa y los fármacos que a nivel presináptico aumentan la liberación de acetilcolina (adrenalina, tetraetilamonio, guanidina y 4-aminopidirina) revierten el bloqueo
- La hipotermia acorta el bloqueo
- A nivel de la placa motora, la corriente catódica disminuye el bloqueo, la corriente anódica, lo aumenta
- Adquieren propiedades de agonista parcial sobre el músculo denervado, produciendo una fibrilación transitoria (Bowman y Rand, 1980; Taylor, 1985).

b) Bloqueo despolarizante

Las caraterísticas del bloqueo inducido por decametonio en músculos de contracción rápida del gato y en músculos humanos son:

- Va precedido de fasciculaciones y aumento de las contracciones simples estimuladas indirectamente
- No hay desvanecimiento tetánico, pues durante la estimulación tetánica indirecta de un músculo parcialmente bloqueado, la contracción se mantiene, aunque algo deprimida
- No se produce facilitación post-tetánica de la contracción
- No se altera el bloqueo al añadir cloruro potásico al medio
- El pretratamiento con d-tubocurarina tiene un efecto antagonista; el tratamiento previo con decametonio causa taquifilaxia, sin efecto acumulativo
- Los agentes anticolinesterasa pueden aumentar la profundidad del bloqueo, pero no tienen efecto antagonista
- La hipotermia prolonga el bloqueo
- La corriente catódica a nivel de la placa motora aumenta el bloqueo, la corriente anódica lo disminuye
- Produce una contractura en el músculo denervado (Bowman y Rand, 1980; Taylor, 1985).

## 4. EFECTOS FARMACODINAMICOS NO NEUROMUSCULARES

Los bloqueantes neuromusculares no sólo ejercen efectos a nivel de la placa motora sino que también producen

efectos no neuromusculares los cuales, al menos en parte, podrían ser explicados por las carasterísticas moleculares de estos fármacos:

- Son bases orgánicas, lo que daría lugar a una serie de efectos inespecíficos, entre ellos la liberación de histamina
- Quimicamente son parecidos a la acetilcolina, por lo que pueden interaccionar con los receptores colinérgicos, bien compitiendo con la acetilcolina, bien imitando sus efectos a varios niveles en los que existan receptores colinérgicos (Bowman, 1982).

Para facilitar el estudio de las acciones más importantes de los bloqueantes neuromusculares, las analizaremos a varios niveles: liberación de histamina, sistema nervioso vegetativo y sistema cardiovascular.

### 4.1. *Efectos en la liberación de histamina*

D-tubocurarina es el bloqueante neuromuscular con mayor capacidad de liberar histamina, posiblemente debido a sus grupos hidroxilo libres (Savarese, 1979). Dosis de 0.25-0.75 mg/kg en pacientes anestesiados elevan la concentración plasmática de histamina, de una forma dosis-dependiente, (Moss et al., 1981), pudiéndose observar algunos signos típicos de la liberación de histamina: hipotensión, taquicardia, reacciones asmáticas, prurito, urticaria y eritema en cara, tronco y punto de la inyección (Bowman, 1982).

Metocurina, tiene un efecto liberador de histamina menor que d-tubocurarina, pues sus grupos hidroxilo han sido

metilados (Savarese, 1979).

Pancuronio y succinilcolina, son extremadamente débiles en cuanto a este efecto aunque en algunos experimentos con animales se han observado signos de liberación de histamina. Igualmente, a las dosis habituales, vecuronio y gallamina presentan una ligera capacidad en este sentido (Scott y Savarese, 1985).

Atracurio, en pacientes anestesiados con dosis altas provoca una liberación de histamina con las consiguientes alteraciones hemodinámicas. A dosis equipotentes, la capacidad de atracurio para liberar histamina es la mitad de la de metocurina y la tercera parte de la de d-tubocurarina (Basta et al., 1983).

Tras administración intradérmica, el orden de potencia de los bloqueantes neuromusculares para producir reacciones cutáneas por liberación de histamina es: d-tubocurarina > metocurina > pancuronio > vecuronio (Bowman, 1982; Ertama, 1982).

Desde el punto de vista de la práctica anestésica tan sólo d-tubocurarina debe ser usada con precaución por esta razón, aunque las reacciones graves por liberación de histamina sean raras (Bowman, 1982).

### 4.2. *Efectos sobre el sistema nervioso vegetativo*

Las dosis de bloqueantes neuromusculares que producen efectos a este nivel son distintas de las que inducen bloqueo neuromuscular; la diferencia entre ambas dosis ha sido llamada "margen de seguridad autonómico" y se puede valorar en cuanto al efecto bloqueante ganglionar o en cuanto al efecto vagal atropínico

(Savarese, 1979). No obstante, la extrapolación de estos valores a la situación clínica es difícil pues la mayoría de los experimentos sobre este efecto han sido realizados en animales y preparaciones aisladas.

Los bloqueantes neuromusculares actúan sobre el sistema nervioso vegetativo por varios mecanismos: interacción con receptores nicotínicos, interacción con receptores muscarínicos, efectos adrenérgicos y efectos anticolinesterasa.

a) Interacción con receptores nicotínicos ganglionares

Los bloqueantes no despolarizantes que compiten con los receptores nicotínicos a nivel de la placa motora también pueden hacerlo con los receptores nicotínicos ganglionares.

Así d-tubocurarina bloquea fuertemente los receptores ganglionares, por lo que tiene un margen de seguridad autonómico pequeño. Además, su efecto bloqueante es ligeramente mayor sobre los ganglios parasimpáticos que sobre los simpáticos (Hughes y Chapple, 1976a).

Por otro lado, los compuestos bicuaternarios no poseen una gran capacidad bloqueante ganglionar en comparación con los monocuaternarios (d-tubocurarina), por ello metocurina (compuesto bicuaternario), aunque es muy parecida a d-tubocurarina, produce un bloqueo ganglionar débil (Hughes y Chapple, 1976b). A dosis equirrelajantes metocurina es tres veces menos potente como bloqueante ganglionar que d-tubocurarina.

Fazadinio presenta alguna actividad bloqueante

ganglionar en animales aunque sólo a altas dosis causa hipotensión en humanos (Birmingham y Hussain, 1980; Marshall, 1973; Hughes y Chapple, 1976a).

En experimentos "in vitro" con cobayas, se estudió el cociente entre las $DE_{50}$ del bloqueo ganglionar y del bloqueo neuromuscular y se obtuvo el siguiente orden: fazadinio > d-tubocurarina > alcuronio > gallamina > pancuronio (Birmingham y Hussain, 1980).

Los bloqueantes despolarizantes estimulan los receptores nicotínicos ganglionares de una forma débil y poco importante. La acción estimulante de succinilcolina se debe a su semejanza con acetilcolina (dos moléculas de acetilcolina unidas por grupos acetato metilados). Decametonio tiene unas propiedades autonómicas más débiles (Bowman, 1982; Scott y Savarese, 1985).

b) Interacción con receptores muscarínicos

Los bloqueantes neuromusculares no despolarizantes también son capaces de bloquear los receptores muscarínicos. De hecho, gallamina (compuesto tricuaternario) tiene una gran actividad vagolítica, lo que se comprobó tras experimentos en gatos, donde bloquea los receptores muscarínicos del corazón y por tanto los efectos cardíacos mediados por el vago y los inducidos por metacolina (Hughes y Chapple, 1976a). Además, tras experimentos "in vitro" se ha demostrado que presenta una gran afinidad por receptores muscarínicos de ileon de cobayas (Chaudry et al., 1988).

Pancuronio, a dosis mínimas relajantes, antagoniza la bradicardia vagal y la inducida por metacolina, pero no tiene

efecto sobre la vasodepresión provocada por esta sustancia (Hughes y Chapple, 1976a)

Dosis cercanas a las bloqueantes de fazadinio y alcuronio también bloquean los receptores muscarínicos (Marshall, 1973; Hughes y Chapple, 1976a). Por el contrario, d-tubocurarina, metocurina, vecuronio y atracurio precisan para bloquear estos receptores dosis muy superiores a las relajantes (Hughes y Chapple, 1976b; Durant et al., 1979b; Savarese, 1979).

Los bloqueantes neuromusculares también actúan sobre los receptores muscarínicos existentes en las terminaciones nerviosas simpáticas. Así, pancuronio, gallamina y vecuronio bloquean estos receptores aunque éste último lo haga en mucho menor grado que los primeros (Vercruysse et al., 1979; Marshall et al., 1980).

Pancuronio y gallamina son capaces también de bloquear los receptores muscarínicos localizados en las interneuronas dopaminérgicas de los ganglios simpáticos y así se facilita la transmisión ganglionar por inactivación de la influencia inhibitoria de dopamina (Gardier et al., 1978).

A semejanza de lo que ocurre con los agentes no despolarizantes, los bloqueantes despolarizantes pueden ejercer acciones a nivel de receptores colinérgicos no localizados en la placa motora. Así, la ligera hipotensión arterial que se observa a veces con succinilcolina parece ser debida a una estimulación de receptores muscarínicos arteriales (Taylor, 1985).

c) Efectos adrenérgicos

Estos efectos se han demostrado fundamentalmente con pancuronio, aunque otros bloqueantes neuromusculares también los ejercen. Se han propuesto dos tipos de efectos simpaticomiméticos para pancuronio: directo e indirecto.

El efecto directo se demostró tras experimentos con ratas, en las que dosis bajas de pancuronio (1 mg/kg) causaron una taquicardia que pudo ser bloqueada por propanolol pero no por 6-hidroxidopamina lo cual sugería que ejercía una acción directa sobre los receptores β-adrenérgicos (Docherty y McGrath, 1978).

El efecto simpaticomimético indirecto se observó en perros anestesiados, donde dosis de 0.2 mg/kg de pancuronio provocaron una hipertensión con rápida taquifilaxia que se restauró mediante infusión de noradrenalina (Segarra et al., 1976). Además en auriculas de cobayas y gatos se ha observado una liberación de noradrenalina inducida por gallamina y pancuronio, aunque este último fue menos potente para producir este efecto (Marshall y Ojewole 1979).

Además, se ha demostrado que pancuronio, fazadinio y vecuronio bloquean la recaptación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas simpáticas del músculo cardiaco y músculo liso de ratas y cobayas; aunque el efecto de vecuronio fue menor que el observado con pancuronio (Ivankovich et al., 1975; Tomlinson, 1979; Salt et al., 1980; Marshall et al., 1980).

d) Efecto anticolinesterasa

Son varios los bloqueantes neuromusculares con efecto anticolinesterasa. Benzoquinonio es capaz de ejercer este efecto a dosis normales por lo que puede causar efectos vegetativos colaterales e interferir con neostigmina y piridostigmina (Bowman, 1982). Sin embargo se requieren dosis muy altas de pancuronio para inhibir la acetilcolinesterasa. No obstante, este bloqueante neuromuscular a las dosis relajantes habituales inhibe la actividad de la butirilcolinesterasa plasmática (Bowman, 1982).

Vecuronio también inhibe la colinesterasa plasmática, aunque en menor grado que pancuronio (Bowman, 1982).

## 4.4. *Efectos sobre el sistema cardiovascular*

D-tubocurarina y gallamina causan una hipotensión severa debida a vasodilatación periférica (por la liberación de histamina y el bloqueo ganglionar) y disminución del retorno venoso (por pérdida del tono muscular) (Taylor, 1985).

Pancuronio es el único bloqueante neuromuscular que causa hipertensión (por estimulación ganglionar) y taquicardia (por estimulación de receptores β-adrenérgicos). Atracurio y vecuronio no tienen efectos sobre la presión arterial ni sobre la frecuencia cardíaca (Taylor, 1985; Miller, 1985).

## 5. FARMACOCINETICA

Para su estudio mantendremos la distinción entre los dos grupos principales de bloqueantes neuromusculares: competitivos y despolarizantes.

### 5.1. *Bloqueantes competitivos*

#### Métodos analíticos

Se ha introducido la cromatografía líquida de alta presión para la determinación de bloqueantes competitivos en plasma. Este método es específico, puesto que permite distinguir el producto activo de sus metabolitos y se ha desarrollado especialmente para detectar niveles de d-tubocurarina y atracurio (DeBros y Gissen, 1979; Miller, 1985). El método de espectrometría de masas, que se ha desarrollado posteriormente para detectar niveles plasmáticos de pancuronio y vecuronio, es también específico pero más sensible que el anterior (Miller, 1982).

#### Absorción

Los bloqueantes neuromusculares no despolarizantes no son bien absorbidos por el estómago e intestino tras administración oral, aunque muchos de éllos pueden ser absorbidos por la mucosa bucal tras administración sublingual. En general se puede decir que estos fármacos son de 2-5 veces menos efectivos por vía subcutánea

o intradérmica que por vía intravenosa, por lo que ésta última es la vía de elección (Bowman y Rand, 1980).

Distribución y unión a proteínas

El pico de concentración plasmática de d-tubocurarina se observa en 1.5 minutos tras inyección intravenosa.

El fármaco es distribuído y redistribuído entre varios tejidos hasta que la concentración en estos se equilibra con la concentración plasmática, lo cual depende de una serie de factores (perfusión de los tejidos e ionización y solubilidad del fármaco) (Hennis y Stanski, 1985).

Pancuronio, gallamina y metocurina tienen una vida media de distribución de 2-10 minutos y un volumen de distribución inicial de 30-140 ml/kg, mientras que el volumen de distribución en el estado de equilibrio es de 200-450 ml/kg (Miller, 1985; Hennis y Stanski, 1985).

Una vez distribuídos a través de los fluidos extracelulares se unen a las proteínas plasmáticas; así un 30-50% de d-tubocurarina se une a albúmina y gamma-globulinas (Meijer et al., 1979) y un 87% de pancuronio aparece unido a gamma-globulinas y albúmina, siendo sólo un 13% la fracción libre y por tanto activa (Thompsom, 1976).

En pacientes con lesión hepática y renal no se presentaron alteraciones de la unión a proteínas plasmáticas para tubocurarina (Miller, 1982).

El comienzo del bloqueo neuromuscular corresponde con el primer paso del fármaco por el músculo, indicando su afinidad

por los receptores de la placa motora. Algunas moléculas de estos bloqueantes no despolarizantes se unen a los mucopolisacáridos en la hendidura sináptica, representando el llamado receptor no específico. Dosis repetidas incluso varias horas despues de la primera producen un bloqueo más pronunciado ya que los receptores no específicos permanecen parcialmente ocupados y el fármaco entonces actúa sobre los receptores colinérgicos (Bowman y Rand, 1980).

Metabolismo

El grado de metabolización entre los bloqueantes competitivos es variable. Gallamina apenas es metabolizada; en cambio, la mayor parte de una dosis de pancuronio se metaboliza en el hígado, sufriendo una hidrólisis de sus dos grupos ester (Bowman y Rand, 1980).

Vecuronio sufre una desacetilación en el hígado obteniendose tres hidroxi-metabolitos (Bencini et al., 1988).

Atracurio sufre una hidrólisis por esterasas inespecíficas y una degradacion no enzimática tipo "Hoffman" o sea dependiente de pH (al aumentar éste la degradación es más rápida); así, se ha demostrado "in vivo" que la parálisis por atracurio es menor cuando el pH arterial aumenta por alcalosis respiratoria o metabólica (Hudges y Capple, 1981). En conjunto se metaboliza el 100% del fármaco (Reilly y Nimmo, 1987).

Eliminación

Sus principales vías de eliminación son biliar y renal pero en comparación con otros fármacos utilizados en anestesia los mecanismos de eliminación hepática y renal de los bloqueantes competitivos son relativamente ineficaces, siendo su aclaramiento de 2-5 ml/kg/min (Hennis y Stanski, 1985).

Tras experimentos en gatos se observó que la vía renal y biliar contribuyen en igual medida a la eliminación de pancuronio. Sin embargo, en el hombre la excreción por orina es la principal, pues en bilis sólo aparece un 7% de producto no metabolizado (Durant et al., 1979a; Bencini et al., 1988).

Entre un 60-70% de d-tubocurarina y un 50% de alcuronio se excretan por orina dentro de las 3-6 horas tras su inyección intravenosa; el 65% de gallamina aparece en orina como producto no metabolizado (Bowman y Rand, 1980).

El 40% de una dosis de vecuronio se elimina por la bilis como producto sin metabolizar y sólo un 30% por vía renal como hidroxi-metabolitos (Bencini et al., 1988). Además el aclaramiento de vecuronio (5.2 ± 0.7 ml/kg/min) es más rápido y su vida media de eliminación (71 ± 20 minutos) más corta que los de pancuronio (1.8 ± 0.4 ml/kg/min; 140 ± 25 minutos) (Miller, 1985).

Tanto la vía renal como la biliar no juegan un importante papel en la eliminacion de atracurio, pues tras experimentos "in vivo" se ha comprobado que no aparece producto sin metabolizar en orina o bilis (Hughes y Chapple, 1981).

## 5.2. *Bloqueantes despolarizantes*

### Métodos Analíticos

Succinilcolina ha sido identificada en los líquidos orgánicos utilizando técnicas de cromatografía de gases con espectrómetro de masas, detectándose incluso concentraciones bajas (Nordgren et al., 1983).

### Administración y Absorción

La única forma de administración posible de succinilcolina es por vía intravenosa.

Cuando se administra en forma de bolos el comienzo de acción es rápido y la duración del efecto sumamente breve debido a la rápida hidrólisis que sufre por la butirilcolinesterasa del hígado y el plasma (Taylor, 1985). A veces aparece bloqueo de fase II tras la administración de un bolo único aunque es más probable que tanto este fenómeno como el de taquifilaxia se manifieste tras el uso repetido de bolos (Durant y Katz, 1982; Sugai et al., 1975).

Succinilcolina ha sido administrada también en infusión continua, considerada por algunos autores como "mal uso" ya que existen otros bloqueantes no despolarizantes cuyos efectos son predecibles a diferencia de los de succinilcolina. Por ello esta forma de administración sólo tendría valor para aquellos casos que requieran periodos de relajación relativamente cortos (Katz y Katz, 1975; Durant y Katz, 1982).

A pesar de ello, recientemente se ha sugerido la utilización de una dosis en bolos para determinar la velocidad de infusión que se precisa para conseguir un bloqueo del 89-99%, pues se ha establecido una relación entre el tiempo de comienzo de la recuperación tras administración de un bolo y la velocidad de infusión (Woelfel et al., 1988).

Se ha hablado de que con una velocidad de infusión de 2-15 mg/kg/h se consigue un bloqueo del 90% con carasterísticas de un bloqueo de fase II (Katz y Ryan, 1969). Una vez alcanzada esta fase, para mantener el nivel de bloqueo no se precisa cambiar la velocidad de infusión (Ramsey et al., 1980), a pesar de tener una recuperación más lenta que el bloqueo de fase I.

## Distribución

Tras inyección intravenosa, succinilcolina sufre una distribución inicial rápida a través del líquido extracelular hacia la masa muscular y unión neuromuscular (Cook et al., 1976). El volumen de distribución de succinilcolina varía con la edad, dadas las diferencias de volumen de los líquidos extracelulares (Wingard, y Cook, 1977).

## Metabolismo

Tras experimentos "in vitro" se ha demostrado que succinilcolina es rapidamente hidrolizada por colinesterasas plasmáticas (hasta un 80% es metabolizada antes de que acceda a la unión neuromuscular). El producto resultante de esta reacción de

hidrólisis es succinilmonocolina; una pequeña parte de este metabolito sufre una segunda hidrólisis, más lenta que la anterior, a ácido succínico y colina (Wingard y Cook, 1977; Doenicke, 1968; Cook et al., 1976).

La forma activa de succinilcolina permanece en la sangre sólo durante 3 minutos (Holst-Larson, 1976).

Eliminación

La principal vía de eliminación es renal pero sólo una pequeña proporción de succinilcolina es excretada en la orina como compuesto activo (Doenicke, 1968).

La vida media de eliminación es de 2-4 minutos, variando para niños o adultos. Estas diferencias se explican por varios factores: diferencias en la actividad de colinesterasa plasmática, distinto tamaño de la masa muscular y diferencias en el volumen extracelular (Cook et al., 1976; Wingard y Cook, 1977).

## 6. INTERACCIONES FARMACOLOGICAS

Los bloqueantes neuromusculares pueden interaccionar con varios fármacos que ejercen sus efectos a distintos niveles de la unión neuromuscular, es decir en la terminación nerviosa, hendidura sináptica, membrana postsináptica y/o fibra muscular (Viby-Mogensen, 1985).

A nivel de la terminación nerviosa tienen lugar las interacciones con anestésicos locales (interfiriendo la propagación

del potencial de acción), carbonato de litio (inhibiendo la síntesis de acetilcolina), antibióticos aminoglucósidos (inhibiendo la liberación del neurotransmisor) y aminopiridinas (favoreciendo la liberación del neurotransmisor). Sobre la hendidura sináptica interaccionan con todos aquellos fármacos con actividad anticolinesterasa, a través de la interferencia con la hidrólisis enzimática de acetilcolina.

A nivel de la membrana postsináptica tienen lugar las interacciones con algunos antibióticos (tobramicina, lincomicina y clindamicina), anestésicos inhalatorios, lidocaína y procainamida (disminuyendo la conductancia de los canales de la placa motora y reduciendo su tiempo de apertura).

Por último, en la propia fibra muscular se desarrollan las interacciones con dantroleno, el cual bloquea el acoplamiento entre excitación y contracción muscular.

También se puede sistematizar el estudio de las interacciones entre bloqueantes neuromusculares y otros fármacos clasificándolas según que el efecto resultante sea un aumento de la relajación neuromuscular o el inverso, es decir, una disminucuón del bloqueo neuromuscular. Siguiendo esta clasificación se describiran las diferentes interacciones. Más adelante se estudiaran las interacciones de los bloqueantes neuromusculares entre sí.

## 6.1. *Fármacos que aumentan el efecto de los bloqueantes neuromusculares*

Incluimos aquí las interacciones con anestésicos generales (inhalatorios e intravenosos), anestésicos locales, antibióticos (aminoglucósidos, polipéptidos y otros) y fármacos diversos.

### a) Interacciones con anestésicos generales

Los anestésicos inhalatorios (éter, halotano, metoxifluorano, enfluorano, fluoroxeno e isofluorano) deprimen la transmisión neuromuscular y al interaccionar con los bloqueantes competitivos aumentan su efecto con el siguiente orden de potencia: éter, enfluorano, metoxifluorano e isofluorano > halotano > fluoroxeno y ciclopropano (Taylor, 1985; Viby-Mogensen, 1985).

La asociación de isofluorano y oxido nitroso también aumenta el bloqueo producido por vecuronio o mivacurio prolongando en este último caso el tiempo de recuperación (Quill et al., 1988; Weber et al., 1988).

Igualmente el efecto sinérgico de los bloqueantes neuromusculares pancuronio y metocurina es potenciado por los anestésicos inhalatorios halotano e isofluorano (Bennet y Hahn, 1985).

Por otro lado, la interacción de succinilcolina con halotano, isofluorano y enfluorano facilita la aparición de bloqueo de fase II y taquifilaxia (Donati y Bevan, 1983).

Los anestésicos intravenosos (etomidato, fentanil y gamma-hidroxibutirato) potencian ligeramente el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio (Krieg et al., 1980). El anestésico intramuscular ketamina potencia el efecto de los bloqueantes competitivos en el siguiente orden: vecuronio > atracurio > d-tubocurarina > pancuronio (Tsai y Lee, 1989).

Tras experimentos "in vitro" se observó como algunos anestésicos intravenosos y coadyuvantes de la anestesia (diazepam, etomidato, droperidol, fentanil, metohexital, midazolam, morfina, petidina, tiopental y otros) aumentaban la liberación inducida de acetilcolina disminuyendo sin embargo, la sensibilidad de la membrana postsináptica (Viby-Mogensen, 1985). Esto podría explicar que diazepan y oxazepan tengan efectos bifásicos en el bloqueo neuromuscular producido por pancuronio (bajas concentraciones lo disminuyen y altas concentraciones lo potencian) (Driessen et al., 1984).

b) Interacciones con anestésicos locales

Los anestésicos locales, cuyo mecanismo de acción consiste en un bloqueo de los canales de sodio, al interaccionar con los bloqueantes competitivos potencian la parálisis muscular producida por éstos (Viby-Mogensen, 1985). Así, por ejemplo, lidocaina aumentó el bloqueo neuromuscular inducido tras una infusión continua de pancuronio (Carpenter y Mulroy, 1986).

Tras experimentos "in vivo" con ratas, se observó que dosis inferiores a las bloqueantes de lidocaína aumentaban el bloqueo producido por d-tubocurarina así como el inducido con

infusión continua de succinilcolina, favoreciendo además en este último caso la aparición de bloqueo de fase II. Igualmente se observó que d-tubocurarina y succinilcolina administradas en infusión continua también potenciaban el bloqueo neuromuscular producido por lidocaína (Morita et al., 1979; Viby-Mogensen, 1985).

c) Interacciones con antibióticos

Los antibióticos aminoglucósidos pueden producir bloqueo neuromuscular, tanto "in vitro" como en clínica humana. El principal sitio de acción se localiza a nivel presináptico, donde producen una disminución de la liberación del neurotransmisor (Vital Brazil y Prado-Fraceschi, 1969). También ejercen en menor medida, efectos postsinápticos, disminuyendo la sensibilidad de los mismos a acetilcolina (Fiekers, 1983).

En preparaciones frénico-hemidiafragma de rata, se observó que dosis de neomicina, que no afectaban la contracción por ellas mismas, potenciaban el efecto bloqueante producido por pancuronio y vecuronio. Así mismo se demostró "in vivo" que el efecto de vecuronio era potenciado por neomicina y gentamicina (Krieg et al., 1980). En clínica se ha observado una prolongación del bloqueo neuromuscular producido por vecuronio cuando se administran simultaneamente bolos de gentamicina y clindamicina (Jedeikin et al., 1987).

Los antibióticos polipeptídicos (polimixinas A, B, E) y lincomicina también potenciaron el efecto de los bloqueantes neuromusculares (Sokoll y Gergis, 1981; Taylor, 1985). Metronidazol

en cambio, aumentó la acción bloqueante de vecuronio pero no el bloqueo producido por pancuronio (McIndewar y Marshall, 1981).

d) Interacciones con fármacos diversos

Los agentes antiarrítmicos (procainamida y quinidina) potenciaron, en animales, tanto el bloqueo competitivo como el despolarizante, y en preparaciones aisladas, bretilio aumentó el bloqueo inducido con d-tubocurarina (Viby-Mogensen, 1985).

Nitroprusiato sódico fue capaz de aumentar la intensidad y prolongar la duración del bloqueo neuromuscular producido por d-tubocurarina en conejos. En cambio, la infusión de nitroglicerina no tuvo efecto sobre el bloqueo inducido por d-tubocurarina en gatos aunque sí potenció el efecto de pancuronio (Diwan et al., 1980).

La interacción de trimetafán con bloqueantes competitivos y despolarizantes, provocó una mayor duración del bloqueo (Nakamura et al., 1980).

Los bloqueantes neuromusculares también pueden interaccionar con sulfato de magnesio que es capaz de potenciar el bloqueo competitivo y prolongar el bloqueo despolarizante (Viby-Mogensen, 1985).

En pacientes anestesiados, dantroleno potencia el efecto de los bloqueantes neuromusculares (Driessen et al., 1985).

Los corticosteroides aumentan el bloqueo inducido con pancuronio en gatos (Viby-Mogensen, 1985). El carbonato de litio tuvo también un efecto agonista sobre la parálisis por pancuronio tanto "in vitro" como "in vivo", además aceleró el comienzo y

prolongó la duración del bloqueo producido por succinilcolina (Hill et al., 1977).

En gatos anestesiados se observó como concentraciones bajas de furosemida (<10 µg/kg) potenciaron tanto el bloqueo competitivo como el despolarizante, mientras que concentraciones mayores (>1-4 mg/kg) lo antagonizaron (Scappaticci et al., 1982).

Los agentes antineoplásicos (azatioprina, ciclofosfamida y tiotepa) prolongaron la duración del bloqueo inducido con succinilcolina "in vivo" (Viby-Mogensen, 1985).

Algunos autores han descrito que cimetidina prolonga el tiempo de recuperación del bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina (Kambam et al., 1987); el mecanismo propuesto para explicar esta interacción ha sido una inhibición de la actividad de la pseudocolinesterasa plasmática por cimetidina (Stir et al., 1988). No obstante, dado que este efecto se produce sólo con concentraciones de cimetidina superiores a las concentraciones terapeúticas (Cook et al., 1988) es dudoso el papel que dicha inhibición enzimática pueda jugar en esta interacción.

Los antagonistas del calcio también potencian el bloqueo neuromuscular inducido tanto con agentes competitivos como despolarizantes. Esta interacción será desarrollada en extenso en la sección D.7.2.1.

## 6.2. *Fármacos que disminuyen el efecto de los bloqueantes neuromusculares*

Estudiaremos las interacciones con fármacos anticolinesterasas, aminopiridinas y otros.

a) Interacciones con fármacos inhibidores de la colinesterasa

La reversión del bloqueo no despolarizante por anticolinesterasas ha sido ampliamente estudiada tanto "in vitro" como "in vivo" y en humanos (Foldes et al., 1981; Satoh et al., 1982; Gencarelli y Miller, 1982).

Así, los agentes anticolinesterasa (neostigmina, fisostigmina y edrofonio) son capaces de revertir el bloqueo competitivo. Sin embargo, existe un "margen de seguridad" en la inhibición del enzima por estos fármacos, puesto que con una inhibición inferior al 85% no se produce antagonismo del bloqueo, pero cuando ésta alcanza el 85-98%, la contracción aumenta proporcionalmente al grado de inhibición enzimática (Cronnelly y Morris, 1982).

Tras experimentos "in vitro" se ha demostrado como el insecticida organofosforado paraoxón (inhibidor de la colinesterasa) revierte el bloqueo inducido con pancuronio (Clark et al., 1983).

Ademas de inhibir la enzima colinesterasa, estos agentes son capaces de competir con los bloqueantes neuromusculares actuando directamente sobre los receptores nicotínicos pre y postsinápticos de la placa motora, por éllo se dice que el antagonismo que ejercen estos fármacos sobre los bloqueantes

competitivos es el resultado de una combinación de efectos (Cronnelly, 1985).

b) Interacciones con aminopiridinas

Las aminopiridinas (4-aminopiridina y 3,4-diaminopiridina) interaccionan con los bloqueantes neuromusculares antagonizando su efecto; por lo que son utilizadas en clínica durante el período postoperatorio para acelerar la recuperación tras el uso de relajantes musculares (Molgo, 1982).

Tras estudios electrofisiológicos se ha observado que 4-aminopiridina induce un aumento de los *e.p.p.s.* así como de las corrientes de placa motora, de preparaciones previamente tratadas con d-tubocurarina; éste efecto fue dosis-dependiente y pudo ser revertido tras el lavado de la preparación (Molgo et al., 1977).

El bloqueo neuromuscular inducido "in vitro" con pancuronio, d-tubocurarina y gallamina pudo ser revertido con 4-aminopiridina (Molgo, 1982) y esta sustancia también revirtió aunque en menor grado, el bloqueo neuromuscular producido por succinilcolina, así como la parálisis muscular producida "in vivo" por pancuronio y d-tubocurarina (Foldes et al., 1981).

c) Interacciones con otros fármacos

Adrenalina y efedrina, son capaces de antagonizar los efectos de los bloqueantes competitivos (Anttila y Vapaatalo, 1972).

Dosis altas de azatioprina administradas en ratas "in vivo" durante la fase estable del bloqueo neuromuscular inducido con d-tubocurarina, provocaron un breve antagonismo, dado el rápido aclaramiento del fármaco antineoplásico. Por el contrario, el tratamiento previo con dosis altas o bajas de azatioprina no tuvo efecto (Glidden et al., 1988).

Clinicamente se ha observado que pacientes con tratamiento anticonvulsivante (fenitoína o carbamazepina) son resistentes a la acción de algunos bloqueantes competitivos (metocurina, pancuronio y vecuronio). Este efecto no se observó cuando el bloqueo neuromuscular fue producido por atracurio (Roth y Erbrahim, 1987; Erbrahim et al., 1988).

Teofilina, papaverina, hidroclorotiazida y altas concentraciones de furosemida al interaccionar con bloqueantes competitivos, antagonizan su efecto paralizante. Las dosis altas de furosemida también revierten la acción de los bloqueantes despolarizantes (Viby-Mogensen, 1985; Scappaticci et al., 1982).

### 6.3. *Interacciones de los bloqueantes neuromusculares entre sí*

La interacción entre algunos bloqueantes competitivos no sólo produce un efecto aditivo, sino que se ha comprobado que algunas de estas interacciones provocan una auténtica potenciación de sus efectos. El fármaco administrado primero jugará un papel dominante tanto en las dosis necesarias como en la duración de acción del otro bloqueante neuromuscular (Rashkovsky et al., 1985).

Así, en preparaciones aisladas frénico-hemidiafragma de rata, las asociaciones pancuronio-d-tubocurarina, alcuronio-d-

tubocurarina y vecuronio-atracurio produjeron una potenciación de sus efectos bloqueantes (Pollard y Jones, 1983; Van Der Spek et al., 1988)

Otros experimentos "in vitro" demostraron la marcada potenciación observada tras asociar pancuronio o gallamina con metocurina. Por el contrario, el grado de potenciación fue menor cuando interaccionan pancuronio-d-tubocurarina y metocurina-d-tubocurarina (Waud et al., 1984).

En pacientes anestesiados se observó una potenciación del bloqueo neuromuscular cuando se asociaron pancuronio o d-tubocurarina con atracurio e igualmente sucedió al interaccionar pancuronio con d-tubocurarina o metocurina (Viby-Mogensen, 1985; Gerber et al., 1986). El tratamiento previo con d-tubocurarina facilitó el comienzo del bloqueo producido por pancuronio (Donati et al., 1986).

Sin embargo, la administración previa de d-tubocurarina para suprimir las fasciculaciones producidas por succinilcolina provocó una disminución de la intensidad y de la duración del efecto de este bloqueante (Durant y Katz, 1982). Vecuronio y dosis bajas de atracurio previnieron las fasciculaciones debidas a succinilcolina (Haering et al., 1988; Herlich et al., 1988).

Una vez establecido el bloqueo por d-tubocurarina la administración de succinilcolina o viceversa, puede provocar tanto un antagonismo como una potenciación de sus efectos, dependiendo de una serie de factores (dosis administradas, tipo y grado de bloqueo y presencia de otros fármacos) (Durant y Katz, 1982; Viby-Mogensen,

1985). Así, en pacientes anestesiados, el bloqueo por d-tubocurarina fue antagonizado por pequeñas dosis de succinilcolina (0.1 mg/kg); en cambio, dosis mayores (1 mg/kg) lo potenciaron ligeramente (Ninomiya, 1986).

La administración previa de succinilcolina aumentó la duración y potencia del bloqueo inducido con vecuronio y en menor grado el producido por pancuronio (Krieg et al., 1981; Durant y Katz, 1982).

En definitiva, el resultado de la asociación de dos bloqueantes neuromusculares es en cierta medida imprevisible.

## C. FISIOLOGIA DEL CALCIO

El calcio es un catión divalente que funciona como segundo mensajero en muchas funciones celulares, entre las que se incluyen los procesos de contracción muscular, secrección exo-endocrina, liberación del neurotransmisor y procesos metabólicos (Rasmussen, 1986). Así, por ejemplo, al ser la célula muscular estimulada por fármacos, neurotransmisores o bien por despolarización, responde con una liberación de calcio de sus depósitos o con una apertura de los canales de la membrana que permite la entrada de calcio extracelular iniciándose el proceso de contracción muscular (Sneyder y Reynolds, 1985).

Para introducirnos en el estudio de los antagonistas del calcio, fármacos utilizados en la parte experimental, se hará primeramente un resumen sobre la homeostasis del calcio y las características de los canales lentos, por los cuales el calcio es vehiculizado.

### 1. HOMEOSTASIS DEL CALCIO

En estado de reposo celular, la proporción entre calcio extra e intracelular es de 10.000 (Godfraind et al., 1986). Bajo condiciones de estimulación el calcio intracitoplásmico se eleva de manera transitoria, y ello pone en marcha una serie de mecanismos intracelulares, cuyo resultante final es un determinado efecto fisiológico. Existen una serie de sistemas responsables, tanto del aumento de la concentración de calcio intracelular, como

de la subsiguiente disminución para recuperar el estado de reposo celular.

La concentración de calcio del citosol se eleva tanto por una entrada de calcio extracelular a través de los canales lentos como por la movilización de los depósitos intracelulares de calcio, mitocondrias y retículo sarcoplásmico fundamentalmente. A este último nivel la movilización puede ser mediada por un mecanismo liberador de calcio inducido por calcio que se pone en marcha tras la estimulación de canales de calcio operados por voltaje del sistema transverso o por estimulación de los canales de calcio operados por agonistas, actuando como mensajero el inositol trifosfato, producido por hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-difosfato (Godfraind et al., 1986).

Para restablecer los niveles basales de calcio del citosol y mantener la homeostasis del calcio, las celulas utilizan sistemas de transporte que son capaces de actuar contra amplios gradientes electroquímicos. Tales sistemas de transporte de calcio han sido demostrados en la membrana plasmática y en organelas intracelulares (Godfraind et al., 1986). Entre ellos los que principalmente consiguen este transporte del interior al exterior celular son:

- **Bomba de calcio ATP-dependiente** presente en la membrana plasmática y el retículo sarcoplásmico. A nivel de la membrana, este sistema es regulado por calmodulina, la cual al unirse al calcio activa la bomba, y por los nucleótidos intracelulares AMPc y GMPc.
- **Sistema intercambiador sodio-calcio** que utiliza el potencial electroquímico derivado de la difusión pasiva de sodio para expulsar calcio. Este segundo mecanismo tiene menor afinidad,

pero mayor capacidad para el transporte de calcio, que el primero (Godfraind et al., 1986; Rasmussen, 1986).

## 2. CANALES LENTOS

Hemos dicho que la entrada de calcio del exterior al interior celular, se produce fundamentalmente a través de canales existentes en la membrana plasmática, que por sus caracterísiticas cinéticas, se denominan canales lentos (Braunwald, 1982; Reuter, 1983).

Estos canales estan constituídos por glucoproteínas, adoptando una configuración cilíndrica con un poro hidrófilo en el centro. El acceso de calcio extracelular al interior del citosol, a través del poro central, sigue una serie de pasos. El primero consiste en la interacción reversible del calcio con su sitio de reconocimiento (localizado en la superficie del canal); el segundo, se basa en la interacción de los iones con el campo eléctrico en el interior del canal. Por ello, para que este paso tenga lugar, hay que superar unas barreras energéticas, que son las responsables de la selectividad de acción del canal y de la velocidad de paso de los iones; así $Ca^{2+}$ y $Ba^{2+}$ penetran rapidamente en el canal, mientras que $Mn^{2+}$, $Cd^{2+}$ y $Zn^{2+}$, lo hacen de una forma más lenta (Hurwitz, 1986).

El canal lento tiene una cinética de activación e inactivación lenta, activándose con un voltaje umbral bajo; la recuperación de la excitabilidad no coincide con el final de la repolarización y la duración del periodo refractario puede ser

mayor que la duración completa del potencial de acción; carasterísticas todas estas, que lo diferencian del canal del sodio, que tiene una cinética de activación e inactivación rápida (Singh, 1982).

En cuanto al sistema de regulación de este canal lento, parece residir en un mecanismo de "puertas" situadas en el lado externo e interno del canal, siendo la puerta externa activada por un voltaje aproximado de -25 a -45 mV, mientras que la puerta interna se activa por un sistema de fosforilación dependiente del AMPc fundamentalmente (Zsóter y Church, 1983).

## 3.TIPOS DE CANALES LENTOS

Actualmente se acepta que existen dos tipos de canales lentos para la entrada de calcio al interior de la célula: unos cuya apertura depende de la despolarización de la membrana plasmática, llamados canales de calcio voltaje-dependientes o **VOCs** y otros, en los que el paso del calcio se desencadena por la interacción de un agonista con su receptor, los cuales se denominan canales de calcio operados por receptor o **ROCs** (Triggle and Swamy, 1983; Gonzalez y Sánchez, 1985).

Además de estos dos tipos de canales lentos de calcio, Bevan y colaboradores (1982) propusieron la existencia en muchos vasos especialmente arterias cerebrales, de unos canales de calcio activados por un efecto de tensión mecánica (canales **SOC**).

a) *Canales de calcio voltaje-dependientes (VOCs)*

Son varios los tipos de células que poseen un tipo de canales de calcio que se abren y se cierran en respuesta a cambios en el potencial de membrana; se ha demostrado su presencia en células endocrínas, neuronas y algunos tipos de células musculares (Miller, 1987).

Estos canales pueden encontrarse en tres estados: activo, inactivo y de reposo. El estado activo indica que el canal està abierto, lo que permite el paso de iones a su través. Tanto en el estado inactivo como en el de reposo, el canal está cerrado y por ello no permite el paso de iones. La diferencia entre estos dos últimos estados, reside en que mientras el canal esta en estado inactivo es refractario a la activación, pero en estado de reposo no lo es (Katz et al., 19[illegible], Hurwitz, 1986). Estos estados son interconvertibles, como señala el siguiente esquema:

REPOSO —— ACTIVO —— INACTIVO —— REPOSO

Nowicky (1985) trabajando en células nerviosas del ganglio de la raíz dorsal de embriones de pollo, define tres tipos diferentes de VOCs, según las carasterísticas de la corriente que puedan generar:

- tipo "L": se requieren despolarizaciones fuertes para activarlo y un potencial de mantenimiento o "holding" de -40 mV; genera una corriente de amplia conductancia y de larga duración (de ahí su designación "L" = long lasting).

- tipo "T": necesita despolarizaciones débiles y potenciales de mantenimiento "holding" muy negativos (-100 mV) para su activación. Origina una corriente de baja conductancia y corta duración ("T" = transient).
- tipo "N": a semejanza del tipo L, su activación precisa despolarizaciones fuertes; sin embargo el potencial de mantenimiento "holding" es muy negativo, como sucede en el tipo T, generando una corriente de conductancia intermedia a los tipos anteriores.

Estos canales tienen propiedades farmacológicas diferentes. Así el cadmio bloquea fuertemente los canales tipo L y N, mientras que lo hace en menor medida en los tipo T (Miller, 1987).

Por otro lado, unicamente los canales tipo L son sensibles a la acción de los antagonistas del calcio tipo dihidropiridinas. Además, en ellos se ha descubierto la existencia de 3 ó 4 receptores distintos para antagonistas del calcio, los cuales son capaces de interactuar alostericamente entre sí (Hosey y Lazdunski, 1988) (se comentará más adelante en la sección D.4.2.).

El papel fisiológico de estos canales está aún por dilucidar, no obstante se conoce que los canales tipo N se encuentran principalmente localizados en zonas sinápticas, por lo que la entrada de calcio a su través podría tener gran importancia en la liberación del neurotransmisor (Nowicky et al., 1985; Miller, 1987).

Por otro lado se ha observado en membranas de músculo cardíaco y esquelético la existencia de canales tipo T y L pero no

N. Además los canales tipo L del corazón difieren estructural, bioquímica e inmunologicamente de los encontrados en músculo esquelético (Chang y Honey , 1988).

La regulación de la apertura de estos canales por AMPc es diferente según el tipo y localización de ellos. En general se puede afirmar que los canales tipo L estan regulados por mecanismos de fosforilación dependiente del AMPc. Ello es especialmente cierto en canales de musculatura esquelética (Hosey y Lazdunski, 1988), existiendo cierta controversia cuando se estudia el comportamiento de los canales L de músculo cardíaco y no ocurriendo en los de músculo liso (Chang y Honey, 1988). Además parece que el AMPc también controla la sintesis de canales L de músculo esquelético. Por otro lado los canales N y T de neuronas, pero no los T de músculo esquelético son insensibles al AMPc (Hosey y Lazdunski, 1988).

b) ***Canales de calcio operados por receptor (ROCs)***

Los ROCs en células musculares lisas constituyen un grupo separado de elementos de la membrana, que puede ser diferenciado farmacologicamente de los VOCs.

Varios investigadores han demostrado qu +X'Xtos tejidos vasculares, normalmente polarizados, podían ser estimulados al contactar con concentraciones de agonistas, que no producían ningún cambio significativo en el potencial de membrana (Hurwitz, 1986). Además, observaron que el tamaño de estas contracciones estaba directamente relacionado con la concentración de calcio en el baño (Hurwitz, 1986).

De esto, se deduce que otro de los caminos por los que el calcio atraviesa la membrana celular y accede así al aparato contráctil es un canal de calcio no dependiente de los cambios de voltaje y operado por receptor.

Estos canales estan estrechamente asociados con receptores específicos de la membrana plasmática, por lo que su conversión al estado activo es inducida por interacciones entre el receptor y el agonista (neurotransmisores, hormonas o fármacos). Juegan un importante papel en la capacidad funcional de las células secretoras y se han descrito también en neuronas, linfocitos T y células musculares lisas (Triggle y Swamy, 1980; Triggle y Swamy, 1983; Reuter, 1983). Recientemente se ha sugerido la existencia de diferentes tipos de ROCs, aunque aún esta por dilucidar su tipificación y clasificación (Hosey y Lazdunski, 1988).

Por otro lado, se ha postulado la existencia de dos tipos diferentes de sistemas de entrada de calcio inducidos por agonistas. Uno es el sistema "P", cuya activación produce contracciones fásicas en las células musculares lisas y otro es el sitema "T", cuya activación produce contracciones tónicas. Ambos sistemas pueden ser distinguidos por sus diferentes respuestas a los diversos agentes inhibitorios; así el sistema P es bloqueado por verapamil, D-600 y nifedipina, mientras el sistema T es inhibido más potentemente por nitroprusiato sódico (Hurwitz, 1986).

Poco se sabe sobre las caraterísticas funcionales de los ROCs y la forma como se unen a los receptores de membrana, no obstante se ha propuesto que la descomposición de fosfatidil inositol y polifosfoinositoles producida a consecuencia de la

interacción del agonista con su receptor, es responsable de la apertura de las puertas de estos canales (Hurwitz, 1986).

Los ROCs también pueden ser controlados por un mecanismo que envuelve la fosforilación del canal o de una proteína estrechamente asociada con él dependiente del AMPc; esta fosforilación causa un cambio estructural en el canal, aumentando la probabilidad de su apertura (Nayler y Dillon, 1986).

## D. ANTAGONISTAS DEL CALCIO

### 1. CONCEPTO Y RECUERDO HISTORICO

Los antagonistas del calcio son un grupo de fármacos que disminuyen el flujo de calcio a través de los canales lentos, por lo que inhiben el acoplamiento excitación-contracción a nivel de las fibras musculares cardíacas y lisas principalmente.

Muchos de los agentes farmacológicos utilizados en la actualidad en el tratamiento de enfermedades cardíacas eran ya conocidos en la medicina practicada por los antiguos griegos y egipcios, pero no existen datos para afirmar algo así sobre los antagonistas del calcio; tan sólo se tienen noticias sobre una sustancia usada por los chinos desde hace unos 3.000 años "Tashiona" que puede ser considerada como un antagonista natural del calcio (Nayler y Dillon, 1986).

Fue a mediados de los años 1.960 cuando Fleckenstein y colaboradores, estudiando las propiedades farmacodinámicas de dos fármacos introducidos en terapeútica como vasodilatadores coronarios (prenilamina y verapamil) comprobaron que el efecto de éllos a nivel cardíaco imitaba el efecto de retirada de calcio. Tras una serie de experimentos, observaron que estos agentes inhibían el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco y que su acción inhibitoria sobre la contractilidad miocárdica podía ser neutralizada añadiendo calcio, o bien catecolaminas β-adrenérgicas o glucósidos cardíacos (sustancias todas éllas restablecedoras del suministro de calcio al sistema contráctil). Por ello estos agentes

fueron asignados a un grupo al que llamaron "antagonistas del calcio".

Simultánea e independientemente al trabajo de Fleckenstein, otros investigadores, Godfraind y colaboradores, analizaron las propiedades farmacológicas de los derivados de difenilpiperazina, especialmente de lidoflazina (usado como antianginoso) y cinarizina (considerado como antihistamínico) en músculo arterial de cerdos. Tras un amplio trabajo experimental observaron que ambos agentes tenían un mecanismo de acción común a nivel del transporte del calcio al sistema contráctil, consistente en una inhibición de la entrada de este catión; además este efecto inhibitorio pudo ser antagonizado por un aumento de calcio extracelular. Así se incluyó a estos fármacos en el grupo farmacológico de "antagonistas del calcio" (Godfraind et al., 1986).

Este grupo de fármacos ha recibido diversas denominaciones: bloqueantes de los canales de calcio, bloqueantes de la entrada de calcio, inhibidores de los canales lentos o bloqueantes de los canales lentos; siendo preferido el término de "antagonistas del calcio", no solo por razones históricas (denominación de Fleckenstein) o motivos de simplicidad, sino porque esta denominación responde a dos de sus principales carasterísticas: por un lado su acción inhibitoria de la corriente lenta de calcio y como consecuencia, la disminución que provocan en la concentración intracelular de este catión; y por otro el hecho de que este efecto pueda ser revertido con calcio (Nayler y Dillon, 1986).

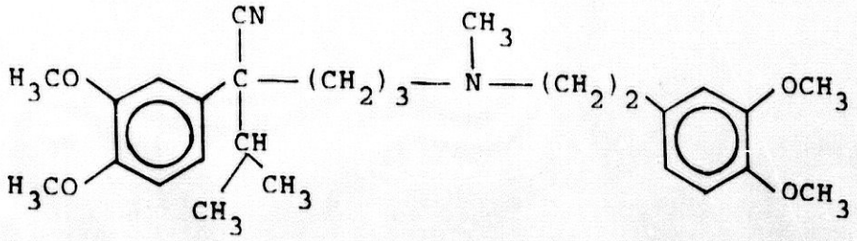
## 2. ESTRUCTURA QUIMICA

Una de las características más llamativas de los antagonistas del calcio es su heterogeneidad química ya que sus configuraciones son bastante diferentes, a pesar de compartir acciones farmacológicas comunes y tener el mismo mecanismo de acción (Triggle, 1982).

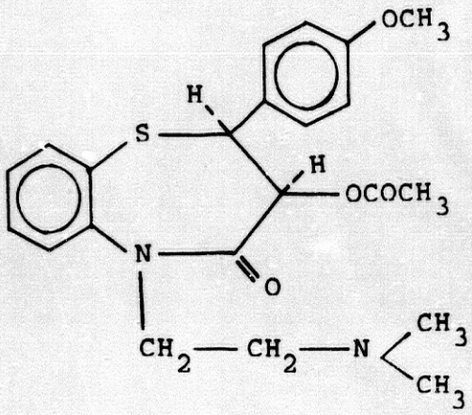
Atendiendo a este punto de vista, se realizó una clasificación química en cuatro grupos (Nayler y Dillon, 1986):

- **Dihidropiridinas:** nifedipina, nimodipina, niludipina, nitrendipina y nicardipina.
- **Fenilalquilaminas:** verapamil, gallopamil y tiapamil.
- **Benzotiazepinas:** diltiazem.
- **Piperazinas:** cinarizina, flunarizina y lidoflazina.

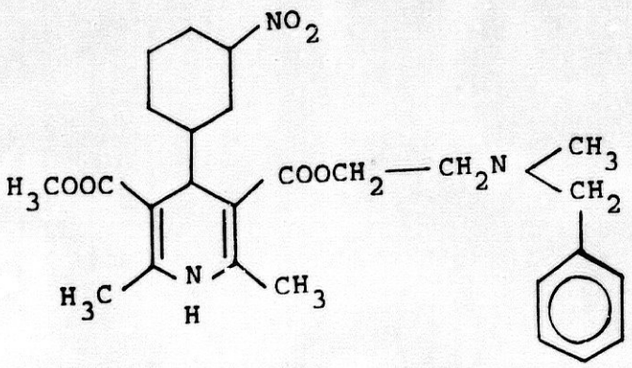
Las estructuras químicas de los prototipos (empleados en la parte experimental) de cada uno de estos grupos, se observan en la fig. C.



**VERAPAMIL**



**DILTIAZEM**



**NICARDIPINA**

Fig. C. Estructura química de los antagonistas del calcio

## 3. CLASIFICACION

Se han realizado varios intentos de clasificación de los antagonistas del calcio desde su descubrimiento, basándose en distintos criterios farmacológicos.

En primer lugar, Fleckenstein (1977) diferenció las acciones de estas sustancias en los efectos electrogénicos producidos por $Na^+$, $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$, estableciendo 2 grupos. Los agentes pertenecientes al grupo A (D-600, diltiazem, nifedipina, niludipina y nimodipina) inhibían selectivamente la fase lenta del potencial de acción mediado por $Ca^{2+}$, pero no si el ión responsable era el $Mg^{2+}$; además no afectaban la fase rápida producida por entrada de $Na^+$. Por otro lado, los agentes pertenecientes al Grupo B (prenilamina, fendilina, terolidina, perhexilina y caroverina), inhibían la fase lenta del potencial de acción mediado tanto por $Ca^{2+}$ como por $Mg^{2+}$, así como la corriente electroquímica del $Na^+$.

Posteriormente se diferenciaron 3 grupos: grupo I (dihidropiridinas), grupo II (verapamil y diltiazem) y grupo III (difenilpiperazinas), basándose en tres aspectos: a) liposolubilidad (Spedding, 1985), b) comportamiento ante el aumento de las cargas negativas de la superficie celular (Spedding, 1985) y c) reversión por Bay K 8644 de sus efectos inhibitorios (Spedding, 1984).

Así, los agentes pertenecientes al grupo I (dihidropiridinas) presentan una liposolubilidad baja, sus efectos inhibitorios no se modifican en presencia de salicilato de sodio y son revertidos de una manera competitiva por Bay K 8644.

Al grupo II (verapamil y diltiazem) pertenecen compuestos de liposolubilidad intermedia, cuyos efectos inhibitorios son reducidos tras el tratamiento de las membranas celulares con salicilato de sodio. Además, a diferencia de lo que ocurre con el grupo anterior, el agonista del canal del calcio Bay K 8644 antagoniza no competitivamente los efectos inhibitorios de estos agentes.

Por último, el grupo III (difenilpiperazinas) incluye compuestos de elevada liposolubilidad, cuya actividad aumenta al aumentar las cargas negativas de superficie en el tratamiento con salicilato y no revierte con Bay K 8644. Este grupo también se diferencia de los anteriores porque los compuestos que lo integran producen una inhibición de las contracciones del músculo liso, practicamente irreversible tras el lavado de la preparación y porque sus efectos inhibitorios se acentúan cuando los tejidos se incuban en un medio exento de calcio (Spedding, 1982). Además, estos agentes son capaces de inhibir el proceso de la contracción muscular, actúando directamente en el sistema de proteínas contráctiles (Spedding, 1983).

Por otro lado, mediante estudios de "binding", se observó que el grupo II de la clasificación anterior podía subdividirse. Así, se comprobó como nifedipina y congéneres desplazaban de manera competitiva la fijación de 3H-nitrendipina, mientras que verapamil lo hacía de manera no competitiva y diltiazem presentaba un comportamiento bifásico, ya que a pequeñas concentraciones desplazaba la unión, pero en concentraciones superiores a $10^{-7}$ M, la aumentaba (Bristow et al., 1984). En base a

ello se postuló que estos agentes actuaban en sitios moleculares diferentes, por lo que atendiendo a este criterio, se diferenció el grupo de las dihidropiridinas (antagonistas competitivos de la unión a 3H-nitrendipina), del de fenilalquilaminas (antagonistas no competitivos de dicha unión) y de diltiazem, que se comporta como antagonista mixto. Los agentes pertenecientes al grupo difenilpiperazinas inhibieron competitivamente la fijación de 3H-nitrendipina, aunque teniendo en cuenta la elevada liposolubilidad de estos agentes, se postuló que la unión a receptores dihidropiridínicos, se produce de manera no específica (Spedding, 1985), por lo que atendiendo a este criterio no se diferencian del grupo de las dihidropiridinas. La distinción entre ambos grupos se hace pues en base a criterios funcionales, tal y como se ha mencionadado en el párrafo anterior.

Por último, el Comité de expertos de la OMS, constituido al efecto, ha hecho un intento de clasificación de estos agentes en seis grupos, basándose en los estudios previos y en otros con modelos fisiopatológicos, así como atendiendo a sus características clínicas y diferentes estructuras químicas (Vanhoute y Paoletti, 1987):

- **Grupo I.** Derivados de fenilalquilaminas: verapamil y gallopamil.
- **Grupo II.** Derivados de dihidropiridinas: nifedipina, nicardipina, nimodipina y nitrendipina.
- **Grupo III.** Derivados de benzotiazepinas: diltiazem.
- **Grupo IV.** Derivados de difenilpiperazinas: flunarizina y cinarizina.
- **Grupo V.** Prenilamina y fendilina.
- **Grupo VI.** Caroverina y perhexilina.

Una exposición de las caraterísticas principales de estos grupos se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 1. Principales características farmacológicas y clínicas de los distintos grupos de antagonistas del calcio

| | I | II | III | IV | V | VI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Inhibición selectiva de los canales lentos del $Ca^{2+}$ | + | + | + | - | - | - |
| Inhibición adicional de los canales del $Na^{+}$ | - | - | - | 0 | + | + |
| Efectos en la celulas marcapasos de los nodulos sinusal y AV | + | + | + | 0* | + | + |
| Inhibición del inotropismo cardíaco | + | +! | - | - | 0 | 0 |
| Inhibición de los VOCs en músculo liso arterial | + | + | + | + | + | + |
| Inhibición de los ROCs en músculo liso arterial | + | + | + | + | + | + |
| Inhibición de la actividad miogénica del músculo liso vascular | + | + | + | - | 0 | 0 |
| Inhibición de la fijación a 3H-nitrendipina | + | + | (1) | + | 0 | 0 |
| Antagonismo de los efectos de Bay K 8644 | + | + | + | - | - | - |
| Inh. de la rigidez de las celulas sanguineas inducida por $Ca^{2+}$ | + | + | 0 | + | 0 | 0 |
| Utilización en angina de esfuerzo | + | + | + | - | + | - |
| Utilización en angina de reposo | + | + | + | - | - | - |
| Utilización en taquicardia paroxística supraventricular | + | - | + | - | - | - |
| Utilización en fibrilación auricular y flutter | + | - | + | - | - | - |
| Utilización en hipertensión arterial | + | + | + | - | - | - |
| Utilización en la profilaxis de la migraña | - | + | - | + | - | - |
| Utilización en el vértigo | - | - | - | + | - | - |

\+ Experimentalmente se observa el efecto
\- Experimentalmente no se observa el efecto
0 Se carece de datos experimentales
* La falta de efectos en los test "in vitro" de flunarizina puede ser debida a su escasa solubilidad en agua
(1) Facilita la fijación
+! En el organismo intacto se contrarresta el efecto inhibitorio directo por mecanismos reflejos

## 4. MECANISMO DE ACCION

Cuando Fleckenstein definió los antagonistas del calcio como grupo farmacológico observó que su mecanismo de acción consistía basicamente en una restricción del suministro de calcio al sistema muscular (Fleckenstein, 1977).

Esta idea perduró hasta que mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas se pudo demostrar que estos agentes actúan inhibiendo la corriente transmembrana de calcio, la cual es vehiculizada de menera bastante específica a través del canal lento (Kohlhardt et al., 1972; Kohlhardt y Fleckenstein, 1977).

Mientras que los antagonistas inorgánicos del calcio ($Mn^{2+}$, $Co^{2+}$ y $Ln^{2+}$) compiten directamente con este catión por el sitio de unión en el canal, los antagonistas orgánicos actúan bloqueando el canal, más que inhibiendo la entrada de calcio exclusivamente. Así se ha demostrado en células ventriculares de cobaya, que los antagonistas del calcio verapamil, diltiazem y nitrendipina inhiben, no sólo la corriente de entrada de calcio, sino también las de salida de $Cs^{+}$ y de $K^{+}$ (Lee y Tsien, 1983). Además las corrientes de $Sr^{2+}$ y $Ba^{2+}$, que pueden reemplazar a la de calcio en el proceso de acoplamiento excitación-contracción fluyendo a través de los canales lentos, también resultan inhibidas con antagonistas orgánicos del calcio (Fleckenstein, 1977).

Los antagonistas orgánicos de calcio interfieren con la entrada de calcio en la célula a través de los dos tipos de canales lentos VOCs y ROCs. Ello se comprobó tras estudios realizados con preparaciones musculares aisladas despolarizadas con

soluciones ricas en $K^+$ (para estimular la entrada de calcio a través de canales VOCs) o bien estimuladas con agonistas (que ponen en juego receptores ROCs) (Braunwald, 1982).

En general se ha comprobado que los antagonistas del calcio son más activos inhibiendo las contracciones inducidas por despolarización con ClK que las inducidas con agonistas (Flaim, 1982). No obstante existen excepciones a esta regla puesto que, por ejemplo, en arterias crurales humanas, verapamil es más activo inhibiendo respuestas mediadas por ROCS que las producidas por despolarización (Mikkelsen et al., 1978a y b). Esto podría señalar diferencias tisulares en cuanto a la dependencia del calcio extracelular para el desarrollo de la respuesta contráctil (Triggle y Swamy, 1983).

El bloqueo de los canales lentos se piensa actualmente que se produciría por cambio alostérico de los mismos como consecuencia de la fijación de antagonistas del calcio a sus receptores, lo que produciría una inhibición de la unión de calcio a su punto de fijación (Hosey y Lazdunski, 1988).

El modo de acción de los antagonistas del calcio no es necesariamente idéntico puesto que la inhibición del canal lento que induce nifedipina no se acompaña de modificaciones en la cinética del canal, al contrario de lo que ocurre con verapamil y diltiazem, sino que se debe a disminución del número de canales capacitados para el transporte del calcio (Anderson y Högestätt, 1984).

Por otro lado los efectos bloqueantes de la corriente de calcio que producen los antagonistas del calcio son frecuencia y voltaje-dependiente, es decir, aumentan conforme aumenta la

frecuencia de estimulación y/o la despolarización de la membrana (Triggle y Swamy, 1980; Lee y Tsien, 1983; Hosey y Lazdunski, 1988). Ello se explica por el hecho de que estas sustancias bloquean preferentemente el canal dependiendo del estado (activo, inactivo o de reposo) del mismo, lo que se conoce como estado-dependencia. Así, verapamil y diltiazem que son fuertemente frecuencia-dependiente bloquean el canal con preferencia cuando éste se encuentra en estado abierto (permite el paso de iones). Por ello, sus efectos aumentan despues de estimular repetidamente una preparación de celulas de Purkinje, lo cual facilitaría la apertura de los canales. Sin embargo, las dihidropiridinas exhiben menos frecuencia-dependencia, lo que correlaciona bien con su menor afinidad por el estado abierto del canal, siendo estos agentes más eficaces cuando el canal se encuentra en el estado inactivo (no permite el paso de iones y es refractario a la activación), (Lee y Tsien, 1983). Ello se puede comprobar porque el bloqueo que producen (en condiciones de baja frecuencia de estimulación) se hace mayor a medida que se imprime a la célula potenciales "holding" menos negativos, es decir, a medida que más canales se colocan en estado inactivo (Chin, 1986).

### 4.1. *Localización de la acción a nivel celular*

Ya Fleckenstein hipotetizó que el sitio principal de acción de los antagonistas del calcio era la membrana plasmática, pues comprobó que afectaban las funciones de ésta pero no las del retículo sarcoplásmimico aislado (Fleckenstein, 1977).

Ulteriores evidencias han comprobado esta hipotésis. Así, se ha reconocido la falta de actividad de verapamil, D-600, diltiazem y nifedipina en células cardíacas y musculares lisas, en las que experimentalmente se rompía la membrana plasmática, lo cual denota que esta estructura es imprescindible para que estos fármacos ejerzan su acción (Spedding, 1983).

Además se ha comprobado que estos fármacos inhiben selectivamente la fase tónica de la respuesta contráctil en músculo liso, la cual se supone mediada por entrada de calcio exógeno, a través de la membrana, puesto que no se produce en un medio exento de calcio (Janis y Scriabine, 1983).

Por último, en células cardíacas se ha demostrado la existencia de sitios de unión de alta afinidad para antagonistas del calcio concentrados predominantemente en las membranas celulares; algo similar se comprobó en células musculares lisas, células de cerebro y células de músculo esquelético (Nayler y Dillon, 1986). (Ver sección D.4.2.).

Por otro lado, hay hechos que sugieren que los antagonistas del calcio podrían actuar en la parte interna de la membrana plasmática. Así los derivados del amonio cuaternario (menos liposolubles) de D-600 y nifedipina pierden gran parte de su actividad como antagonistas del calcio, mientras que la potencia de D-600 (pk = 8,5) aumenta a pH alcalino lo que disminuiría su grado de ionización. Todo ello sugiere que estos agentes necesitan penetrar en el interior de la membrana plasmática, para ejercer sus acciones (Triggle y Swamy, 1983). Además, se ha comprobado que verapamil inhibe la activación del enzima ATPasa dependiente de calcio, la cual está localizada en la superficie citosólica de la

membrana plasmática (Mas-Oliva y Nayler, 1980).

Hay algunos trabajos que demuestran que los antagonistas del calcio tambien pueden actuar a nivel intracelular. Se ha descrito que verapamil y bepridil se acumulan en el interior de las células cardíacas y musculares lisas (Pang y Sperelakis, 1983). Además, diltiazem inhibe el intercambio sodio-calcio en mitocondrias cardíacas, mientras que felodipina, verapamil y nimodipina se comportan como inhibidores de la calmodulina. Sin embargo, las altas concentraciones precisas para producir todas estas acciones, hacen dudar de su contribución al efecto farmacológico global (Janis y Scriabine, 1983).

### 4.2. *Sitios de unión*

Hasta aquí hemos visto que los antagonistas del calcio actúan primeramente a nivel de membrana plasmática, probablemente en la cara interna de la misma. Ahora bien, esta actuación se debe al reconocimiento de estructuras específicas de la membrana. Esto se puso de manifiesto cuando se empezaron a usar marcadores para dihidropiridinas, especialmente 3H-nitrendipina, que se unía con alta afinidad a sitios de unión situados en membranas de cerebro, corazón y músculo liso (Murphy y Snyder, 1982). Posteriormente, se caracterizó también la fijación de 3H-nitrendipina en músculo esquelético de conejo, localizándose preferentemente en las membranas de los túbulos "T". Estos puntos de fijación presentan carasterísticas de receptores, puesto que la fijación de 3H-nitrendipina es altamente especifica (Kd = 0.1-

1.5 nM, según autores) y saturables y los análisis de Scatchard efectuados comprueban que existe un único punto de fijación (Fosset et al., 1983).

Verapamil, D-600 y flunarizina son incapaces de desplazar totalmente a dihidropiridinas marcadas de sus receptores (Bolger et al., 1983; Morel y Godfraind, 1988). Por otro lado, diltiazem tiene un comportamiento bifásico, puesto que bajas concentraciones disminuyen la unión de 3H-nitrendipina, mientras que a concentraciones superiores a $10^{-7}$ la aumenta (Bolger et al., 1983). Todo ello avala la idea de que 3H-nitrendipina marca unos sitios de unión diferentes de los de verapamil, diltiazem y flunarizina, proponiendose que todos ellos interactuarían de una manera alostérica (Murphy y Snyder, 1982; Morel y Godfraind, 1988).

En la actualidad se dispone de una nueva serie de marcadores (3H-(+)desmetoxiverapamil y 3H-d-cis diltiazem), que han permitido caracterizar sitios de unión específicos para verapamil y diltiazem (Nayler y Dillon, 1986).

Veamos un poco más detenidamente las características de los distintos sitios de unión para antagonistas del calcio.

Unión de dihidropiridinas. Se ha estudiado fundamentalmente en sistema tubular transverso de músculo esquelético, que constituye la preparación más rica en receptores para dihidropiridinas. En todos los tejidos examinados, incluyendo músculo esquelético, tejido cardíaco y cerebral, los estudios de "binding" revelaron una única clase de sitios de unión de dihidropiridinas, reversible y con alta afinidad. No obstante, en membranas de células cerebrales, se observaron dos sitios de unión, uno de alta afinidad y otro

de afinidad más baja para dihidropiridinas. También en cultivo de miocitos cardíacos y arteriales, se encontró un segundo sitio de unión de 3H-nitrendipina de más baja afinidad (Godfraind et al., 1986).

Esta unión es esteroselectiva, lo cual se ha confirmado mediante el uso de isómeros de dihidropiridinas puesto que el isómero levógiro desplaza en mayor medida que el dextrógiro la unión de 3H-nitrendipina para nitrendipina, nimodipina y Bay K 8644; mientras que para nicardipina y PN 200-110 el isómero dextrógiro es más potente (Godfraind et al., 1986).

A nivel subcelular, en tejidos cardíacos, los sitios de unión de 3H-dihidropiridinas son abundantes en fracciones de sarcolema, sobre todo en el retículo sarcoplásmico (Godfraind et al., 1986).

Unión de fenilalquilaminas. Sitios de unión específicos para fenilalquilaminas se han encontrado fundamentalmente en membranas de músculo esquelético (Godfraind et al., 1986).

Se ha comprobado que el isómero (-) de 3H-desmetoxiverapamil exhibe una afinidad más alta y una unión no específica más baja que el isómero (-) de 3H-verapamil.

A nivel subcelular se observaron sitios de unión de verapamil en el sarcolema cardíaco; sin embargo, una proporción importante de estos receptores estaba asociada a fracciones de membranas distintas a las mitocondriales y a las del sarcolema (Godfraind et al., 1986).

Unión de diltiazem. En membranas de musculo esquelético se observó una unión reversible de 3H-d-cis diltiazem. La unión de *d-cis* es más potente que la unión de *l-cis* diltiazem, lo que demuestra su esteroselectividad.

A nivel subcelular, el sitio de unión de 3H-diltiazem se localiza en una entidad molecular distinta a la de los sitios de unión de 3H-verapamil y 3H-dihidropiridinas (Godfraind et al., 1986).

Por otro lado, volviendo a las características generales de los sitios de unión de los antagonistas del calcio, es interesante comentar que los puntos de fijación parecen jugar un papel funcional, puesto que el rango de potencia de diferentes dihidropiridinas para desplazar a 3h nitrendipina es semejante al de su potencia para inhibir la amplitud de la fase tónica de la respuesta al potasio en ileon de cobaya aislado (Bolger et al., 1983). Además, se ha encontrado una excelente correlación entre la fijación de la dihidropiridina marcada 3H-PN 200-100 a membrana despolarizada de músculo esquelético ($K_d$= 0.22 nM) y la inhibición de los canales de calcio en esas celulas ($K_i$= 0.15 nM) (Hosey y Lazdunski, 1988).

Se piensa que los puntos de fijación para dihidropiridinas forman parte de la estructura del canal del calcio tipo L, puesto que ha sido posible reconstruir canales de calcio tipo L, con propiedades semejantes a los presentes en celulas intactas, a partir de receptores de dihidropiridinas (Hosey y Lazdunski, 1988).

Ultimamente se ha purificado la subunidad activa del receptor, consistente en un polipeptido de 165 KDa, el cual se ha caracterizado en membrana de músculo esquelético y al igual que ocurría con los canales L es fosforilado por una quinasa dependiente de AMPc (Chang y Honey, 1988). Es interesante constatar que en esta subunidad (llamada $\alpha_1$) se fijan no sólo dihidropiridinas, sino también verapamil, diltiazem y bepridil, lo que habla a favor de un sitio activo dentro del canal del calcio con diferentes locus para diferentes antagonistas del calcio. Esto explicaría las modificaciones alostéricas por los distintos antagonistas del calcio de la unión de dihidropiridinas (Hosey y Lazdunski, 1988).

Por último, hay que comentar que existe una relación entre la concentración de cationes divalentes del medio y la unión de los diferentes antagonistas del calcio a sus receptores, puesto que concentraciones micromolares de cationes divalentes (calcio, magnesio y otros cationes) se requieren para que se produzca la unión de dihidropiridinas, mientras que concentraciones mayores inhiben la unión de dihidropiridinas, fenilalquilaminas, bepridil y benzotiazepinas a membranas de músculo esquelético. Estos resultados sugieren que existe una interacción alostérica entre el sitio de unión del calcio y el sitio de unión para antagonistas del calcio en los canales lentos (Hosey y Lazdunski, 1988).

## 5. EFECTOS FARMACODINAMICOS

En esta sección se hará en primer lugar un resumen de los efectos farmacodinámicos de los antagonistas del calcio a nivel

cardíaco, vascular y hemodinámico global, así como en músculo liso extravascular con objeto de comprender las razones que justifican su utilización clínica. Finalmente, referiremos con más detalle los efectos de estos fármacos en placa motora y musculatura esquelética por estar dedicada la parte experimental de este trabajo a estudios a este nivel.

## 5.1. *Efectos cardíacos*

### I. Actividad eléctrica cardíaca.

Una de las principales utilizaciones clínicas de los antagonistas del calcio ha sido la de agentes controladores de arritmias supraventriculares. Ello se basa en el efecto depresor que producen en el canal lento de los nódulos sinusal y auriculo-ventricular principalmente (Nademadee y Singh, 1988).

Dado que los canales lentos son los únicos responsables del desarrollo del potencial de acción a nivel del nódulo sinusal y auriculo-ventricular, estos fármacos ejercen sus principales acciones sobre este tejido especializado, donde disminuyen la velocidad y amplitud del potencial de acción, hacen menos negativo el umbral de despolarización y disminuyen la generación de los impulsos automáticos, conjunto de hechos que como se comentará más adelante explica su utilidad clínica para dificultar la transmisión del impulso a este nivel.

A nivel de las fibras auriculares, ventriculares y de Purkinje disminuyen la altura de la fase de meseta, pero no modifican la fase de subida rápida ni la forma del potencial de

acción, ya que esto depende en su mayor parte de la entrada de sodio (Singh, 1982; Zsóter y Church, 1983; Kohlhardt y Haap, 1981). Por ello, estos fàrmacos no tienen utilidad como antiarrítmicos y antifibrilatorios ventriculares, excepto en situaciones de intoxicación digitálica e isquemia, en las que la participación de los canales del calcio adquiere relevancia (Singh, 1982; Lazzarra et al., 1978).

El efecto conseguido "in vivo" no coincide con el observado "in vitro" (Fleckenstein, 1977). Así, mientras que " in vitro" las acciones de los antagonistas del calcio son cualitativamente semejantes, difiriendo sólo en la potencia, ya que nifedipina es más potente que verapamil y éste más que diltiazem (Zsóter y Church, 1983). la situación "in vivo" es diferente, puesto que verapamil y diltiazem disminuyen la velocidad de conducción auriculo-ventricular y prolongan el periodo refractario, mientras que nifedipina acorta el periodo refractario y facilita esta conducción. Ello se explica porque las dihidropiridinas originan una gran vasodilatación periférica, que desencadena una respuesta simpática refleja y al no tener estos fármacos actividad bloqueante simpática se compensan de modo reflejo sus acciones depresoras cardíacas (Singh, 1982; Zsóter y Church, 1983; Nademanee y Singh, 1988). En función de estas propiedades se entiende la utilidad clínica de verapamil en el tratamiento de la taquicardia paroxística supraventricular, fibrilación y flutter auricular, mientras que nifedipina no es útil en este sentido (Singh, 1982; Zsòter y Church, 1983).

## II. Efectos en la contractilidad cardíaca.

Considerando separadamente los efectos obtenidos experimentalmente y los observados "in vivo", los antagonistas del calcio producen "in vitro" una clara disminución de la contractilidad cardíaca; por el contrario "in vivo" nifedipina aumenta la contractilidad cardíaca mientras que verapamil y diltiazem no tienen efectos inotrópos negativos en sujetos con función ventricular normal. Los efectos depresores sobre la contractilidad cardíaca de estos últimos agentes sólo se manifiesta en situaciones hemodinamicamente comprometidas o cuando se usan simultaneamente con β-bloqueantes (Lewis et al., 1976; Kohlhardt y Fleckenstein, 1977; Singh et al., 1978; Singh, 1982).

## III. Otros Efectos cardíacos.

Tras la experimentación con animales se ha demostrado que verapamil, diltiazem y nifedipina disminuyen el tamaño de la necrosis miocárdica debido posiblemente al aumento del flujo sanguíneo y a la disminución del trabajo cardíaco que provocan (Flaim y Zelis, 1981; Fleckenstein, 1983).

También se ha demostrado su capacidad para retrasar la lesión isquémica irreversible del miocardio, ejerciendo un efecto protector contra el daño isquémico. Parece ser que estas propiedades protectoras estan relacionadas con un mecanismo ahorrador de ATP al inhibir la ruptura enzimática de ATP con lo que se impiden reacciones letales de fosforilación (Flameng, 1988).

## 5.2. *Efectos vasculares*

### I. Efectos en vasos coronarios.

Tanto "in vivo" como "in vitro" los antagonistas del calcio provocan una vasodilatación coronaria. Dilatan tanto las grandes como las pequeñas arterias, así como las ramas colaterales. Este efecto es más evidente cuando estas arterias están contraídas, de ahí su indicación en el tratamiento de la angina de Prinzmetal cuyo mecanismo patológico implica un espasmo anormal de los vasos coronarios (Harder et al., 1979; Johnson et al., 1981; Zsóter y Churchill, 1983; Hugenholtz, 1988). Los antagonistas del calcio también son de utilidad en la angina de esfuerzo, aunque no producen esta vasodilatación en las arterias esclerosadas, por lo que en sus efectos beneficiosos en esta entidad patológica se implican otros mecanismos, como la reducción del trabajo cardíaco secundaria a sus acciones crono e inotropo negativas y a la reducción de las resistencias periféricas (Théroux et al., 1983).

### II. Efectos en vasos periféricos.

Los antagonistas del calcio producen una relajación del músculo liso vascular, "in vivo" e "in vitro", sin embargo la magnitud de esta relajación depende de una serie de factores (especie animal estudiada, localización del vaso, tipo de agonista que induce la respuesta contráctil y contenido extracelular de calcio en los experimentos "in vitro") (Dormandy, 1988).

En general se puede decir que los antagonistas del calcio "in vivo" tienen más efecto a nivel de los vasos arteriales que en los venosos (Spivack et al., 1983). Además, la vasodilatación inducida por nifedipina es superior a la provocada por verapamil y diltiazem (Flaim, 1982; Zsóter y Church, 1983).

El efecto vasodilatador de estos agentes es la base de su utilización como antihipertensivos, a lo que contribuye, el hecho de que no causan retención de agua ni de sodio y de que se comportan como relajantes en la vasoconstricción inducida con agonistas $\alpha_2$ y angiotensina II (Bühler y Kiowski, 1988).

### 5.3. *Efectos hemodinámicos globales*

Los efectos hemodinámicos globales de verapamil, diltiazem y nifedipina son distintos debido a que difieren en la importancia de sus acciones a nivel cardíaco y vascular.

La actividad intrínseca depresora del miocardio que produce verapamil es anulada por un incremento de la actividad vagal, excepto cuando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo esta muy disminuida, en cuyo caso el uso de este fármaco puede ocasionar un evidente deterioro clínico. Además el índice cardíaco no se reduce con verapamil, pues el efecto inotrópico negativo queda compensado por la disminución de la resistencia periférica que provoca (Singh, 1982).

Diltiazem provoca una disminución del gasto cardíaco debido a la mayor reducción de la frecuencia cardíaca que de las resistencias periféricas (Kinoshita et al., 1979).

Nifedipina provoca un aumento del gasto cardíaco debido al aumento de contractilidad y frecuencia cardíaca que induce, junto con una marcada reducción de las resistencias periféricas (Spivack et al., 1983).

### 5.4. *Efectos en músculo liso extravascular*

I. Efectos en vías aéreas.

Los antagonistas del calcio también inhiben las contracciones de músculo liso traqueal inducidas con diferentes estímulos (Godfraind et al., 1986). Estudios "in vitro" demostraron que las contracciones inducidas por potasio en preparaciones traqueales de cobayas, son completamente inhibidas por nifedipina, verapamil, diltiazem, nicardipina, bepridil y PY 108 068 en concentraciones micromolares (Advenier et al., 1984).

También se ha observado la actividad relajante de estos fármacos sobre las contracciones inducidas por acetilcolina e histamina, tanto en preparaciones de cobayas como en tiras traqueales humanas procedentes de auptosias (Advenier et al. 1984). Ello sugiere la posible utilidad de los antagonistas del calcio en el tratamiento del asma inducido por el ejercicio, en el que interviene la respuesta a la histamina liberada (Barnes, 1985).

Los valores de las dosis eficaces 50 de diltiazem y nicardipina como inhibidores de la contracción de músculo traqueal de cobaya fueron comparables a las que producen relajación de otros músculos lisos; sin embargo la potencia de nifedipina fue menor a

nivel traqueal que sobre el músculo liso vascular (Ahmed et al., 1985).

## II. Efectos a nivel de la musculatura lisa intestinal

El tejido más ampliamente usado para el estudio de los efectos de los antagonistas del calcio en músculo liso intestinal ha sido el ileon de cobaya. Este tejido sirve como modelo para todos los músculos lisos intestinales en general, pero ésto no es una razón a priori para suponer que la fisiología de todos estos músculos sea idéntica, puesto que se ha comprobado que las contracciones evocadas por acetilcolina en músculo liso intestinal de ratas son relativamente insensibles a los antagonistas del calcio (verapamil, nifedipina y PY 108 068) comparadas con el mismo tejido en cobayas (Bates et al., 1982).

Tras la exposicion de una preparación de ileon de cobaya a calcio después de 10 minutos de preincubación en una solución exenta de calcio pero con alta concentración de potasio, se observan contracciones bifásicas con un componente fásico inicial seguido de otro tónico que deparaba una contracción lenta y mantenida (componente tónico) (Godfraind et al., 1986). Los estudios comparativos sobre la potencia de los antagonistas del calcio como inhibidores de ambos componentes muestran un mayor efecto sobre las contracciones tónicas (Godfraind et al., 1986). Así verapamil y nifedipina fueron 10 veces y D-600 25 veces más potente como inhibidores de la fase tónica en preparaciones de cobaya. Además el efecto inhibidor de D-600 fue esteroselectivo siendo más potente el isómero levógiro (Rosenberger et al., 1979;

Frankis, 1983).

Por otro lado los antagonistas del calcio también son capaces de inhibir las contracciones inducidas con agonistas muscarínicos en preparaciones de ileon de cobaya. Algunos agentes, nifedipina y D-600 fueron más potentes como inhibidores de la fase tónica que de la fásica (Mitchelson y Ziegler, 1984; Godfraind et al., 1986).

Es posible que las acciones de los antagonistas del calcio a nivel de la musculatura lisa intestinal puedan utilizarse clinicamente para el control de los desordenes de la motilidad gastrointestinal. De hecho, los ensayos clínicos realizados con nifedipina y diltiazem muestran que estos agentes son beneficiosos en el tratamiento de la achalasia y del espasmo esofágico difuso (Defeudis y Christen, 1989). Las acciones cardiovasculares limitan su utilidad, necesitándose compuestos con mayor selectividad a nivel gastrointestinal. En este sentido el bromuro de pinaverio puede constituir una alternativa, ya que mejora la motilidad esofágica e intestinal (colon irritable) sin producir efectos indeseables cardiocirculatorios (Defeudis y Christen, 1989).

III. Efectos a nivel uterino

Uno de los primeros experimentos a nivel de musculatura lisa del útero fue realizado por Fleckenstein en los años setenta, quien demostró que los antagonistas del calcio suprimían la excitabilidad y contractilidad espontánea en preparaciones de músculo uterino (Fleckenstein, 1977).

Estudios posteriores confirmaron que estos fármacos abolían las espigas del potencial de acción evocadas por estímulos eléctricos y/o farmacológicos (Godfraind et al., 1986).

Igualmente se ha demostrado que los antagonistas del calcio de los diferentes grupos inhibían las contracciones uterinas espontáneas e inducidas con oxitocina con el siguiente orden de potencia: nifedipina > D-600 > diltiazem > cinarizina. Además se comprobó que las contracciones espontáneas son más sensibles a estos fármacos que las contracciones inducidas con oxitocina (Granger et al., 1985).

Estos efectos tienen utilidad clínica, de hecho, se utilizan las dihidropiridinas en el tratamiento de la dismenorrea (Vanhoute y Paoletti, 1987). Además, se demostró que la administración de nifedipina fue capaz de abolir las contracciones uterinas en el tratamiento del parto prematuro (Ulmstem et al., 1980).

## 5.5. Efectos a nivel de Placa Motora

Los antagonistas del calcio de los grupos I (fenilalquilaminas), II (dihidropiridinas), III (benzotiazepinas) y IV (difenilpiperazinas) produjeron bloqueo neuromuscular dosis-dependiente en preparaciones de frénico-hemidiafragma aislado de rata (Bikhazi et al., 1985; Del Pozo y Baeyens, 1986; Wali y Suer, 1987; Salvador et al., 1988; Del Pozo y Baeyens, 1989). Además, verapamil ejerció este efecto en preparaciones biventer-cervicis de pollo (Wali, 1986; Wali, 1987). Sin embargo, otros autores han observado el efecto opuesto, es decir, un aumento en la altura de

la contracción diafragmática de ratón inducida con estimulación eléctrica del nervio frénico al administrar concentraciones micromolares de verapamil, diltiazem y nifedipina, aunque cuando utilizaron concentraciones más altas de antagonistas del calcio (>100 μM) y/o preparaciones en las que el margen de seguridad de la transmisión neuromuscular había sido reducido con d-tubocurarina, observaron bloqueo neuromuscular con verapamil y diltiazem, pero no con nifedipina (Chang et al., 1988).

En los experimentos "in vivo" el comportamiento de los antagonistas del calcio fue aún más complejo, variando según las distintas vías de administración y preparaciones utilizadas. Así mientras que Anderson y Marshall (1985) y Durant et al. (1984) no observaron ningún tipo de efecto en gatos y conejos respectivamente utilizando verapamil, nifedipina y bepridil por vía intravenosa, otros autores demostraron bloqueo neuromuscular dosis-dependiente en gatos y perros tras administración intravenosa de verapamil (Kraynack et al., 1983b; Lawson et al., 1983). Por otro lado, Sato y Ono (1981) observaron que los antagonistas del calcio (verapamil, diltiazem y nifedipina), administrados por vía intra-arterial directa, produjeron una elevación de la contracción del músculo tibial anterior de perros estimulado indirectamente.

Sin embargo, con estos estudios no se llega a discernir si estos fármacos actúan a nivel pre o postsináptico. Intentos de aproximación al conocimiento del sitio de acción se han efectuado mediante estudios electrofisiológicos y de estimulación aislada de las fibras musculares. A continuación se describirán los resultados de los trabajos efectuados con antagonistas del calcio

resultados de los trabajos efectuados con antagonistas del calcio en terminaciones nerviosas, membrana postsináptica y músculo esquelético.

**a) Efecto de los antagonistas del calcio en terminaciones nerviosas**

Existen evidencias directas de que verapamil y diltiazem pero no dihidropiridinas, en concentraciones micromolares, bloquean el componente lento de la corriente de calcio de las terminales nerviosas de ratones (Penner y Dreyer, 1986).

Por otro lado, valorando la frecuencia de los potenciales en miniatura de placa motora (*m.e.p.p.s.*), lo cual es un índice de liberación espontánea del neurotransmisor, Nachshen y Blaustein (1979), no observaron ningún efecto tras la incubación de la preparación neuromuscular con dosis no muy altas de verapamil (40-50 μM) y D-600 (10 μM). Sin embargo, otros autores, utilizando dosis de verapamil mayores (100 μM) describieron un aumento en la frecuencia de los *m.e.p.p.s.* el cual fue temperatura y calcio-dependiente (Publicover y Duncan, 1979). Por otro lado, en otros estudios se demostró que verapamil (50 μM) y diltiazem (35 μM), incubados en un medio con contenido bajo de calcio, disminuyeron el contenido cuantico y la amplitud de los potenciales postsinápticos de placa motora (*e.p.p.s.*), lo cual sugiere que son capaces de disminuir la liberación evocada del neurotransmisor (Chang et al., 1988).

Todo ello indica que algunos antagonistas del calcio, principalmente fenilalquilaminas y benzotiazepinas, ejercen efectos

a nivel presináptico, aunque la naturaleza exacta de los mismos no esta suficientemente clarificada y es dudoso, teniendo en cuenta las concentraciones necesarias para ejercer estos efectos, que pueden tener repercusiones clínicas en circunstancias normales.

**b) Efectos de los antagonistas del calcio en membrana postsináptica**

Cada vez hay más evidencias de que estos agentes tienen efectos a nivel de la membrana postsináptica. Así verapamil (20 μM) disminuye de una manera no competitiva las contracciones inducidas con acetilcolina en músculo esquelético de pollo, sugiriendo una disminución de la sensibilidad de la membrana a acetilcolina o un bloqueo de los canales iónicos asociados al receptor (Wali, 1987).

Profundizando en esta idea, se ha demostrado que diferentes antagonistas del calcio del grupo I (verapamil, D-600 y bepridil) y del grupo II (nicardipina y nitrendipina) reducen la contracción inducida por carbacol y los flujos iónicos asociados a la estimulación del receptor nicotínico, de una manera concentración-dependiente (Adam y Henderson, 1986a). Estos trabajos se complementan con los de Watchel (1987) que demostró con verapamil y diltiazem una disminución del tiempo medio y la frecuencia de apertura de los canales iónicos asociados al receptor para acetilcolina.

Es posible que estos efectos se produzcan por un mecanismo de inhibición alostérica del receptor nicotínico, puesto que verapamil desplaza de una manera no competitiva a α-

bungarotoxina marcada (Siegel y Lukas, 1986).

**c) Efecto de los antagonistas del calcio en las fibras musculares esqueléticas**

En este apartado desarrollaremos en primer lugar el efecto de los antagonistas del calcio en la corriente lenta de calcio ($I_{Ca}$) en la fibra muscular, para en segundo lugar analizar sus acciones en las contracciones musculares inducidas con diferentes estimulos físicos y químicos.

**1) Efectos en la corriente lenta de calcio:**

Casi todos los estudios coinciden en demostrar que los antagonistas del calcio de las familias fenilalquilaminas y benzotiazepinas provocan una disminución de la $I_{Ca}$ en músculo esquelético. Así, en preparaciones aisladas de músculos de ranas y conejos se comprobó que diltiazem y verapamil disminuían la corriente lenta de calcio de una manera frecuencia y concentración-dependiente (Walsh et al., 1986; Gonzalez-Serratos et al., 1982). Además se demostró que verapamil y bepridil en concentraciones micromolares producían una disminución de la amplitud de los potenciales de acción lentos (Kerr y Sperelakis, 1982).

Por otro lado, cuando se estudian los efectos de distintas dihidropiridinas los resultados son más controvertidos. La disminución de la $I_{Ca}$ y de los potenciales de acción lentos se ha observado con nifedipina y nicardipina respectivamente, mientras que el agonista del canal del calcio Bay K 6844 ejerció un efecto opuesto (Idelfonse et al., 1985; Hatae, 1985). Sin embargo

nitrendipina no modificó la corriente interna de calcio, incluso a pesar de mantenerse en contacto con la preparación durante largos periodos de tiempo (Walsh et al., 1986).

Estos efectos no tienen repercusiones claras en el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético, puesto que en los trabajos donde simultaneamente se registran las acciones de antagonistas del calcio en la corriente lenta de calcio y en la contracción muscular no se encontró una correlación entre ambos efectos (Gonzalez-Serratos et al., 1982; Idelfonse et al., 1985; Walsh et al., 1988). La mayor controversia la observaron Walsh et al. (1988) quienes observaron que concentraciones de diltiazem que abolían la $I_{Ca}$ aumentaban la contracción muscular.

2) Efectos en el proceso de contracción muscular

En este aspecto existe una gran controversia en cuanto al efecto que desencadenan los antagonistas del calcio, dependiendo de los distintos autores y preparaciones utilizadas. No obstante, la mayoría de estos estudios, casi todos ellos realizados "in vitro" , demuestran que el antagonista del calcio, verapamil, indujo una disminución en la altura de la contracción única estimulada directamente mediante electrodos, observándose además que estas acciones eran concentración y frecuencia-dependientes (Delbono et al., 1987; Wali, 1987; Kotsias et al., 1986; Bikhazi et al., 1979 y 1985). Estos mismos efectos son compartidos por D-600, bepridil,diltiazem y flunarizina, y parecen ser independientes de la concentración de calcio del medio extracelular (Gallant y Goettl, 1985; Bikhazi et al., 1979 y 1985; Del Pozo y Baeyens, 1989). Sin embargo, otros autores tienen resultados opuestos, es

decir un aumento en la altura de la contracción única, utilizando verapamil y diltiazem tanto "in vivo" (Skirboll et al., 1979; Sato y Ono, 1981) como "in vitro" (Chang et al., 1988).

El comportamiento de los antagonistas del calcio, pertenecientes a la familia dihidropiridinas, parece por regla general, distinto, puesto que estos agentes tienden a potenciar la contracción del músculo esquelético estimulada directamente (Sato y Ono, 1981; Chang et al., 1988; Gallant y Goettl, 1985; Singh y Dryden, 1988).

También se ha estudiado el efecto de los antagonistas del calcio sobre músculo esquelético tras aplicar estimulación tetánica. Se observó que tanto verapamil como D-600, bepridil y diltiazem disminuían el pico de tensión tetánica y facilitaban el "fade" tetánico (Gallant y Goettl, 1985; Sato y Ono, 1981; Wali y Suer, 1987); por el contrario, los agentes pertenecientes al grupo dihidropiridinas, nifedipina y nitrendipina, no provocaron ningún efecto (Gallant y Goettl, 1985) y si se observó alguno, éste consistió en una potenciación de la tensión tetánica que pudo ser revertido tras el lavado de la preparación (Sato y Ono, 1981; Dulhunty y Gage, 1987).

Por otro lado, las contracturas inducidas tras despolarización por $K^+$, las cuales, según algunos autores (Frank et al., 1988) se producen por estimulación de los canales lentos sensibles al voltaje del músculo esquelético, también fueron influenciadas por los antagonistas del calcio. Así, se pudo observar una inhibición, concentración-dependiente, de estas contracciones tras administración de verapamil, (Sato y Ono, 1981; Delbono et al.,

1987). Sin embargo, las dihidropiridinas divergen en sus efectos sobre estas contracturas, deparando a veces una inhibición de la contracción (Frank et al., 1988) o una ausencia de efecto (McCleskey, 1985; Dulhunty y Gage, 1987); no obstante, esos mismos autores obtienen efecto inhibitorio al incubar la preparación en un medio con contenido bajo de calcio (Dulhunty y Gage, 1987). Por el contrario Singh y Dryden (1988) observaron una potenciación de esta contractura por $K^+$ cuando utilizaron concentraciones bajas de nifedipina, aunque a mayores concentraciones o tras exposiciones prolongadas, observaron el efecto opuesto, o sea una inhibición de la contractura inducida por $K^+$ (Singh y Dryden, 1988).

Los antagonistas del calcio también han mostrado algún efecto sobre las contracciones de músculo esquelético, cuando estas son estimuladas por cafeína, las cuales se producen por liberación de calcio de retículo sarcoplásmico, merced al mecanismo de "liberación de calcio inducida por calcio". La primera fase de estas contracciones fue potenciada por nifedipina (Singh y Dryden, 1988). Sin embargo, verapamil ejerció el efecto opuesto (Delbono et al., 1987) o bien no lo manifestó (Kotsias et al., 1986).

En definitiva, los antagonistas del calcio pueden alterar el funcionamiento de la placa motora ejerciendo efectos tanto a nivel pre como postsináptico;. además, también pueden alterar la contractilidad de las fibras musculares directamente. En general, se necesitan dosis elevadas y los efectos son más evidentes con verapamil y diltiazem que con dihidropiridinas, aunque los resultados con éstas dependan en cierta medida de las condiciones experimentales.

# 6. FARMACOCINETICA

## 6.1. *Verapamil*

Es uno de los antagonistas de calcio sobre el que más estudios se han realizado con la finalidad de conocer su cinética.

### Métodos Analíticos

La cromatografía líquida de alta presión con detector fluorimétrico es el método más utilizado para separar y cuantificar tanto verapamil como sus principales metabolitos en los líquidos orgánicos (Hamann et al., 1984).

### Absorción

Verapamil es completa y rapidamente absorbido tras su administración oral (90%). La concentración plasmática máxima aparece en 2.2 horas despues de dosis de 80 y 160 mg por vía oral (Hamann et al., 1984).

Inmediatamente después de su absorción por vía oral tiene lugar un metabolismo hepático. Presenta pues un intenso efecto de primer paso, cuyo resultado es una baja disponibilidad sistémica (10-20%) (Zelis, 1982). Sin embargo ésta puede aumentar (38-82%) en tratamientos crònicos o a largo plazo, posiblemente debido a una disminución del efecto de primer paso hepático (Kates, 1983).

## Distribución y Unión a Proteínas

Verapamil es ampliamente distribuído por todos los tejidos del organismo, encontrándose altas concentraciones en hígado, riñón, pulmón y tejido cardiaco (Hamann et al., 1984). El volumen de distribución es de 4.3 l/kg (Zelis, 1982).

En el hombre, tanto verapamil como su metabolito activo norverapamil se unen ampliamente a las proteínas plasmáticas (90-95%) (Zelis, 1982). Estudios "in vitro" demuestran que verapamil se une a albúmina (60%) y a $\alpha_1$-glucoproteína ácida. Además se observa que norverapamil desplaza a verapamil de su sitio de unión a proteínas lo cual aún no ha podido ser confirmado "in vivo" (Hamann et al., 1984).

La unión a proteínas de verapamil es esteroselectiva, siendo la fracción libre del isómero levógiro aproximadamente el doble que la del dextrógiro (Eichelbaum et al., 1984).

## Metabolismo

Como hemos dicho antes verapamil es ampliamente metabolizado en el hígado. La primera vía metabólica es una N-dealquilación y una O-demetilación. Los productos demetilados tienen una actividad farmacológica similar a verapamil. Norverapamil es un metabolito N-dealquilado que se encuentra sobre todo despues de la administración oral y cuya potencia hemodinámica es 1/8 de la de verapamil (Hamann et al., 1984; Zelis, 1982).

El aclaramiento hepático de verapamil también es esteroselectivo, siendo mayor para el isómero levógiro que para el dextrógiro, por lo que tras administración oral de verapamil racémico la biodisponibilidad del isómero levógiro será menor. Ello explica la diferencia de potencias de verapamil cuando se administra por vía oral o intravenosa. En este último caso, no ocurre el efecto de primer paso hepático y en consecuencia se metaboliza menos el isómero levógiro activo (Eichelbaum et al., 1984).

La vida media de verapamil es de 4-8 horas cuando se administra oralmente, mientras que la vida media de norverapamil es más larga (10.5 horas). Tras administración crónica la vida media de ambos se prolonga hasta 5.7-9.6 horas para verapamil y 8-13.2 horas para norverapamil, lo que se explica por una reducción del efecto de primer paso (Zelis, 1982).

Eliminación

La concentración plasmática de verapamil después de ser administrado oral o intravenosamente decae de una manera mono, bi o triexponencial, tanto en animales como en el hombre (Keefe et al., 1981).

El 65-70% de verapamil administrado por vía oral o intravenoso es eliminado por orina y un 16% por heces; sólo un 3-4% permanece inalterado. Los metabolitos se eliminan exclusivamente como compuestos conjugados inactivos (Zelis, 1982; Hamann et al., 1984).

## 6.2. *Diltiazem*

### Métodos Analíticos

La cromatografía de gases con detector de fósforo-nitrogeno es el método más usado para el estudio de la farmacocinética tanto de diltiazem como de su principal metabolito, desacetildiltiazem (Rovei et al., 1980).

### Absorción

Se absorbe el 90-95% de diltiazem administrado por vía oral. No obstante, la biodisponibilidad es baja debido a un extenso efecto de primer paso hepático, tal y como ocurre con verapamil (Zelis, 1982). Diltiazem es detectado en plasma a los 30-60 minutos de su administración oral.

EL pico de concentración plasmática ocurre a las 1.5 horas siguientes a la administración oral en forma de cápsulas y entre 2.8-4 horas si es administrado en tabletas, sin embargo la disponibilidad es similar en ambos casos (Kates, 1983).

No existe una relación lineal entre la dosis y la concentración plasmática en humanos. Dosis múltiples diarias de diltiazem mantienen los niveles plasmáticos estables aunque la concentración absoluta no sea predecible debido al efecto de primer paso (Chaffman y Brogden, 1985).

## Distribución y Unión a proteínas

Tras administrarlo por vía intravenosa, la concentración en suero disminuye de forma biexponencial.El volumen de distribución de diltiazem es de 3 l/kg (Zelis,1982).

El 78-87% de diltiazem se une a las proteínas plasmáticas principalmente albúmina (35-40%), $\alpha_1$-glucoproteína ácida y gamma-globulinas y el 14-23% permanece libre en el suero. Este porcentaje es independiente de la concentración de diltiazem y el porcentaje de fármaco unido a proteínas no es afectado por la presencia de los metabolitos (Chaffman y Brogden, 1985).

## Metabolismo

Diltiazem sufre un marcado metabolismo hepàtico (Sugawara et al., 1988a; 1988b). Primeramente es desacetilado y después sufre una O-demetilación o N-demetilación; su principal metabolito es desacetildiltiazem, cuya actividad biológica es 1/4 - 1/2 la de diltiazem (Rovei et al., 1980).

La vida media de diltiazem es de 5.4 horas, la de desacetildiltiazem no està bien especificada pero parece ser más larga (Kates, 1983; Chaffman y Brogden, 1985). Además se prolonga con la administración crónica, al igual que sucede con verapamil (Zelis, 1982).

Eliminación

La principal vía de eliminación es la de excreción biliar, puesto que un 60% de una dosis oral de diltiazem marcado aparece en heces y un 35% se recupera en orina (Zelis, 1982; Chaffman y Brogden, 1985).

El 0.3-0.8% de una dosis oral de diltiazem aparece en orina como desacetildiltiazem, sin embargo esto no se observa tras administración intravenosa, por ser un producto que experimenta el fenómeno de primer paso hepático (Chaffman y Brogden, 1985).

## 6.3. *Nicardipina*

Métodos Analíticos

La técnica más utilizada es la cromatografía líquida de alta presión, por ser un método específico para determinar tanto nicardipina como su metabolito piridínico (Massey et al., 1984).

Absorción

Tras su administración oral es rápida y completamente absorbida, lo que ha sido atribuído a su alta solubilización. A pesar de ello su biodisponibilidad es baja debido a un extenso metabolismo presistémico; sin embargo esta biodisponibilidad aumenta al aumentar la dosis de nicardipina (Sorkin y Clissold, 1987).

El pico de concentración plasmática aparece entre 20 minutos y 2 horas tras su administración.

Al aumentar la dosis no hay un aumento lineal de la concentración plasmática, ya que las vías metabólicas presistémicas se saturan con nicardipina o sus metabolitos. Ello se ha confirmado al demostrar que su biodisponibilidad, cuando se administra bajo la forma de preparados de liberación mantenida, es menor que si nicardipina es administrada en tabletas, pues en este último caso tiene lugar una saturación de los procesos de biotransformación (Thuillez et al., 1984).

En tratamientos prolongados la concentración plasmática de nicardipina no aumenta.

Distribución y Unión a Proteínas

En estudios realizados con nicardipina marcada se observó que su concentración máxima en tejidos apareció en 0.5-1 hora tras administración oral (3 mg/kg), siendo más alta en hígado, riñón y pulmón y menor en corazón, bazo, cerebro y músculo. Tras administración intravenosa tuvo una distribución similar siendo su concentración máxima en páncreas, pared intestinal y glándulas salivares más alta que en plasma (Sorkin y Clissold, 1987).

Experimentos en ratas a las que se administró diariamente nicardipina durante 21 días demuestran que la meseta de niveles plasmáticos o "steady-state" se alcanza dentro de los primeros 14 días de tratamiento (Higuchi et al., 1980).

Un 90% de nicardipina se une a las proteínas plasmáticas predominantemente a $\alpha_1$-glucoproteína ácida, albúmina y

lipoproteínas (Abernethy y Schwartz, 1988). Esta unión a proteínas disminuye al aumentar la concentración del fármaco; además aumenta al aumentar la concentración de lípidos en suero y se modifica con los cambios del pH, puesto que si aumenta éste, aumenta la unión a proteínas (Sorkin y Clissold, 1987).

## Metabolismo

Nicardipina sufre un rápido metabolismo de primer paso hepático, dando origen a dos clases de metabolitos principales: los que tienen un anillo dihidropiridínico intacto y los que se oxidan a metabolitos piridínicos (Sorkin y Clissold, 1987).

Estos metabolitos son muchos menos activos que el producto original ya que, su potencia vasodilatadora es inferior al 1% de la de nicardipina. Dichos metabolitos aparecen despues en orina como conjugados glucorónicos (Abernethy y Schwartz, 1988).

## Eliminación

Debido a la marcada metabolización hepática, nicardipina está practicamente ausente en orina como producto original.

Experimentos en animales han demostrado que nicardipina es excretada por la bilis y por heces ya sea tras administración oral o intravenosa, en un porcentaje variable según los diferentes estudios (35-60%) (Sorkin y Clissold, 1987).

## 7. INTERACCIONES FARMACOLOGICAS

Los antagonistas del calcio pueden desarrollar interacciones farmacológicas cuando son usados conjuntamente con otros fármacos; estas interacciones se producen a nivel farmacocinético y/o farmacodinámico. Para su estudio distinguiremos entre la interacción de los antagonistas del calcio con fármacos que actúan a nivel cardiovascular y aquellas otras que se producen con agentes que actúan a otros niveles neuromuscular, sistema nervioso central y otros).

### 7.1. *Interacciones con agentes cardiovasculares*

La combinación de glucósidos cardíacos y antagonistas del calcio es común en el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares, particularmente en tratamientos antiarrítmicos (Rameis et al., 1984; Kuhlmann, 1985), y es fuente de interacciones farmacocinéticas y/o farmacodinámicas.

Logicamente, la acción simultanea de dos fármacos con actividad depresora de la conducción auriculo-ventricular es sinérgica, pero es que además verapamil intensifica el efecto de digoxina porque eleva la concentración de ésta en plasma, disminuyendo su excreción renal. Ello puede ocasionar bloqueos auriculo-ventriculares (Belz et al., 1983; Hamann et al., 1984; Kuhlmann, 1985).

Diltiazem también aumenta los niveles plasmáticos de digoxina debido a la prolongación del tiempo medio de eliminación y

a la disminución del aclaramiento extrarrenal de digoxina (Rameis et al., 1984; Kuhlmann, 1985; Chaffman y Brogden, 1985).

Sin embargo los efectos de dihidropiridinas (nifedipina y nicardipina) en la concentración plasmática de digoxina son más confusos, puesto que mientras que algunos autores han descrito un aumento de la concentración plasmática de digoxina que correlaciona bien con una disminución en su aclaramiento renal (Belz et al., 1983; Abernethy y Schwartz, 1988), otros no aprecian ninguna modificación de estos parámetros cinéticos en sujetos tratados con nifedipina (Kuhlmann, 1985).

Por otro lado, la asociación de antagonistas del calcio y β-bloqueantes es común en el tratamiento de la angina y puede ser fuente de interacciones peligrosas. así, la interacción de propanolol y verapamil, especialmente si éste se administra por vía intravenosa produce una sinergia de sus acciones cardiodepresoras, manifestada como alteraciones de la conducción auriculo-ventricular, bradicardia y fallo ventricular izquierdo (Hammann et al., 1984). Ello no sólo se produce por mecanismos dinámicos, ya que se ha demostrado más relacionada con los niveles plasmáticos de propanolol que de verapamil. De hecho "in vitro" verapamil y diltiazem elevan la fracción libre de propanolol en suero, no sucediendo así con nicardipina o nifedipina (Chaffman y Brogden, 1985).

También se ha observado una depresión de la conducción auriculo-ventricular, manifestada como una prolongación del intervalo P-R, en experimentos "in vivo" tras asociar lidocaina a los antagonistas del calcio verapamil y diltiazem (Kapur et al., 1988).

## 7.2. *Interacciones con fármacos no cardiovasculares*

### 7.2.1. Interacciones con Bloqueantes Neuromusculares

Los antagonistas del calcio aumentan el bloqueo neuromuscular inducido por distintos tipos de relajantes neuromusculares (bloqueantes competitivos, despolarizantes y aminoglucósidos). Esta interacción ha sido estudiada con experimentos "in vitro" e "in vivo" (Jones, 1984; Baeyens y Del Pozo, 1988; Bikhazi et al., 1988).

En general, se ha demostrado que diferentes tipos de antagonistas del calcio potencia el efecto de varios bloqueantes neuromusculares competitivos. Así, verapamil potencia la parálisis muscular inducida con pancuronio en preparaciones aisladas de nervio ciático-músculo sartorio de ranas (Kraynack et al., 1983b), así como el bloqueo neuromuscular producido por tubocurarina, pancuronio y gallamina en preparaciones aisladas de pollo (Adams et al., 1985; Wali, 1986) y el bloqueo inducido con vecuronio, atracurio y pancuronio en preparaciones frénico- hemidiafragma de ratas (Bikhazi et al., 1982; Ilias y Steienbereithner, 1985; Salvador et al., 1988). La parálisis muscular inducida con pancuronio en esta misma preparación también fue potenciada por otros antagonistas del calcio, tales como diltiazem, nicardipina y flunarizina (Salvador et al., 1988; Del Pozo y Baeyens, 1989).

Por otro lado, el bloqueo neuromuscular inducido por suxametonio (relajante muscular despolarizante) se potenció con verapamil, diltiazem y flunarizina pero no se modificó con

nicardipina en frénico-hemidiafragma aislado de rata (Salvador et al., 1985; Del Pozo y Baeyens, 1989); sin embargo, otros autores trabajando mediante test electrofisiológicos en otro tipo de preparación (músculo pectoral cutáneo de ranas) si encontraron potenciación de los efectos de succinilcolina por nicardipina, la cual incluso fue superior que la que depararon verapamil y bepridil (Adam y Henderson, 1986b).

"In vivo" también ha sido estudiada la interacción de los antagonistas del calcio y los relajantes neuromusculares. Verapamil potencia los efectos de vecuronio, d-tubocurarina y pancuronio en ratas (Bikhazi et al., 1983), conejos (Durant et al., 1984) y gatos (Anderson y Marshall, 1985; Carpenter y Mulroy, 1986). Estos relajantes neuromusculares también son potenciados por nifedipina (Bikhazi et al., 1988).

Las abundantes descripciones que existen en la literatura de interacciones entre bloqueantes competitivos y antagonistas del calcio, contrastan con la escasez de datos concernientes al efecto de estos agentes en el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina. Los resultados de Durant et al. (1984) demuestran que verapamil aumenta los efectos que una infusión continua de succinilcolina produce en conejos. Sin embargo, Anderson y Marshall (1985) no obtuvieron modificaciones de los efectos de succinilcolina administrada en bolos tras el tratamiento previo con bepridil.

Por otro lado los antagonistas del calcio verapamil, diltiazem, nifedipina y flunarizina también producen un aumento dosis-dependiente del bloqueo neuromuscular inducido con antibióticos aminoglucósidos en preparaciones frénico-hemidiafragma de

ratas (Del Pozo y Baeyens, 1986, Del Pozo y Baeyens, 1989). No existen por el momento estudios que evaluen la posible potenciación por antagonistas del calcio del bloqueo neuromuscular inducido por aminoglucósidos "in vivo".

### 7.2.2. Interacciones con fármacos que actuan en el sistema nervioso central

Han sido descritas interacciones de los antagonistas del calcio con fármacos que afectan diferentes funciones cerebrales.

a) Interacciones con opiáceos

En primer lugar comentaremos las interacciones que los antagonistas del calcio pueden ocasionar con opiaceos, las cuales son fáciles de entender si se asume que en el mecanismo de acción de lmorfina se han implicado alteraciones del contenido intracelular de calcio, de forma que la administración aguda de ésta depara una disminución intracitoplásmica de calcio produciendose, por el contrario, un incremento de los niveles intracelulares de este catión tras administración crónica (Chapman y Wey, 1980). Por ello, no es de extrañar que la administración periférica de antagonistas del calcio de diferentes familias aumenten el efecto analgésico de morfina en varios test de analgesia (Benedek y Szikszay, 1984; Del Pozo et al., 1987; Contreras et al., 1988), disminuyendo, por otro lado, el desarrollo

de tolerancia a los efectos de la administración crónica de este opiáceo (Contreras et al., 1988).

Por otro lado, otros efectos de los opiáceos son también afectados por los antagonistas del calcio; así se ha descrito que potencian la hipotermia en ratas inmovilizadas mientras que antagonizan la hipertermia inducida por morfina y un agonista de receptores kappa en ratas con movimientos libres (Benedek y Szikszay, 1984; Pillai y Ross, 1986a; Pillai y Ross, 1986b).

Además los antagonistas del calcio pueden inhibir diversas manifestaciones de sindrome de abstinencia a morfina. Así, se ha demostrado en el sindrome de abstinencia inducido con naloxona "in vitro" un efecto inhibitorio de los antagonistas del calcio, verapamil y diltiazem, siendo el efecto de éste último esteroselectivo. El agonista del canal del calcio Bay K 8644 se comportó de manera opuesta (Barrios y Baeyens, 1988).

Estos efectos se han confirmado "in vivo", donde diferentes antagonistas del calcio (diltiazem, verapamil, nimodipina y flunarizina) inhibieron el síndrome de abstinencia inducido con naloxona en roedores dependientes a la morfina (Bongianni et al., 1986; Baeyens et al., 1987; Caro et al., 1988).

b) Interacciones con anestésicos generales

Los antagonistas del calcio interaccionan con varios depresores del sistema nervioso central. Así, mediante experimentos realizados con animales de experimentación se comprobó que la potencia anestésica de pentobarbital y etanol aumentó tras

administración de verapamil, flunarizina y nitrendipina, aunque dosis altas de estos antagonistas del calcio no indujeron anestesia por ellos mismos. La naturaleza de esta interacción es dinámica, puesto que las dosis usadas de estos fármacos no variaron las concentraciones sanguíneas de pentobarbital y etanol a los 15 minutos y 2 horas respectivamente tras su administración (Dolin y Little, 1986).

Por otro lado, los anestésicos inhalatorios son un grupo de fármacos con acción depresora cardiovascular relacionada, al menos en parte, con la disminución del movimiento y/o transporte de calcio a través de las membranas extra e intracelulares (Reves et al., 1982). En relación con ésto se ha demostrado como halotano disminuyó la unión específica de dihidropiridinas (nitrendipina y nifedipina) a sus receptores, lo que sugiere que estos agentes interfieren con el canal del calcio (Blank et al., 1988).

Por todo ello no es de extrañar que los antagonistas del calcio potencien las acciones cardiodepresoras de estos fármacos. De hecho en pacientes tratados con verapamil, los anestésicos inhalatorios halotano, enfluorano e isofluorano, producen una mayor disminucion de la presión arterial y una prolongación del espacio P-R (Kapur et al., 1981). Experimentos "in vivo" confirmaron el efecto aditivo de verapamil y anestésicos inhalatorios sobre la disminución de la conducción y contractilidad cardíaca (Hill et al., 1988). Sin embargo, nifedipina influyó menos sobre estos parámetros aunque redujo marcadamente la presión arterial y la resistencia vascular en pacientes anestesiados con agentes inhalatorios (Jones, 1984).

Por último "in vitro" se ha demostrado una interacción de diltiazem y anestésicos inhalatorios, consistente en una depresión sinérgica de ambos sobre la contractilidad cardíaca. El orden de potenciación de los efectos de los anestésicos inhalatorios por diltiazem fue el siguiente: halotano ≥ enfluorano > isofluorano (Lynch, 1988).

Además de aumentar la depresión de la contractilidad cardíaca diltiazem inhibió las contracciones y evitó la fatiga muscular secundaria a hipertermia maligna inducida con halotano en músculo de cerdos susceptibles (Ilias et al., 1985). Este efecto también fue observado en tiras de músculo humano donde diltiazem revirtió no sólo las contracturas desarrolladas por halotano, sino también las inducidas con cafeína o la mezcla de ambos (Iwatsuki et al., 1983.)

Estos efectos también se observaron "in vivo" con verapamil, que retrasó la aparición de los signos de hipertermia maligna aparecidos en cerdos susceptibles tratados con halotano (Lukaitis et al., 1983). No obstante, la asociación de verapamil y dantroleno, fármaco de elección en el tratamiento de la hipertermia maligna, puede ser peligrosa por el riesgo de colapso vascular (Saltzman, 1984).

c) Interacciones con estimulantes del sistema nervioso central

Estudios "in vitro" han demostrado que fenciclidina aumentó la afinidad de varias dihidropiridinas por los sitios de unión de 3H-nitrendipina en el cerebro, mientras que la afinidad de

verapamil y flunarizina por estos sitios de unión apenas fue modificada y la capacidad de altas concentraciones de diltiazem para aumentar la unión de 3H-nitrendipina fue inhibida (Bolger et al., 1986a, Bolger et al., 1986b). Estas interacciones tienen lugar en el cerebro y no en tejidos periféricos (membranas cardíacas o musculares lisas) (Bolger et al., 1986c).

Los estudios "in vivo" dieron resultados contradictorios. Así algunos derivados dihidropiridínicos (nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina y PY 108 068) inhibieron en ratones la estimulación de la conducta inducida por fenciclidina; verapamil, diltiazem y D-600 la aumentaron y derivados de difenilpiperazinas (flunarizina, cinarizina y lidoflazina) no la modificaron (Grebb et al., 1985).

Sin embargo no todas las acciones de fenciclidina fueron igualmente afectadas, así nifedipina y verapamil no sólo no inhibieron sino que potenciaron significativamente el deterioro de la coordinación motora producida por fenciclidina (Bolger et al., 1986a).

Los antagonistas del calcio también interaccionan con algunos de los efectos inducidos por anfetaminas. Nifedipina y flunarizina (pero no verapamil ni otros derivados de dihidropiridinas y difenilpiperazinas) antagonizaron la estimulación locomotora inducida por anfetaminas en ratones; diltiazem por el contrario aumentó esta actividad locomotora (Grebb, 1986).

## 7.3. *Otras Interacciones*

Una interacción ampliamente estudiada y con posibles aplicaciones clínicas es la de antagonistas del calcio y antineoplásicos. Antagonistas del calcio de los grupos I-IV de la clasificación de la OMS son capaces de incrementar la eficacia citotóxica de alcaloides de la vinca, antraciclinas, derivados de la epipodofilotoxina, cisplatino y melfalan frente a células tumorales particularmente frente a las resistentes a los antineoplásicos (Baeyens, 1988).

La interacción cinética de verapamil con cimetidina aumenta la biodisponibilidad del primero cuando se administra oralmente, no variando el resto de los parámetros cinéticos (Smith et al., 1984).

Además es necesario tener en cuenta que se han observado interacciones galénicas entre verapamil y bicarbonato sódico, puesto que el antagonista del calcio precipita en una solución intravenosa de bicarbonato (Lewis, 1983).

# PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El ión calcio interviene a nivel de la unión neuromuscular tanto en el proceso de excitación-secreción del neurotransmisor, como en el de excitación-contracción muscular. Por ello no sería de extrañar que fármacos que alteran la disponibilidad intracelular de este catión, como hacen los antagonistas del calcio, ejercieran efectos a este nivel. De hecho el músculo esquelético es la preparación más rica en puntos de fijación específicos para diferentes antagonistas del calcio.

Por otro lado, el calcio participa en las acciones de los bloqueantes neuromusculares, puesto que revierte marcadamente los efectos del bloqueante competitivo pancuronio y parcialmente los del despolarizante succinilcolina. El bloqueo neuromuscular inducido con estos agentes también disminuye con 4-aminopiridinas, las cuales, estimulando el influjo de calcio aumentan la liberación del neurotransmisor. En este sentido se podría esperar que los antagonistas del calcio, disminuyendo el influjo de calcio, potenciaran los efectos de los bloqueantes neuromusculares.

El estudio de esta posible interacción parece interesante, no sólo porque contribuye a ampliar el conocimiento de los efectos de los antagonistas del calcio en placa motora, sino también por su posible interés clínico (salvando las diferencias que entraña la extrapolación de datos de la investigación animal al hombre), ya que el uso terapeútico de estos agentes esta cada vez más extendido.

Por todas estas razones nos planteamos realizar un trabajo experimental con gatos "in vivo" con los siguientes objetivos:

1) Conocer las acciones que los antagonistas del calcio de diversas familias, a saber, verapamil (difenilalquilaminas), nicardipina (dihidropiridinas) y diltiazem (benzotiazepinas) ejercen sobre las contracciones inducidas tras estimulación nerviosa en preparación nervio ciático-músculo tibial anterior.

2) Comparar los efectos de estos antagonistas del calcio sobre el bloqueo neuromuscular inducido por un bloqueante competitivo (pancuronio) y un bloqueante despolarizante (succinilcolina).

3) Caracterizar la posible participación de canales de calcio en las interacciones anteriores mediante la utilización de dos isómeros de diltiazem (*d-cis* y *l-cis*) con diferente capacidad para bloquear esos canales.

# MATERIAL Y METODOS

# I. MATERIAL

## I.1. ANIMALES

Se han utilizado gatos de ambos sexos con un peso comprendido entre 1.7-4 kg. Se les mantenía en jaulas individuales, dónde se les administraba agua y alimentos "ad libitum" hasta el momento del experimento.

## I.2. FARMACOS

### A. *Anestésicos*

**Clorhidrato de Ketamina** (Parke - Davis S.A.): se utilizó a una concentración de 100 mg/ml.

**Uretano** (Sigma): solución de 1 g/15 ml.

**α-Cloralosa** (Sigma): se preparó una solución de 100 mg/60 ml.

### B. *Fármacos estudiados*

**Bromuro de Pancuronio** (Organon Española S.A.): se realizó una solución de 50 µg/ml.

**Clorhidrato de Succinilcolina** (Andalucia Farmaceútica): solución de 100 µg/ml.

**Clorhidrato de Verapamil** (Laboratorios Knoll-Made S.A.): se usó una solución de 2.5 mg/ml.

**Clorhidrato de *d-cis* Diltiazem** (Laboratorios Dr. Esteve S.A.): se preparó una solución de 2.5 mg/ml.

**Clorhidrato de *l-cis* Diltiazem** (Laboratorios Dr. Esteve S.A.): se realizó una solución de 2.5 mg/ml.

**Clorhidrato de Nicardipina** (Syntex - Latino): se utilizó una solución de 2.5 mg/ml.

Todos los fármacos fueron disueltos en agua desmineralizada. Nicardipina fue especialmente protegida de la luz tanto durante su preparación como su administración, por ser un fármaco que se degrada tras exposición a la luz natural.

## I.3. APARATOS Y MATERIAL FUNGIBLE

Respirador Manley Servovent modelo MS

Bala de aire purificado con manómetros para regular la presión de salida y sistemas de conducción del aire

Electrodo de estimulación eléctrica HARVARD 50-6899

Estimulador electrónico Letica LI 12100

Transductor isométrico Letica TRI 012

Polígrafo Letica Uni - Graph 1000 - 100 ISO

Sistemas de soporte para electrodo y transductor

Bombilla de infrarrojos Tungsram 6 de 250 watios

Bomba de infusión Harvard modelo 975

Laringoscopio y tubos endotraqueales para intubación.

Instrumental de disección: bisturí, tijeras de diversos tamaños, pinzas de disección, pinzas de hemostasia y porta-agujas.

Suturas y ligaduras de seda

Catéteres de diversos tamaños

Jeringas de 1, 2, 10 y 20 ml

Sistema de microgoteo de suero

## II. METODO

### II.1. DISECCION Y MONTAJE DE LA PREPARACION

Inicialmente se anestesiaron los gatos con un bolo de ketamina intramuscular de 100 mg/kg seguido de una dosis de α-cloralosa de 7.5 mg/kg y otra de uretano de 160 mg/kg ambos por vía intravenosa. La anestesia se mantuvo con bolos intravenosos intermitentes de α-cloralosa y uretano según las necesidades.

Tras la intubación traqueal el animal fue ventilado con aire purificado por medio de un respirador mecánico a una frecuencia de 26 emboladas/minuto y un volumen respiratorio de 25 - 30 ml/kg.

La temperatura del animal se mantuvo constante durante todo el experimento por medio de una lámpara de rayos infrarrojos de 250 watios.

Despues de disecar la vena yugular externa izquierda se cateterizó, manteniendose una perfusión de suero fisiológico o glucosalino a un ritmo de 11 microgotas/minuto, utilizándose esta vía para la administración de los anéstesicos intravenosos y de los fármacos estudiados.

A continuación, se realizó una incisión en la cara externa del tercio inferior del muslo y disección muscular de esta zona; una vez visualizado el nervio ciático común, se liberó del tejido conectivo del alrededor y se aisló su rama externa que fue conectada al electrodo de estimulación eléctrica.

Posteriormente por medio de una incisión en la cara anterior de la pierna desde la rodilla al tobillo, se disecó el músculo tibial anterior liberándolo de su fascia; una vez seccionado el ligamento transverso del tobillo, respetando la vascularización de la zona, se aisló el tendón de inserción del músculo tibial anterior, el cual se seccionó y conectó por medio de una ligadura de seda a un transductor isométrico.

Tanto el nervio como el músculo se bañaron en parafina líquida para evitar la pérdida de calor.

Para asegurar la estabilidad de la preparación se inmovilizó la pierna del animal en su parte más baja.

## II.2. ESTIMULACION Y REGISTRO

La contracción del músculo tibial anterior fue provocada por estimulación eléctrica, a lo largo de todo el experimento, del nervio ciático externo con pulsos rectangulares de 0.2 mseg de duración y una frecuencia de 0.1 Hz, aplicándosele un

voltaje supramáximal (5-10 voltios), de acuerdo con el método descrito por Anderson y Marshall (1985).

La amplitud de las contracciones musculares fue registrada graficamente por un polígrafo conectado al transductor y su altura fue proporcional a la fuerza de la contracción; la línea de base de la contracción muscular permaneció estable manteniendo una tensión permanente de 30 gramos.

La preparación se mantuvo bajo estimulación continua durante 30-60 minutos, para conseguir la estabilización de la contracción, antes de proceder a la administración de los fármacos estudiados.

También se realizó una estimulación eléctrica "tren de cuatro" de 2 seg de duración, consistente en cuatro estímulos de 0.2 mseg cada uno con un voltaje supramaximal, según el método descrito por Ali (1985).

## II.3. ADMINISTRACION DE FARMACOS

Pancuronio fue administrado por vía intravenosa, en dosis acumulativas de 1 a 4 µg/kg. Cada nueva dosis se inyectaba cuando la anterior había alcanzado su bloqueo máximo y antes de que empezara a recuperarse.

Succinilcolina se administró de dos formas: mediante infusión continua con cambios de velocidad y en bolos repetidos. La infusión continua de succinilcolina (100 µg/ml) se realizó por vía intravenosa aumentando la velocidad de dicha infusión cada diez minutos; el rango en la velocidad de infusión fue de 3.9-21 µl/min.

Los bolos de succinilcolina se inyectaron también por vía intravenosa, en un rango de dosis de 20-70 µg/kg. Tras la administración de un bolo, se esperaba la recuperación del mismo antes de administrar el siguiente.

Tanto con pancuronio como con succinilcolina, en sus dos formas de administración, se usaron las dosis necesarias hasta conseguir un 85-90 % de bloqueo; después se dejó un tiempo hasta recuperar la contracción a una altura similar a la de las contracciones control. En el caso de pancuronio este tiempo fue de 1.30-2 horas, mientras que para succinilcolina en infusión continua fue de 30-45 minutos y en el caso de los bolos de succinilcolina, el tiempo de recuperación varió según las dosis administradas y el porcentaje de bloqueo alcanzado, desde 15-45 min.

Una vez conseguida la nueva estabilización de las contracciones, se administraron los antagonistas del calcio verapamil, diltiazem (*d-cis* y *l-cis*) y nicardipina, en dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg, vía intravenosa durante un tiempo de 2-3 minutos. A los 7-9 minutos de una de estas dosis se volvieron a administrar pancuronio o succinilcolina en la forma ya indicada y hasta la dosis que produjo el 85-90% de bloqueo tras lo cual se dejó que se recuperara nuevamente la contracción.

De esta forma, de cada preparación se obtuvieron dos curvas dosis-respuesta, la primera considerada control, refleja el efecto del bloqueante neuromuscular por sí solo y la otra considerada tratamiento representa el efecto del bloqueante neuromuscular tras administración previa de alguno de los antagonistas del calcio estudiados.

## III. REPRESENTACION GRAFICA. ESTADISTICA

En las representaciones gráficas de los datos el efecto bloqueante se expresó como porcentaje del descenso en la altura de las contracciones observado en relación con la altura de la contraccion control, calculándose de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ bloqueo} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde T representa la altura de la contracción despues del tratamiento y C la altura de la contracción control.

Las $DE_{50}$ (dosis del relajante que produce el 50% de bloqueo) fueron calculadas a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta según el método computarizado de Tallarida y Murray (1987), el cual utiliza la porción de la sigmoide comprendida entre un 16 y un 84% del efecto máximo para realizar los cálculos. También fue usado este método para hacer comparaciones entre las pendientes de las rectas, con el objeto de comprobar si se comportaban o no como rectas paralelas. Igualmente se utilizó para determinar las razones de potencia entre las $DE_{50}$ antes y despues del tratamiento, de acuerdo con la fórmula, Razón de potencia = T/C, siendo T la $DE_{50}$ de la asociación bloqueante neuromuscular + antagonista del calcio y C la $DE_{50}$ control del bloqueante neuromuscular por sí solo.

Las comparaciones entre las $DE_{50}$ posterior al tratamiento con la previa al tratamiento con el antagonista del calcio se realizaron mediante el test de la "t" de Student para muestras apareadas.

La comparación entre las razones de potencia del bloqueo neuromuscular producido por dos tratamientos diferentes se realizó por medio del test de la "t" de Student para muestras independientes. Cuando se compararon más de dos tratamientos diferentes, se aplicó el test de Newman-Keuls.

Para comprobar la homogeneidad del grupo control (ya que cada animal tenía su propio control), se realizó una comparación de las $DE_{50}$ de los controles mediante el test de Newman-Keuls.

La diferencia entre dos o más valores se consideró significativa cuando "p" fue inferior a 0.05.

# RESULTADOS

En esta sección se describirán los efectos de la interacción de los antagonistas del calcio con los bloqueantes neuromusculares. Es necesario hacer constar en primer lugar que verapamil, *d-cis* diltiazem, *l-cis* diltiazem y nicardipina, a las dosis estudiadas (0.1 y 0.5 mg/kg) no modificaron la altura de la contracción muscular.

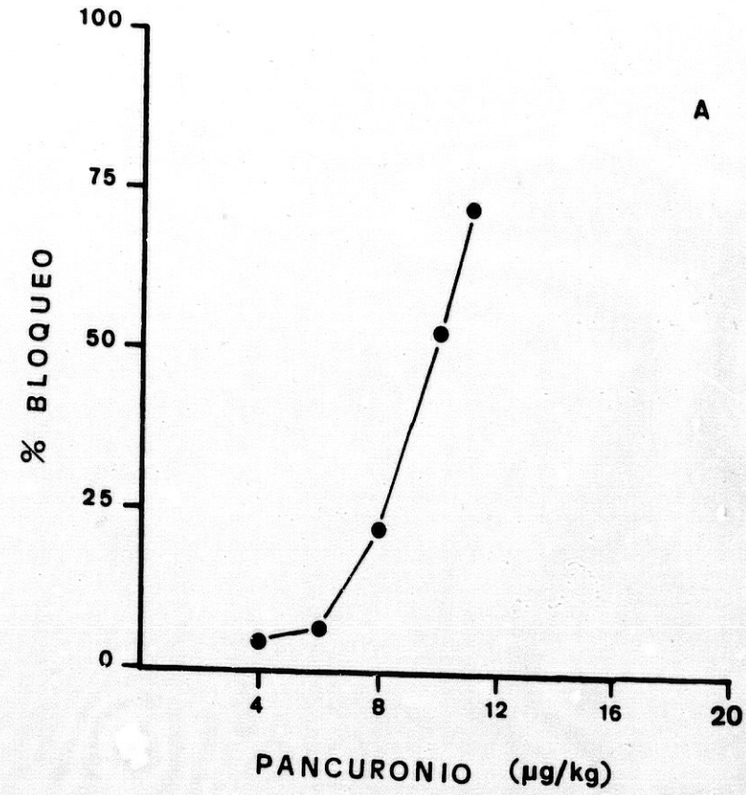
## I. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO

### I.1. *Efectos de pancuronio*

Como era de esperar pancuronio produjo una reducción de la altura de la contracción muscular dosis-dependiente (fig. 1 A). El bloqueo neuromuscular que este fármaco indujo era de tipo competitivo como lo sugiere el análisis de la contracción muscular tras estimulación con trenes de cuatro. Así, se observó una disminución progresiva de la altura de las contracciones durante el tren de cuatro y una desaparición de la 4ª respuesta cuando el bloqueo alcanzó el 70% (fig 1 B y C).

Dado que con cada animal se obtenía una curva dosis-respuesta control de pancuronio, las $DE_{50}$ controles de pancuronio antes de proceder a la asociación con el antagonista del calcio en estudio, eran diferentes para cada experimento. Sin embargo, al comparar las medias de las $DE_{50}$ de pancuronio de cada grupo de

controles, no se obtuvieron diferencias significativas. Por ello, se pudo calcular un valor medio común; la media ± SE de las dosis que producían un 50% de bloqueo ($DE_{50}$) fue de 14.78 ± 1.19 µg/kg.




B

| % BLOQUEO | 0 % | 15 % | 35 % | 45 % | 55 % | 70 % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $R = T_4 / T_1$ | 0.95 | 0.88 | 0.84 | 0.57 | 0.38 | – |

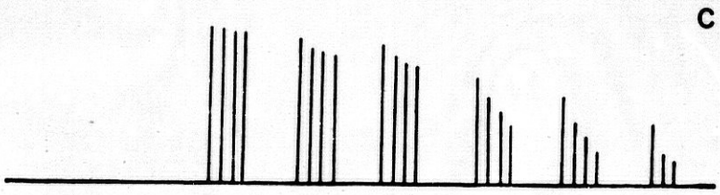



Fig. 1. Bloqueo neuromuscular inducido con dosis acumulativas de pancuronio (A). Relación entre el % de bloqueo y el cociente entre la 4ª y la 1ª respuesta del tren de cuatro (B). Contracciones obtenidas tras estimulación con tren de cuatro para cada % de bloqueo (C).

## I.2. *Efectos de verapamil asociado a pancuronio*

El tratamiento previo con verapamil (0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg) aumentó el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio produciendo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta obtenida con este relajante. La utilización de dos dosis diferentes de verapamil dio lugar a desplazamientos paralelos de las curvas dosis-respuesta y proporcionales a las dosis utilizadas (fig. 2 A y B).

La $DE_{50}$ de pancuronio disminuyó desde 10.59 ± 2.31 µg/kg en la curva considerada control, hasta 7.82 ± 1.69 µg/kg cuando se administró previamente 0.1 mg/kg de verapamil y desde 18.89 ± 3.67 µg/kg hasta 12.05 ± 2.29 µg/kg cuando la dosis de antagonista del calcio fue de 0.5 mg/kg (fig. 3 A y B).

La comparación de las $DE_{50}$ de pancuronio solo y asociado a verapamil fue estadisticamente significativa tanto para la dosis de 0.1 mg/kg ($p<0.05$) como para 0.5 mg/kg de verapamil ($p<0.01$) (fig. 3 A y B).

En resumen, verapamil (0.1 y 0.5 mg/kg) potenció significativamente y de una manera dosis-dependiente el bloqueo neuromuscular producido por pancuronio.

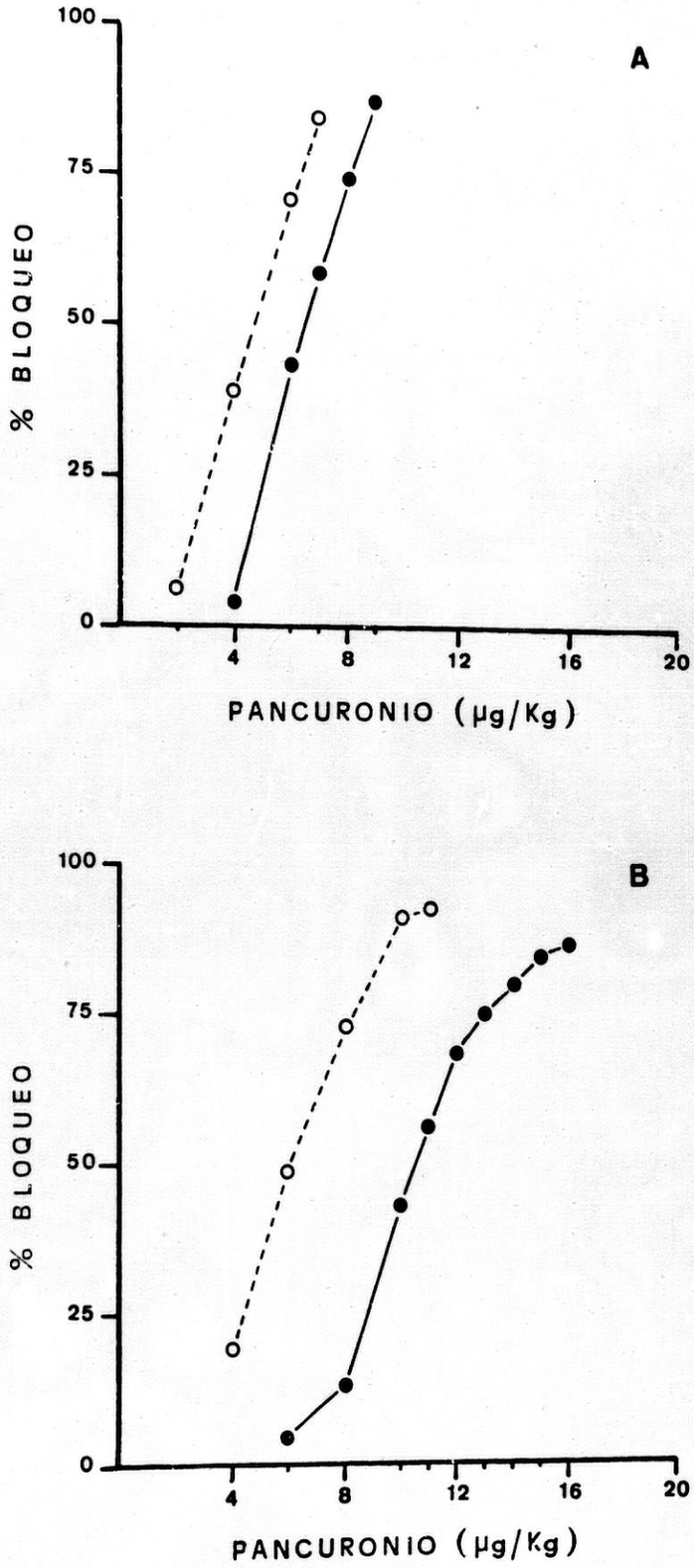



Fig. 2. Bloqueo neuromuscular inducido con dosis acumulativas de pancuronio solo (●——●) y asociado a verapamil (O----O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

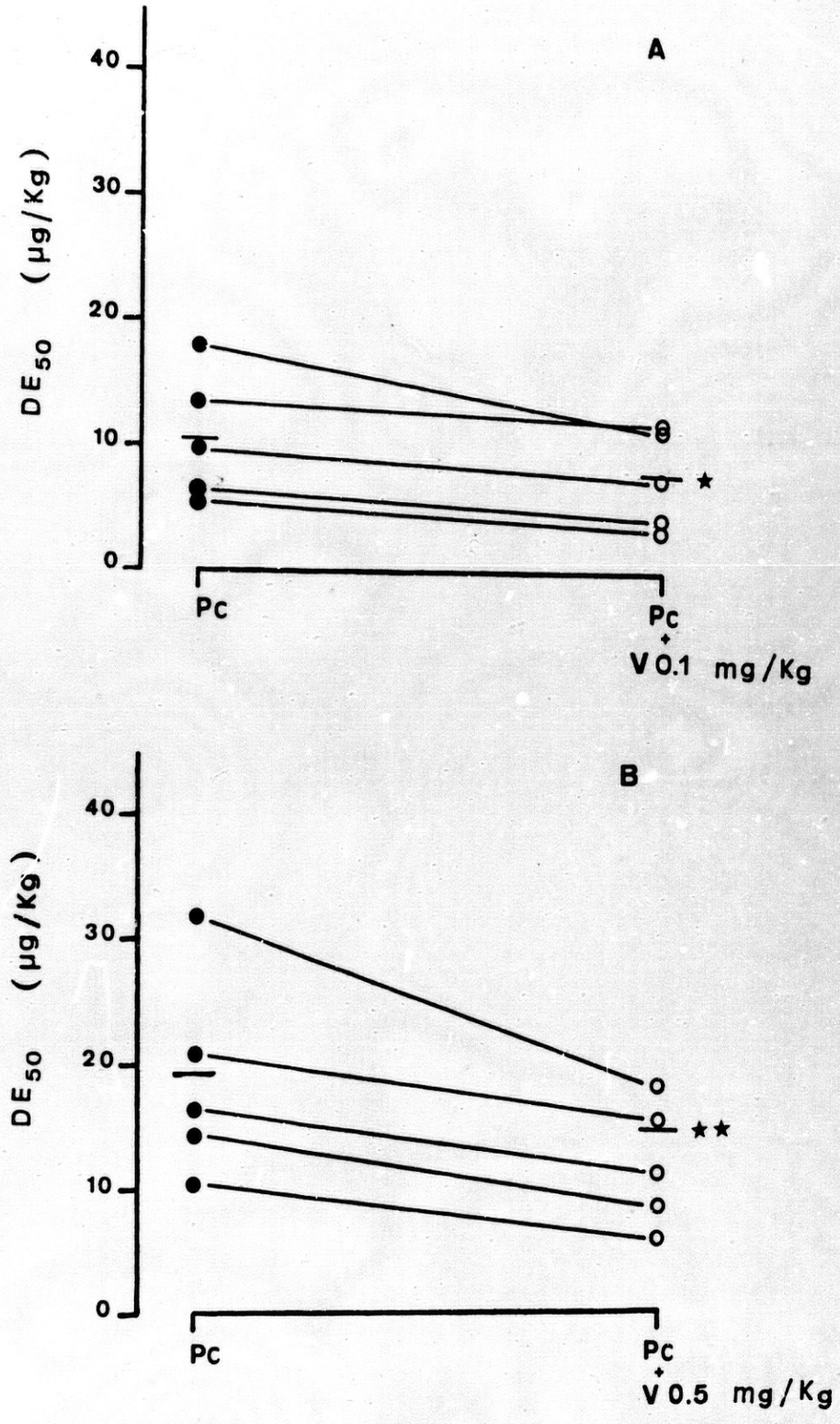


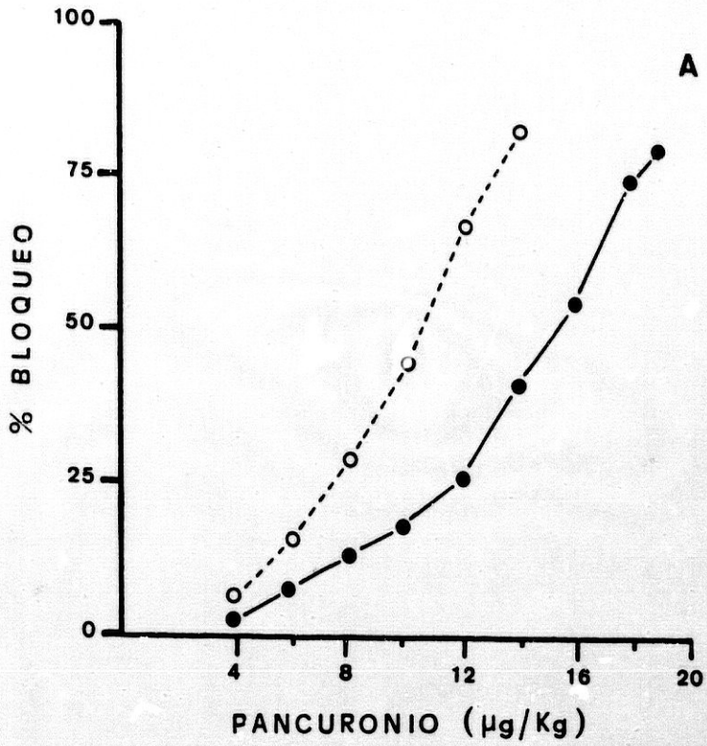

Fig. 3. Valores de $DE_{50}$ de pancuronio solo (●) y asociado a verapamil (○) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a pancuronio solo: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

## I.3. *Efectos de d-cis diltiazem asociado a pancuronio*

La administración previa de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem produjo desplazamientos paralelos hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio. Este desplazamiento fue proporcional a la dosis de *d-cis* diltiazem utilizada (fig. 4 A y B).

La $DE_{50}$ de pancuronio disminuyó significativamente ($p<0.01$) tras el tratamiento previo con 0.1 mg/kg de *d-cis* diltiazem (de 11.84 ± 2.7 µg/kg a 7.52 ± 1.79 µg/kg) y 0.5 mg/kg de este mismo antagonista del calcio (de 11.66 ± 1.91 µg/kg a 6.57 ± 1.26 µg/kg) (fig. 5 A y B).

En resumen, tanto 0.1 mg/kg como 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem aumentaron significativamente el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio.



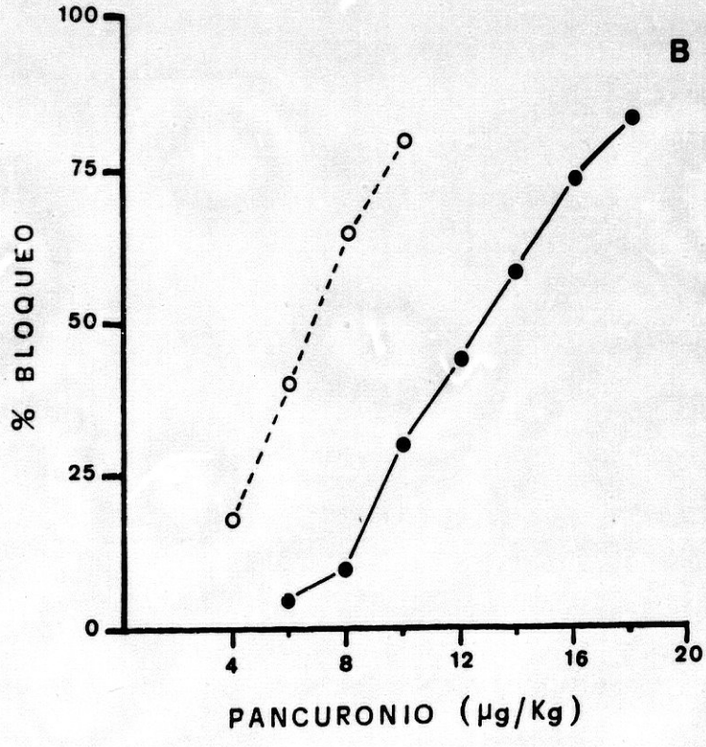




Fig. 4. Bloqueo neuromuscular inducido con dosis acumulativas de pancuronio solo (●—●) y asociado a *d-cis* diltiazem (o---o) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

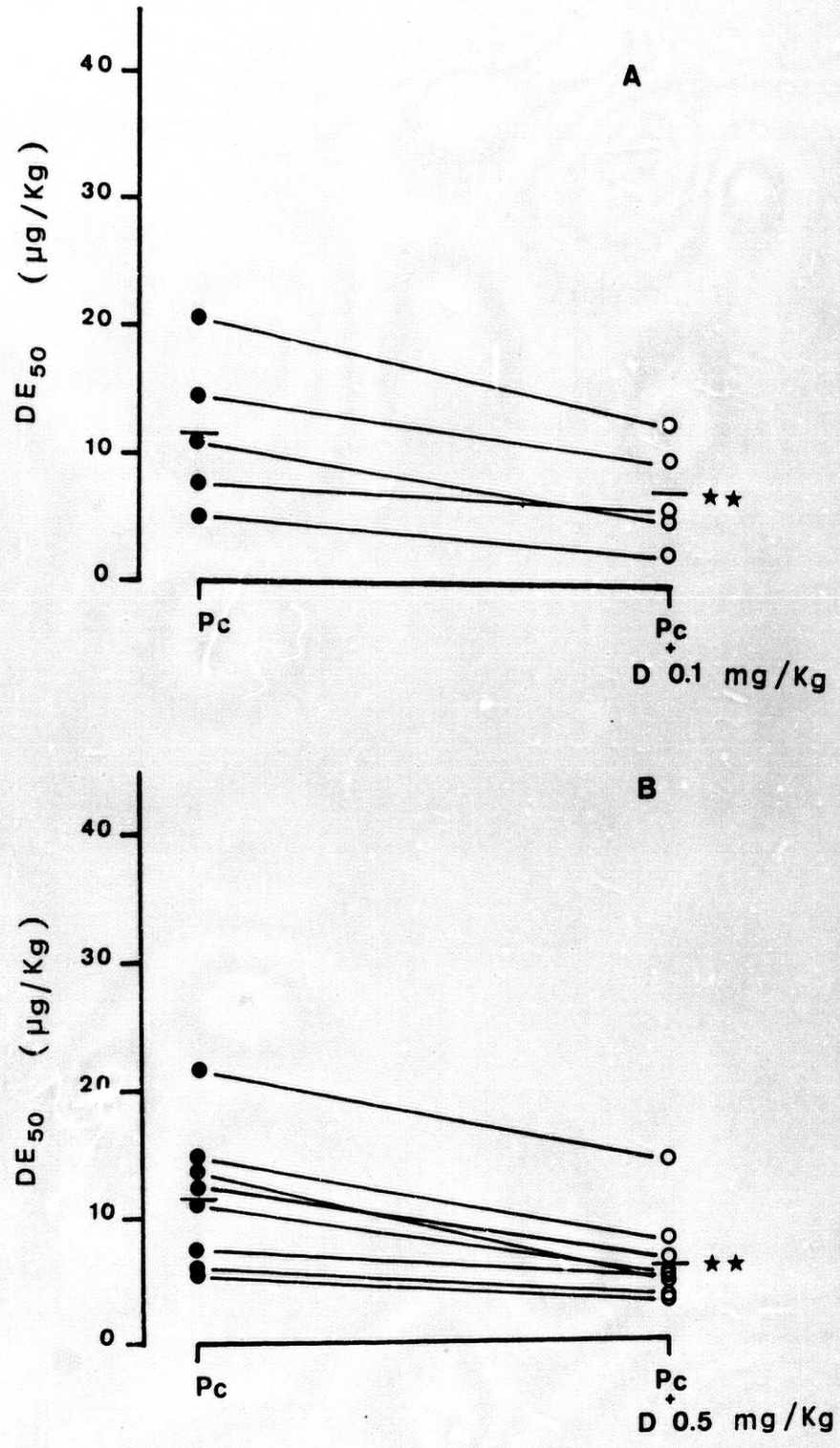



Fig. 5. Valores de $DE_{50}$ de pancuronio solo (●) y asociado a *d-cis* diltiazem (o) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a pancuronio solo: ** = $p<0.01$.

## I.4. *Efectos de nicardipina asociada a pancuronio*

La asociación de diferentes dosis de nicardipina (0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg) a pancuronio originó desplazamientos paralelos hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta de pancuronio de una forma dosis-dependiente (fig. 6 A y B).

La $DE_{50}$ de pancuronio fue mayor que la $DE_{50}$ de pancuronio asociado a 0.1 mg/kg de nicardipina (de 18.83 ± 2.82 µg/kg a 9.27 ± 1.12 µg/kg) y que la de pancuronio más 0.5 mg/kg de este antagonista del calcio (de 18.7 ± 2.89 µg/kg a 8.03 ± 0.86 µg/kg). La comparación de estas $DE_{50}$ fue estadisticamente significativa ($p<0.01$) tanto para la dosis de 0.1 mg/kg como para 0.5 mg/kg de nicardipina (fig. 7 A y B).

En resumen, nicardipina en dosis de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg potenció significativamente el bloqueo neuromuscular producido por pancuronio.

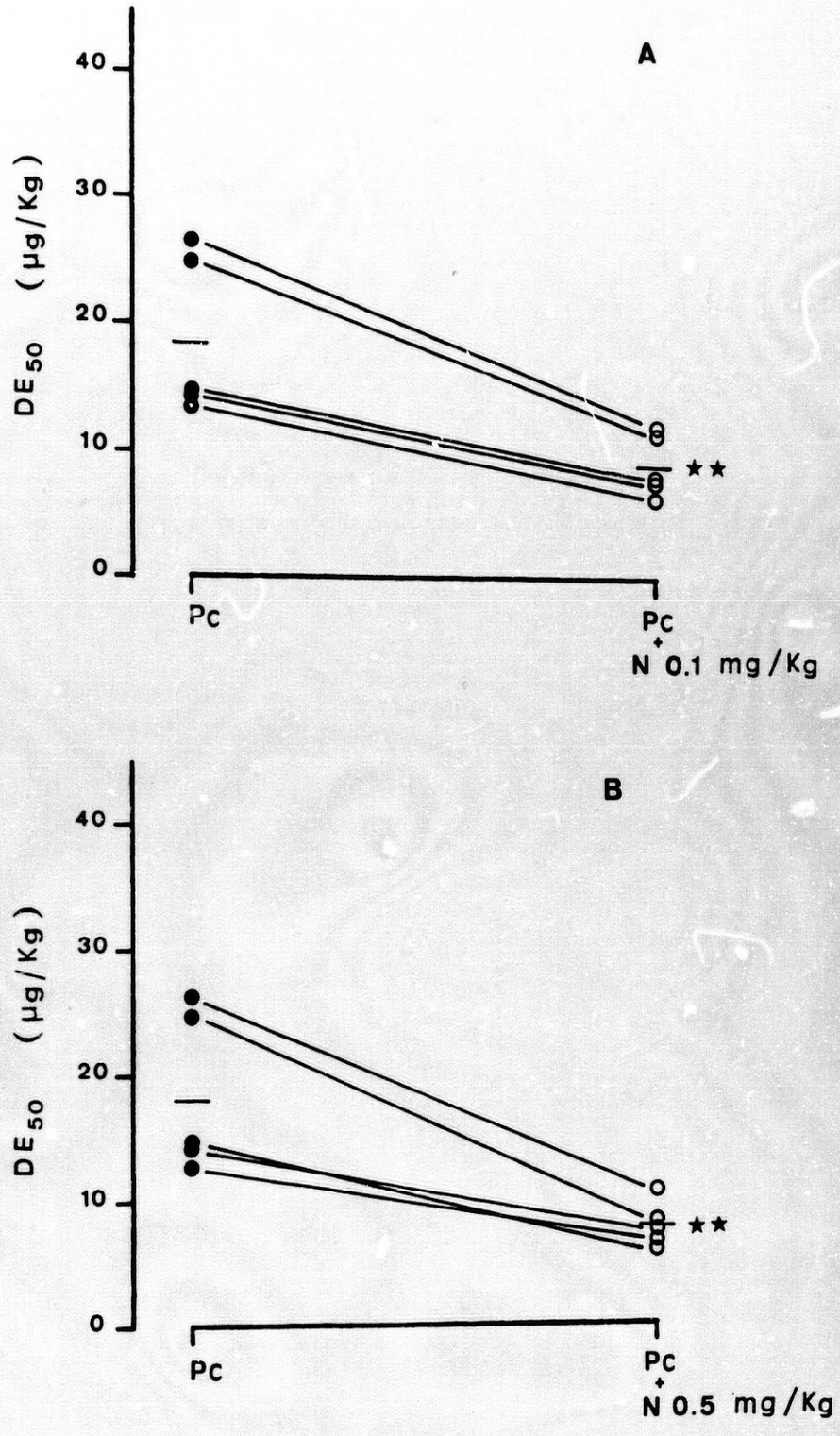



Fig. 7. Valores de $DE_{50}$ de pancuronio solo (●) y asociado a nicardipina ( O ) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a pancuronio solo: ** = $p < 0.01$.

## I.5. *Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio*

Los tres antagonistas del calcio estudiados a las dosis de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg produjeron una potenciación significativa del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio. Así se puede comprobar en la fig. 8 cómo las razones de potencia fueron en todos los casos superiores a la unidad.

Los efectos de *d-cis* diltiazem y verapamil no fueron estadísticamente diferentes entre sí; sin embargo, fueron significativamente inferiores a los de las respectivas dosis de nicardipina, siendo pues el orden de potencia: nicardipina > verapamil = diltiazem (fig. 8).

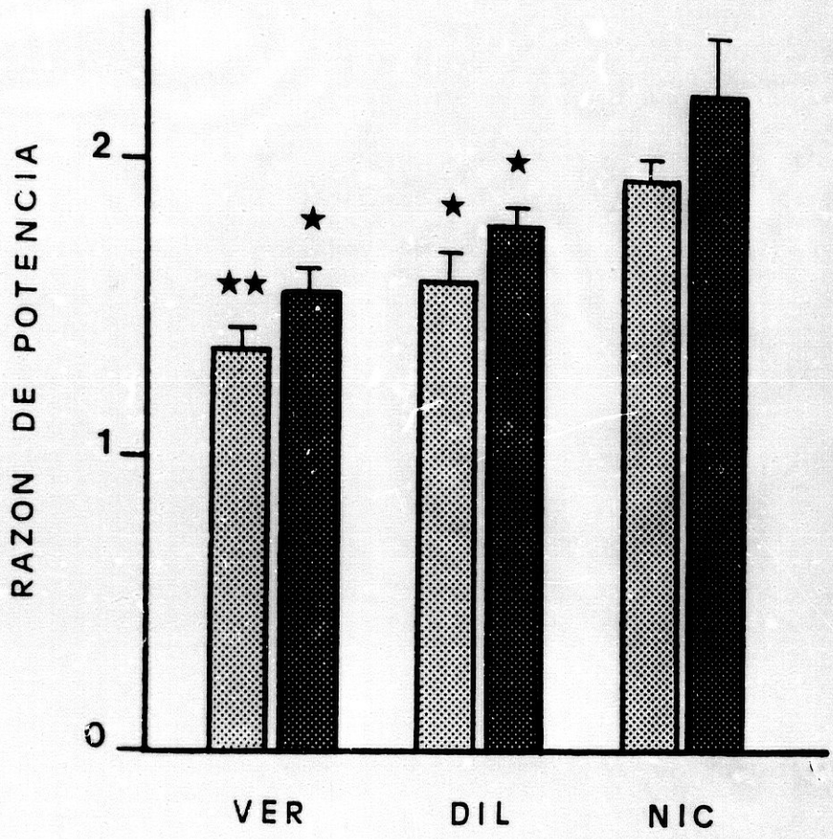



Fig. 8. Potenciación por verapamil (VER), *d-cis* diltiazem (DIL) y nicardipina (NIC), 0.1 mg/kg ( ▒ ) y 0.5 mg/kg ( ■ ) del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio. Diferencias significativas con la dosis equivalente de nicardipina: * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$.

## I.6. *Comparacion de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a pancuronio*

El isómero *l-cis* de diltiazem, en dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg aumentó significativamente ($p<0.05$) el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio (fig. 9 A y B). Comportándose, pues de modo similar al isómero *d-cis* (fig. 5). Sin embargo, es importante resaltar que el efecto de 0.1 mg/kg de *d-cis* diltiazem fue significativamente mayor que el de la misma dosis de *l-cis* diltiazem ($p<0.01$). Igualmente sucedió para las dosis de 0.5 mg/kg de ambos isómeros ($p<0.05$) (fig. 10).

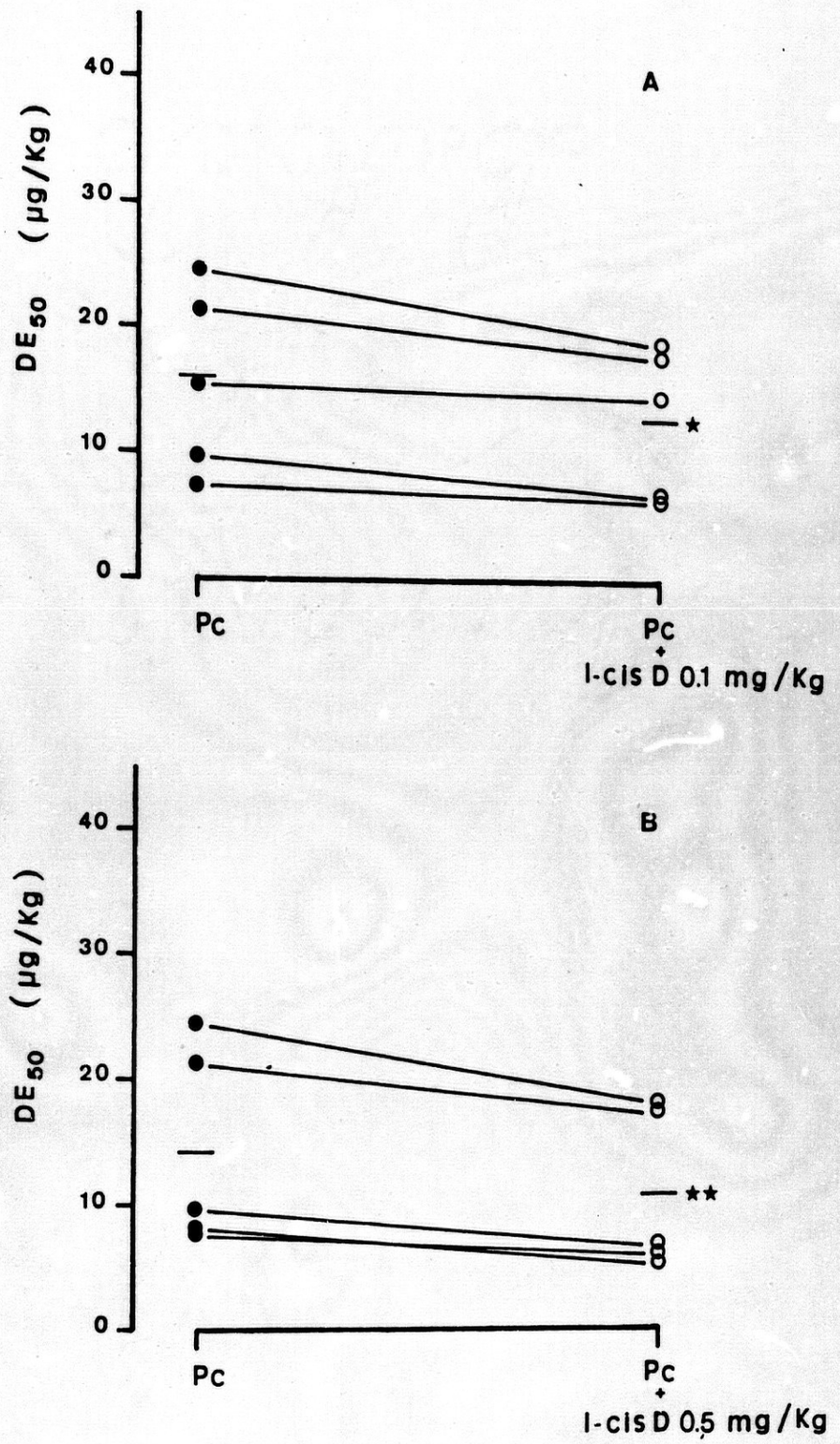



Fig. 9. Valores de $DE_{50}$ de pancuronios solo ( ● ) y asociado a *l-cis* diltiazem ( O ) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a pancuronio solo: * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$.

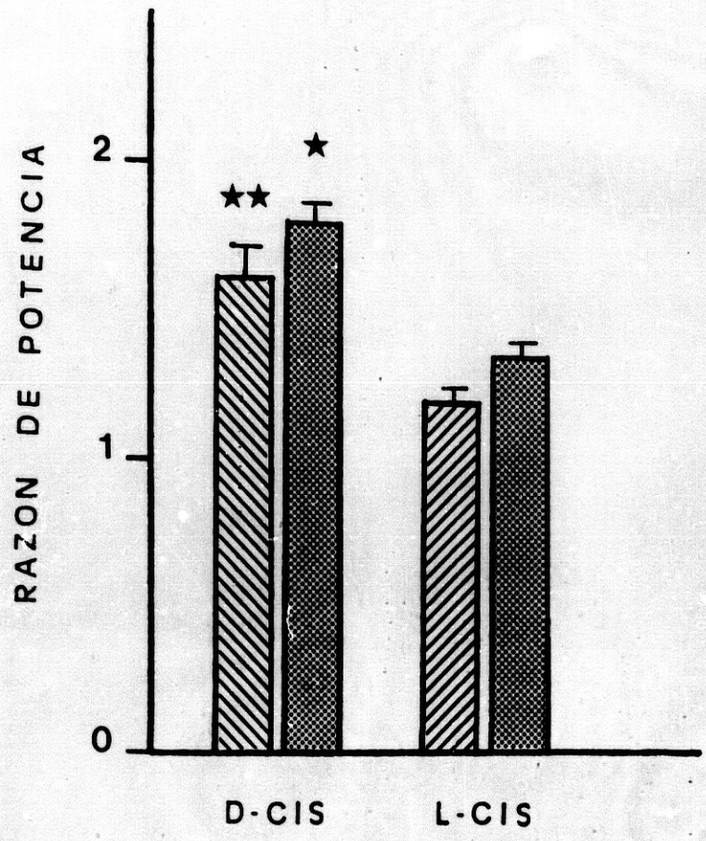



Fig. 10. Potenciación por ambos isómeros de diltiazem, 0.1 mg/kg ( ▨ ) y 0.5 mg/kg ( ▩ ) del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio. **Diferencias** significativas entre D-cis y L-cis: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

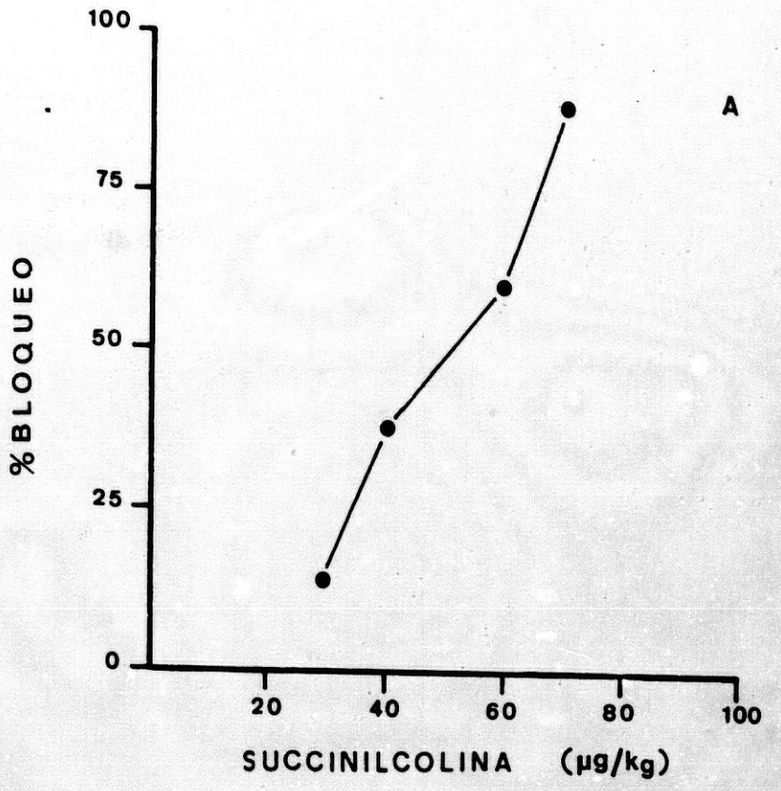
## II. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON INFUSION CONTINUA DE SUCCINILCOLINA

### II.1. *Efectos de la infusión continua de succinilcolina*

La administración de succinilcolina en infusión continua a diferentes velocidades, dio lugar a un bloqueo neuromuscular dosis-dependiente (fig. 11 A).

La infusión continua de succinilcolina indujo un bloqueo neuromuscular de tipo despolarizante puesto que siempre se observó la 4ª respuesta de una estimulación con tren de cuatro aún cuando el bloqueo alcanzó el 95%. Además el cociente entre la 4ª y la 1ª respuesta siempre fue superior a 0.7 para un bloqueo del 70% (fig. 11 B y C).

También con este relajante se obtuvo una curva dosis-respuesta de succinilcolina en cada animal, por lo que las $DE_{50}$ variaron de un experimento a otro aunque al hacer una comparación de las $DE_{50}$ de succinilcolina de cada grupo se comprobó que no existían diferencias significativas, por lo que se pudo calcular una $DE_{50}$ media de 83.8 ± 4.73 µg/kg.




B

| % BLOQUEO | 0 % | 10 % | 18 % | 30 % | 51 % | 74 % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $R = T_4 / T_1$ | 0.87 | 0.85 | 0.83 | 0.81 | 0.80 | 0.66 |

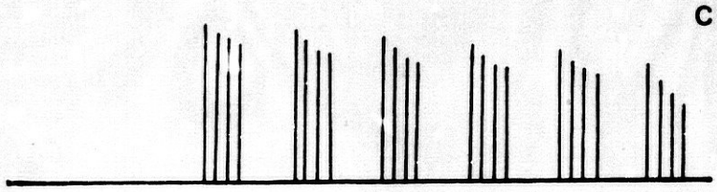



Fig. 11. Bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina (A). Relación entre el % de bloqueo y el cociente entre la 4ª y la 1ª respuesta del tren de cuatro (B). Contracciones obtenidas tras estimulación con tren de cuatro para cada % de bloqueo (C).

## II.2. *Efectos de verapamil asociado a succinilcolina en infusión continua*

El tratamiento previo con 0.1 y 0.5 mg/kg de verapamil potenció el bloqueo neuromuscular producido por succinilcolina, observándose desplazamientos hacia la izquierda proporcionales a la dosis de antagonista del calcio y paralelos a la curva dosis-respuesta del relajante (fig. 12 A y B).

La $DE_{50}$ de succinilcolina disminuyó significativamente ($p<0.01$) tanto tras administración previa de 0.1 mg/kg de verapamil (de 68.45 ± 6.55 µg/kg a 51.53 ± 4.33 µg/kg) como tras el pretratamiento con 0.5 mg/kg de este antagonista del calcio (de 70.99 ± 8.83 µg/kg a 44.24 ± 4.57 µg/kg) (fig. 13 A y B).

En resumen, verapamil, en dosis de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg potenció significativamente el bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina.

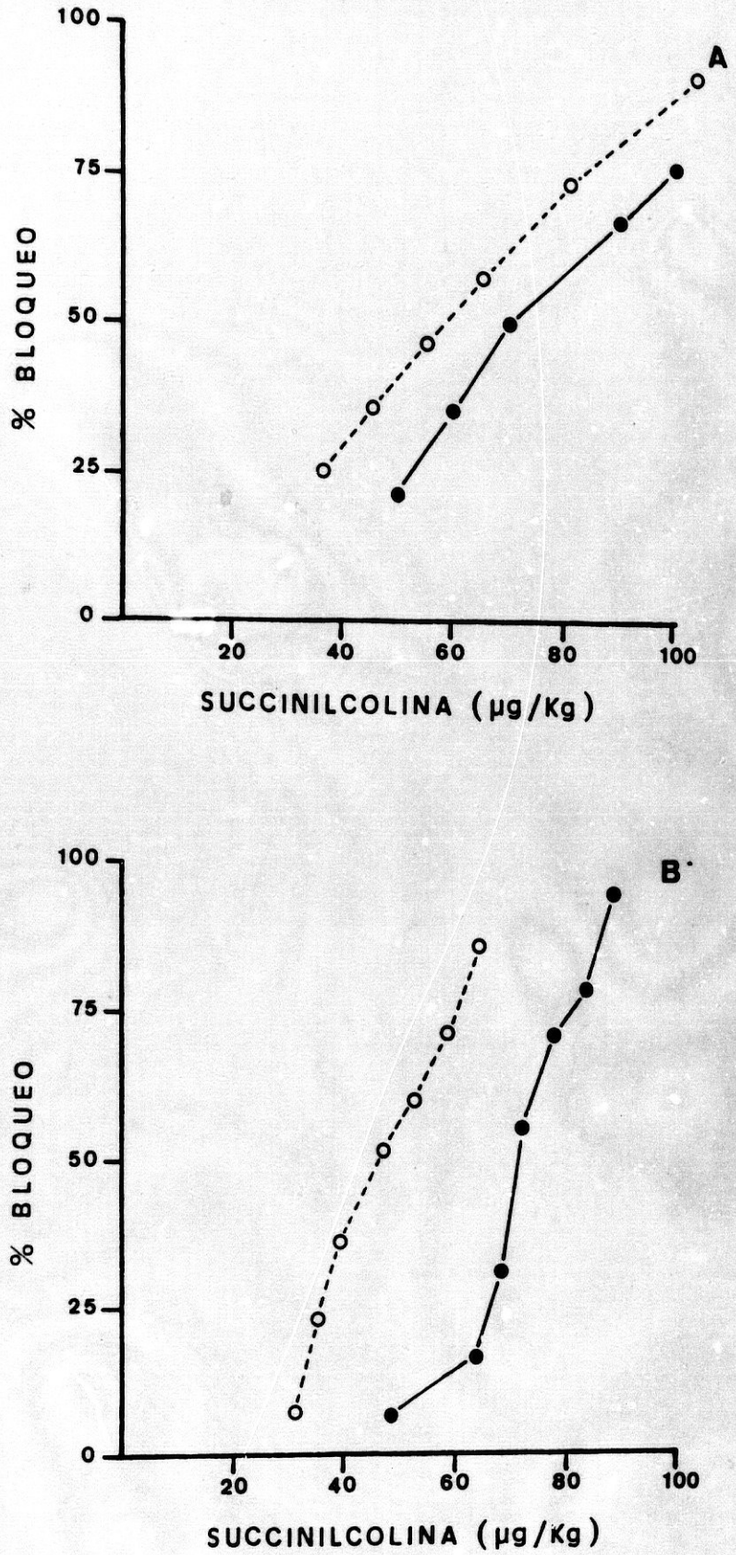



Fig. 12. Bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina sola (●——●) y asociada a verapamil (O- - -O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

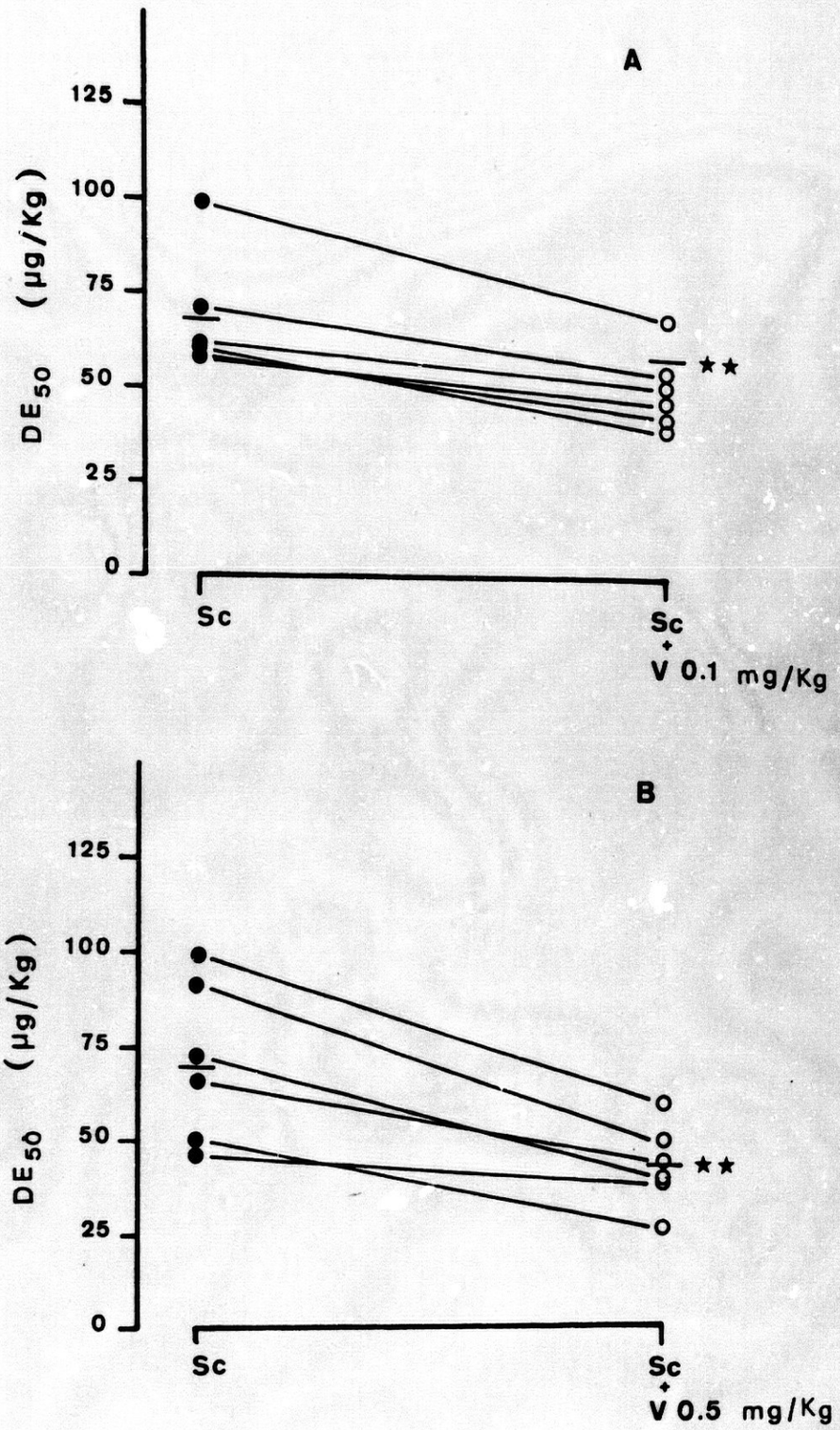



Fig. 13. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola en infusión continua (●) y asociada a verapamil (O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: ** = $p<0.01$.

## II.3. *Efectos de d-cis diltiazem asociado a succinilcolina en infusión continua*

La asociación de *d-cis* diltiazem (0.1 y 0.5 mg/kg) y succinilcolina en infusión continua provocó un aumento del bloqueo neuromuscular inducido con este relajante, lo cual se manifestó por desplazamientos hacia la izquierda paralelos a la curva dosis-respuesta obtenida con succinilcolina. Estos desplazamientos fueron dependientes de la dosis de antagonista del calcio (fig. 14 A y B).

La $DE_{50}$ de succinilcolina disminuyó de 83.45 ± 13.0 µg/kg a 54.98 ± 8.0 µg/kg cuando se asoció a *d-cis* diltiazem 0.1 mg/kg. Esta disminución fue significativa desde el punto de vista estadístico ($p<0.01$). Cuando se utilizó 0.5 mg/kg de este mismo antagonista del calcio se observó una disminución aún mayor de la $DE_{50}$ de succinilcolina (87.25 ± 10.43 µg/kg a 53.73 ± 7.28 µg/kg) (fig. 15 A y B).

En resumen, tanto la dosis de 0.1 mg/kg como la de 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem aumentaron significativamente el bloqueo neuromuscular producido por infusión continua de succinilcolina.

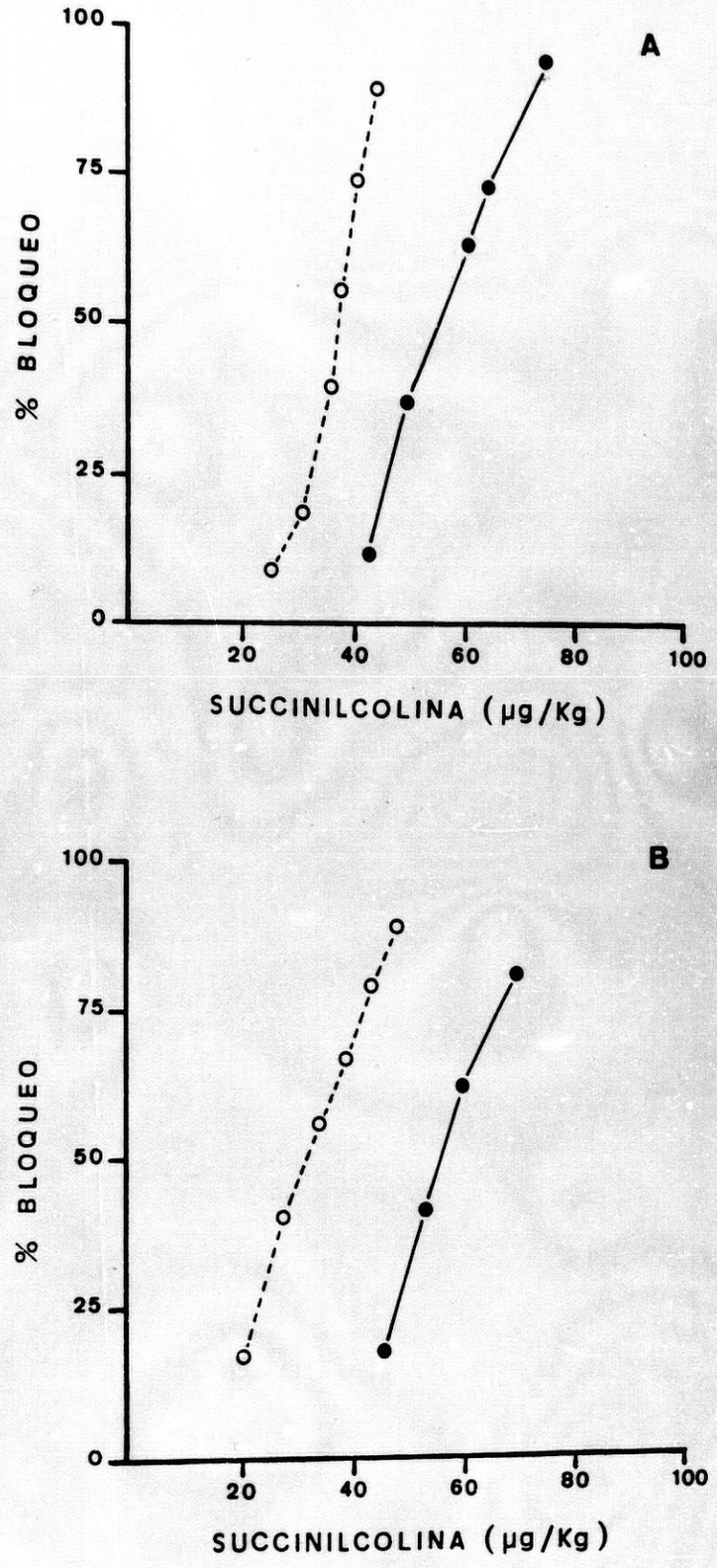



Fig. 14. Bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina sola (●——●) y asociada a *d-cis* diltiazem (o---o) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

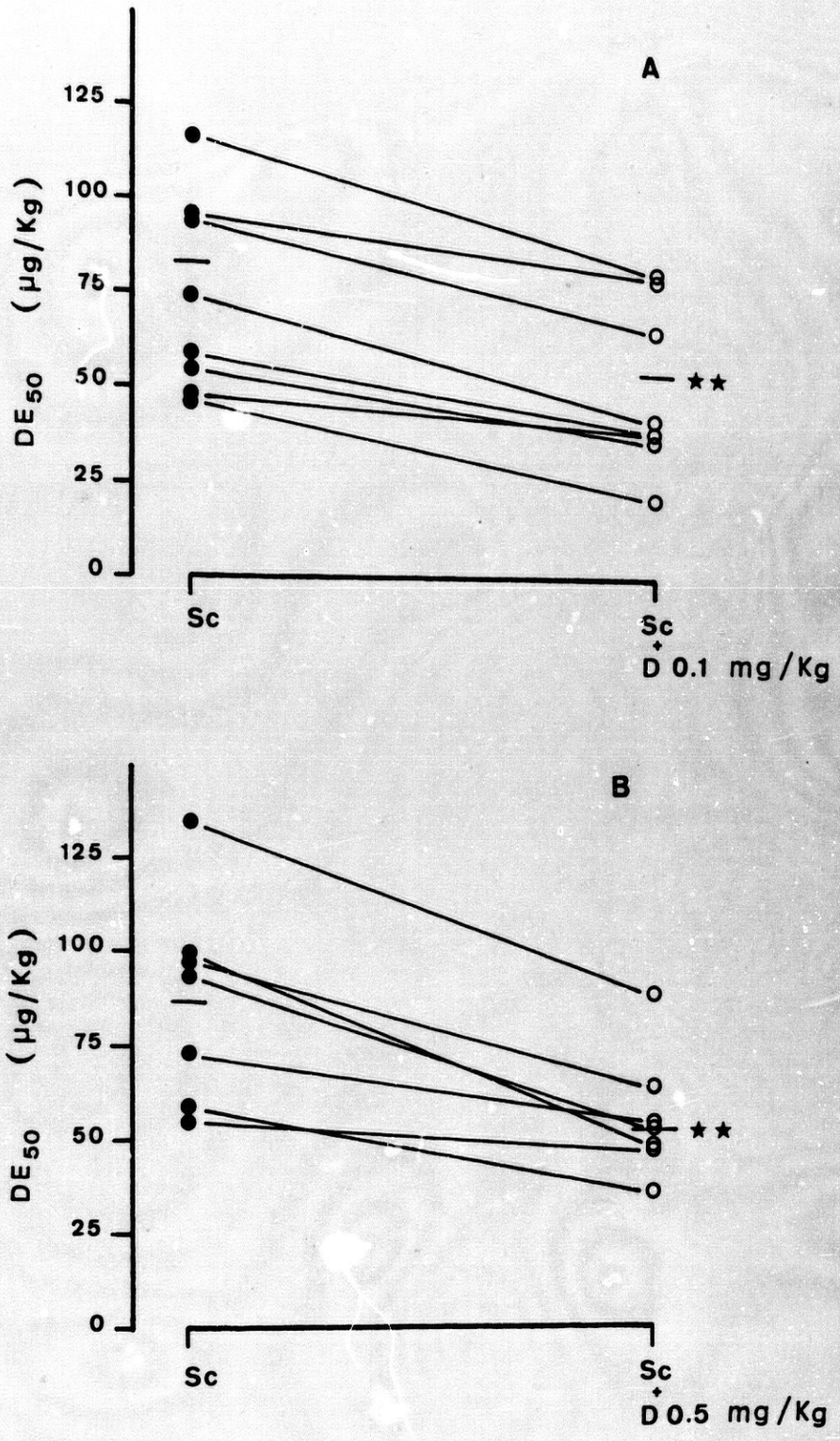



Fig. 15. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola en infusión continua ( ● ) y asociada a *d-cis* diltiazem ( o ) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: ** = $p<0.01$.

## II.4. *Efectos de nicardipina asociada a succinilcolina en infusión continua*

La administración de nicardipina (0.1 y 0.5 mg/kg) previamente a la infusión continua de succinilcolina provocó desplazamientos paralelos hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta de succinilcolina (fig. 16 A y B).

Al comparar las $DE_{50}$ del relajante solo y asociado a nicardipina se comprobó que disminuían significativamente ($p<0.01$) tanto al asociar 0.1 mg/kg de nicardipina (de 100.58 ± 13.33 µg/kg a 84.21 ± 12.85 µg/kg) como si se asocia a 0.5 mg/kg del antagonista del calcio (de 94.46 ± 12.48 µg/kg a 77.43 ± 11.22 µg/kg) (fig. 17 A y B).

En resumen, nicardipina (0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg) potenció significativamente el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina en infusión continua.

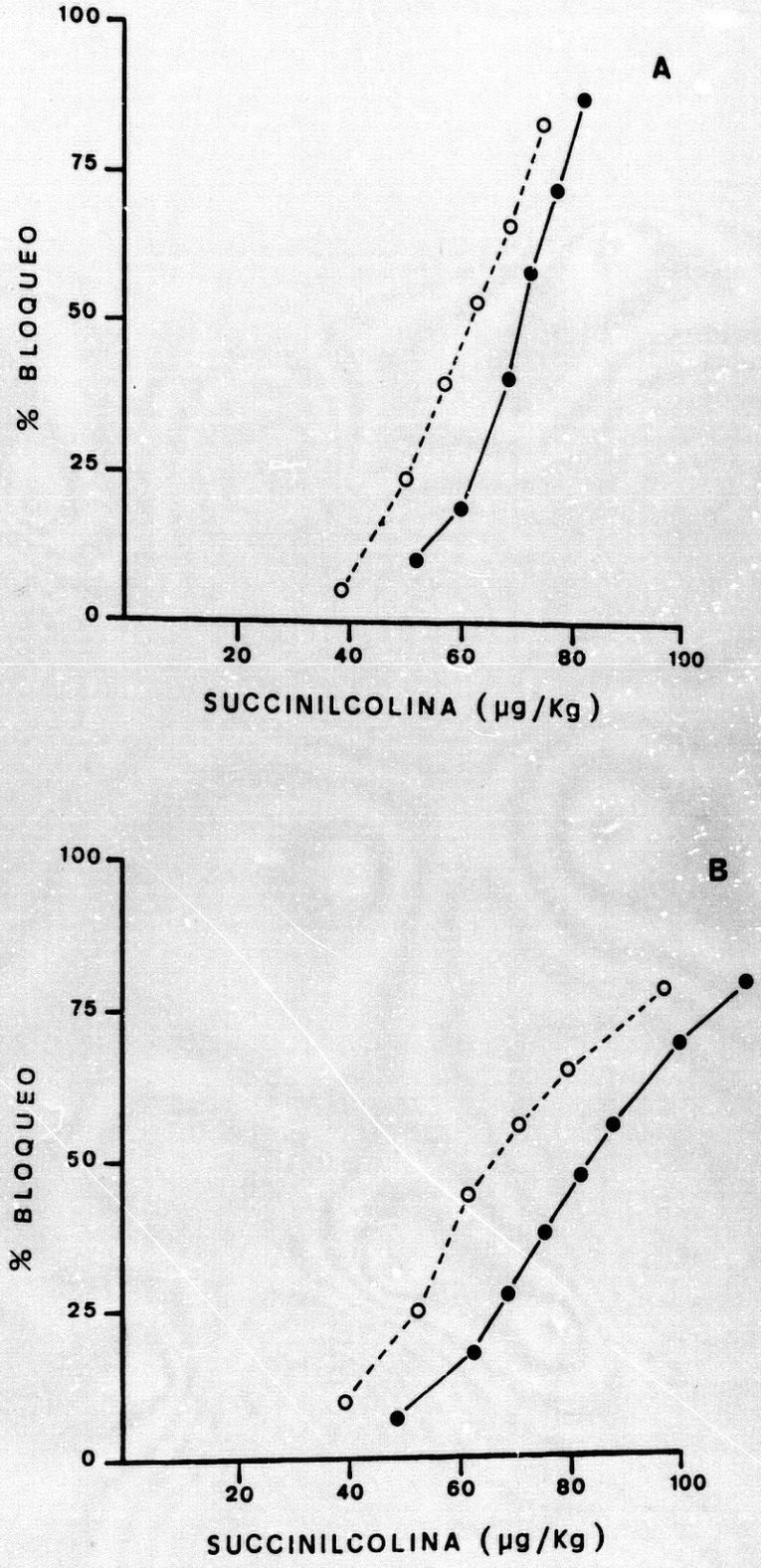



Fig. 16. Bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina sola (●——●) y asociada a nicardipina (O---O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

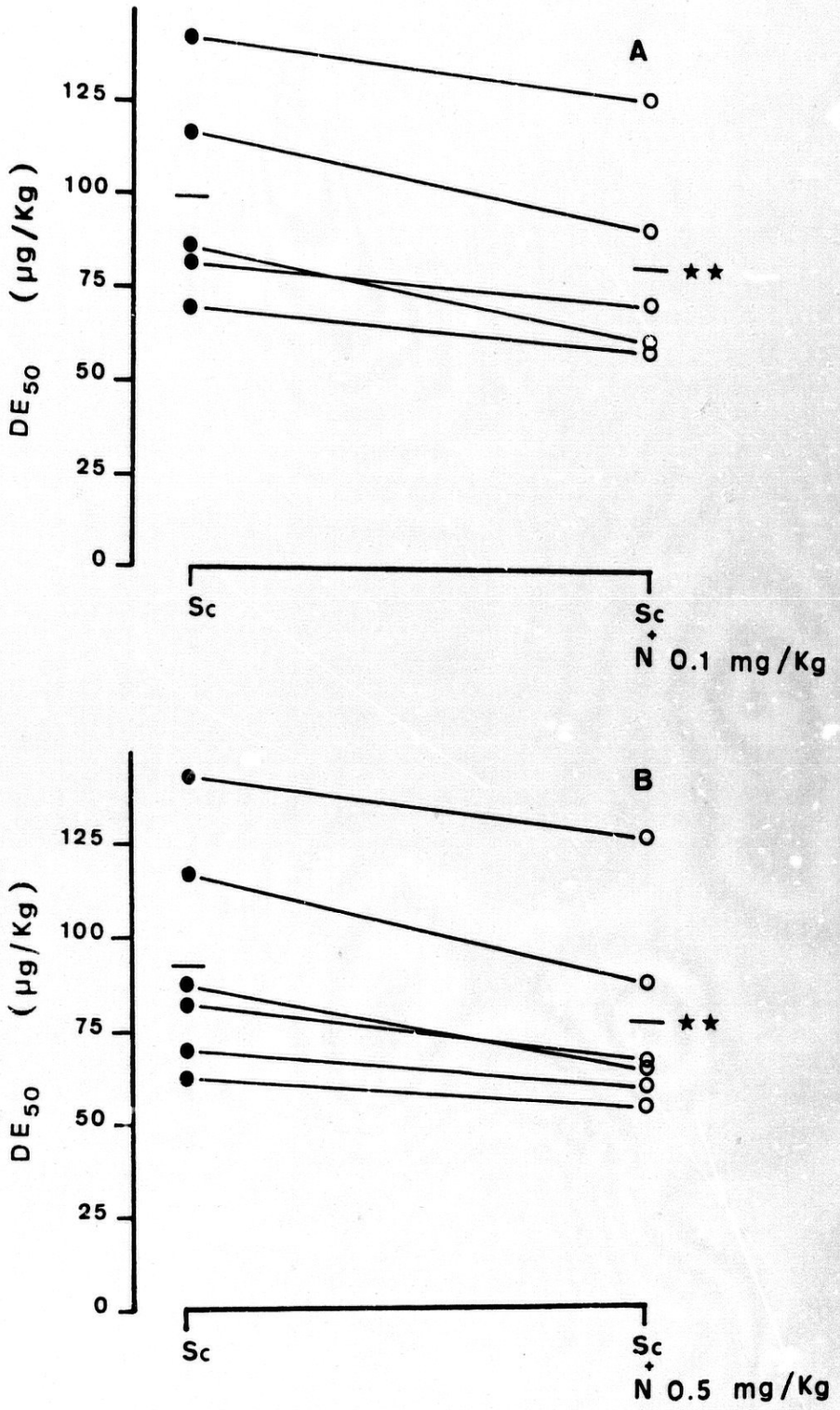



Fig. 17. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola en infusión continua (●) y asociada a nicardipina (O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: ** = $p < 0.01$.

## II.5. *Comparación de los efectcs de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina en infusión continua*

Tanto verapamil como *d-cis* diltiazem y nicardipina, a las dosis administradas (0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg) indujeron un aumento significativo del bloqueo neuromuscular producido tras infusión continua de succinilcolina. La razón de potencia fue superior a 1 para las dosis utilizadas de los antagonistas del calcio (fig. 18).

No existieron diferencias significativas entre las razones de potencia de verapamil y *d-cis* diltiazem para cada una de las dosis empleadas. Sin embargo, las razones de potencia de verapamil y *d-cis* diltiazem 0.5 mg/kg fueron significativamente mayores que la de nicardipina 0.5 mg/kg (fig. 18). Siendo pues el orden de potenciación: nicardipina << diltiazem = verapamil (fig. 18).

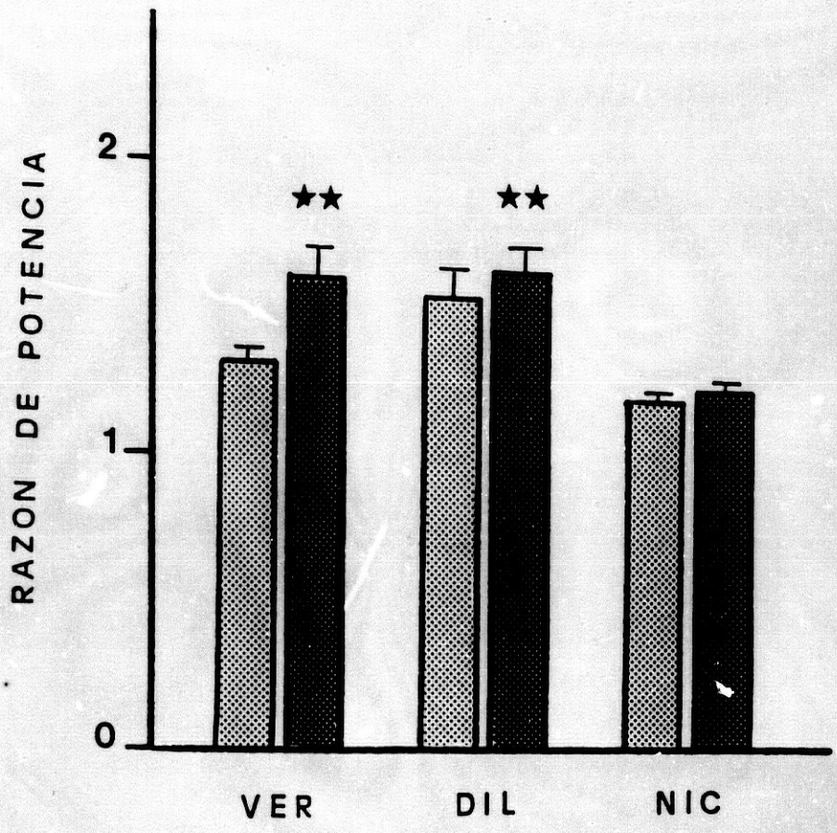



Fig. 18. Potenciación por verapamil (VER), *d-cis* diltiazem (DIL) y nicardipina (NIC), 0.1 mg/kg ( ▨ ) y 0.5 mg/kg ( ■ ) del bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina. Diferencias significativas con la dosis equivalente de nicardipina: ** = $p<0.01$.

## II.6. *Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a succinilcolina en infusión continua*

Dosis de 0.1 mg/kg y 0.5 mg/kg de *l-cis* diltiazem aumentaron significativamente ($p<0.05$) el bloqueo neuromuscular producido por succinilcolina (fig. 19 A y B), de modo similar a lo descrito anteriormente para *d-cis* diltiazem (fig. 15).

Sin embargo, al comparar los efectos de ambos isómeros entre sí se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$), tanto para la dosis de 0.1 mg/kg como para la de 0.5 mg/kg, siendo en ambos casos mayor la potenciación obtenida con *d-cis* diltiazem (fig. 20).

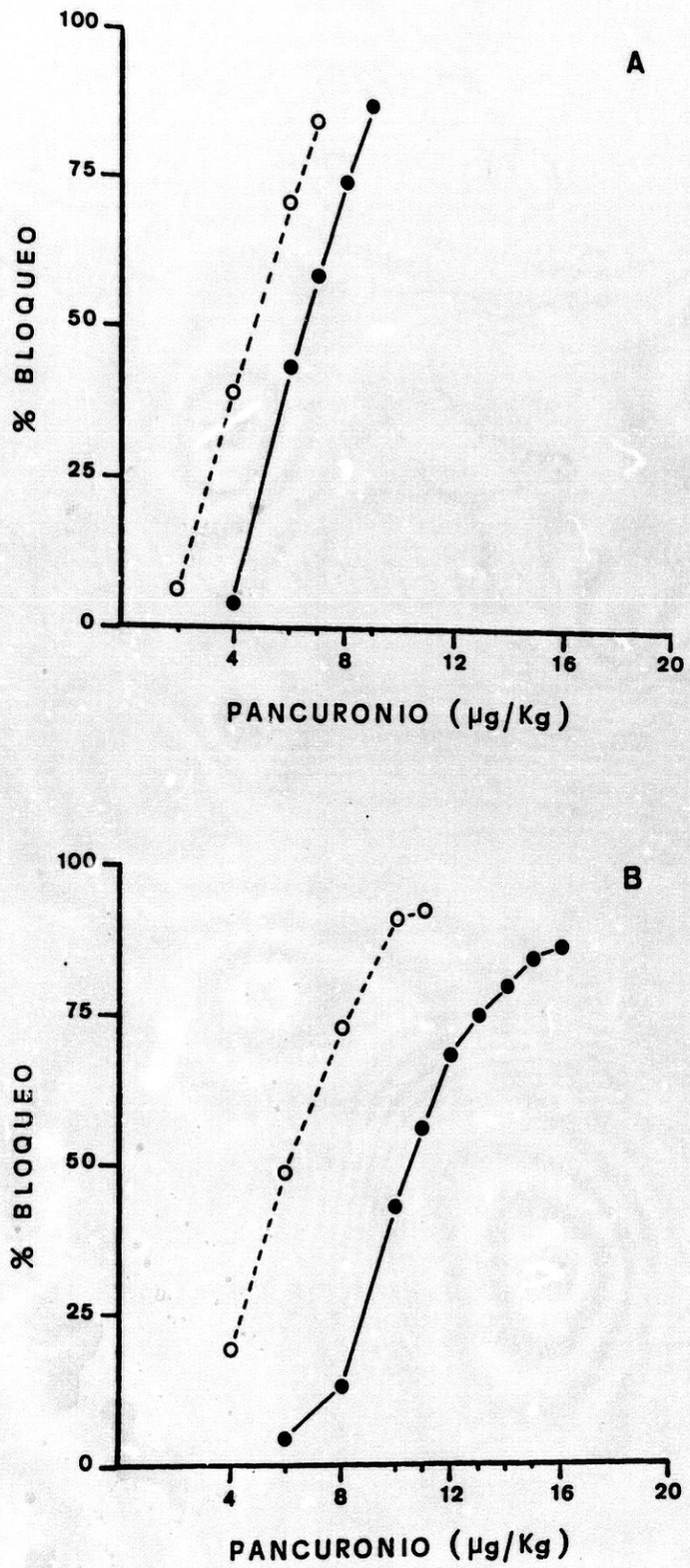



Fig. 2. Bloqueo neuromuscular inducido con dosis acumulativas de pancuronio solo (●——●) y asociado a verapamil (O----O) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B).

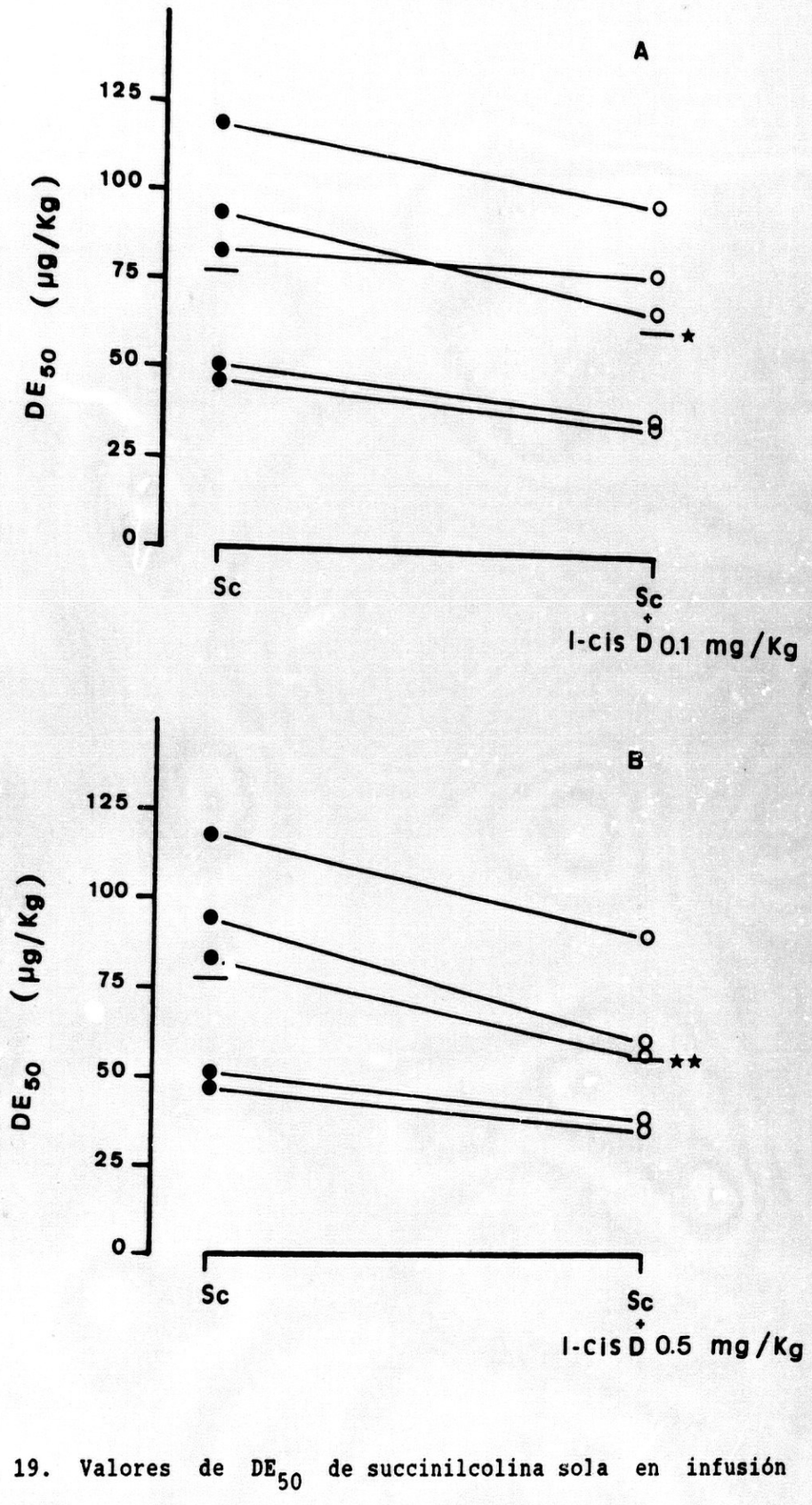



Fig. 19. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola en infusión continua ( ● ) y asociada a *l-cis* diltiazem ( o ) 0.1 mg/kg (A) y 0.5 mg/kg (B). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$.

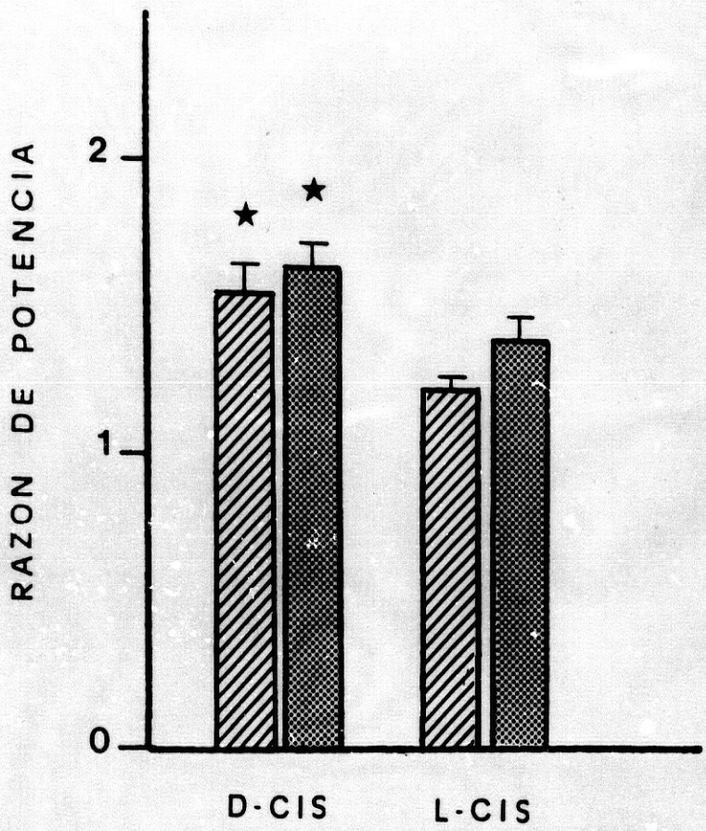


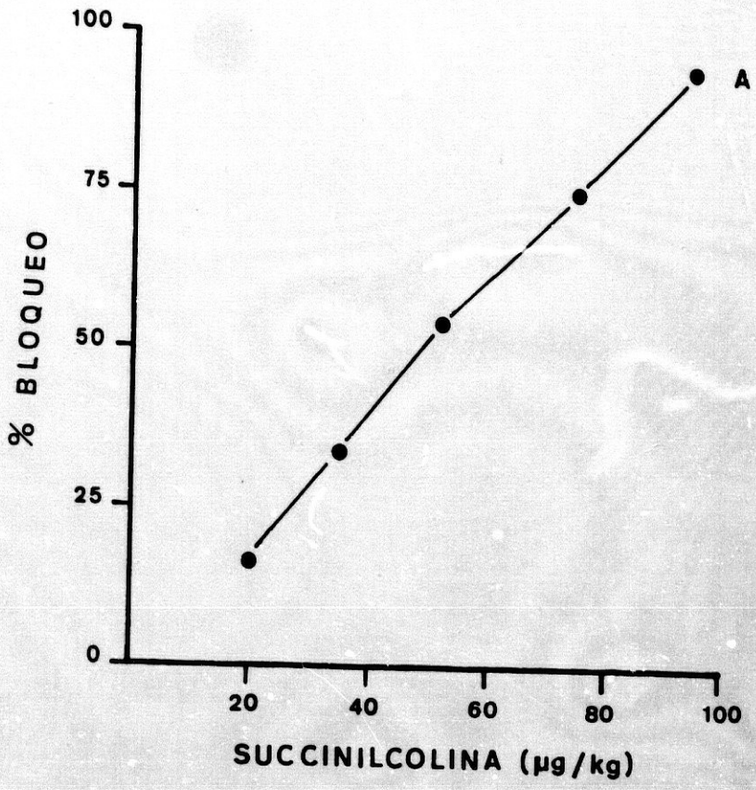

Fig. 20. Potenciación de los isómeros de diltiazem 0.1 mg/kg ( ▨ ) y 0.5 mg/kg ( ▩ ) del bloqueo neuromuscular producido tras infusión continua de succinilcolina. Diferencias significativas entre D-cis y L-cis diltiazem: * = $p < 0.05$.

# III. EFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO EN EL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON BOLOS REPETIDOS DE SUCCINILCOLINA

## III.1. *Efectos de succinilcolina administrada en bolos repetidos*

La administración de bolos repetidos de succinilcolina indujo un bloqueo neuromuscular dosis-dependiente (fig. 21 A). Como en los casos anteriores, las $DE_{50}$ de los controles no difirieron significativamente entre sí, y la $DE_{50}$ media fue de 49.62 ± 5.01 µg/kg.

El tipo de bloqueo neuromuscular observado tras administración de bolos repetidos de succinilcolina fue despolarizante, lo que se comprobó analizando las respuestas a estimulaciones con trenes de cuatro. Así, se puede observar en las fig. 21 B y C como siempre esta presente la cuarta respuesta del tren de cuatro, siendo la razón entre esta respuesta y la primera superior a 0.7, aún para grados de bloqueo superiores al 90%.




B

| % BLOQUEO | 0 % | 17 % | 53 % | 96 % |
|---|---|---|---|---|
| $R = T_4 / T_1$ | 0.94 | 0.94 | 0.89 | 0.71 |

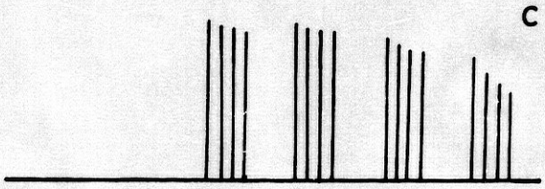



Fig. 21. Bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina (A). Relación entre el % de bloqueo y el cociente entre la 4ª y la 1ª respuesta del tren de cuatro (B). Contracciones obtenidas tras estimulación con tren de cuatro para cada % de bloqueo (C).

## III.2. *Efectos de verapamil asociado a succinilcolina*

La administración previa de 0.5 mg/kg de verapamil no modificó el bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina; no se observó desplazamiento alguno de su curva dosis-respuesta (fig.22).

Al comparar las $DE_{50}$ de succinilcolina sola y asociada a 0.5 mg/kg de verapamil, no existieron diferencias significativas entre ellas (56.16 ± 25.11 µg/kg para succinilcolina y 56.4 ± 14.06 µg/kg para succinilcolina + verapamil 0.5 mg/kg) (fig. 23).

En resumen, verapamil 0.5 mg/kg no varió significativamente el bloqueo neuromuscular producido por bolos repetidos de succinilcolina.

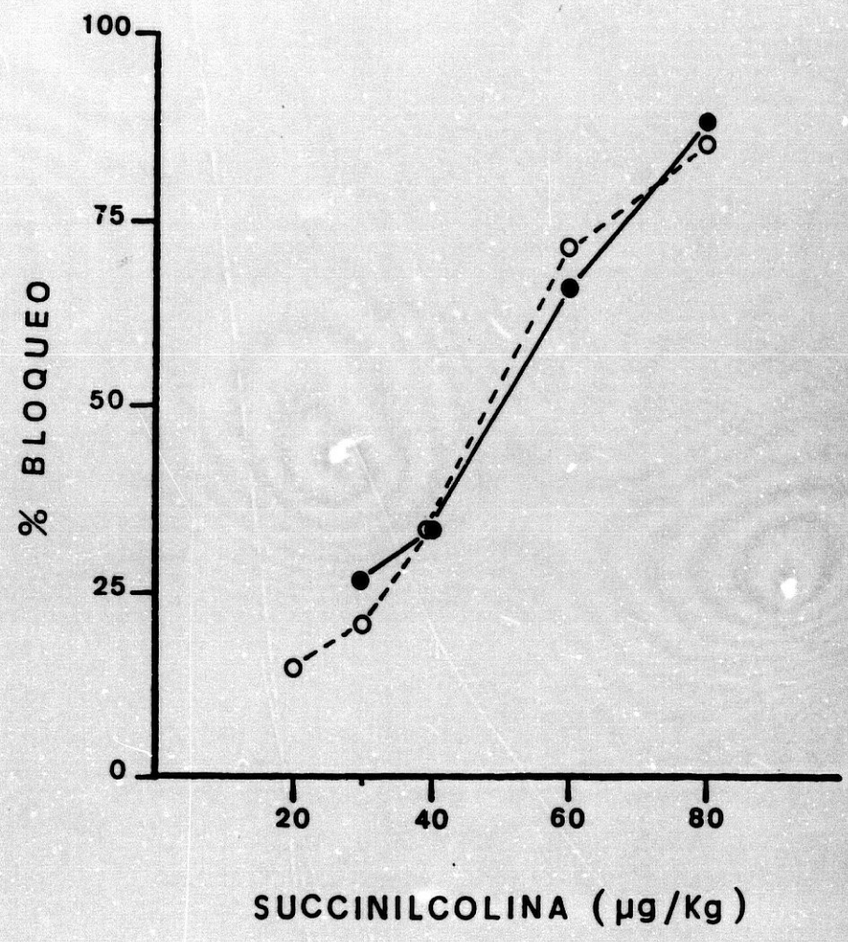



Fig. 22. Bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina sola administrada en bolos repetidos (●——●) y asociada a 0.5 mg/kg de verapamil (O--O).

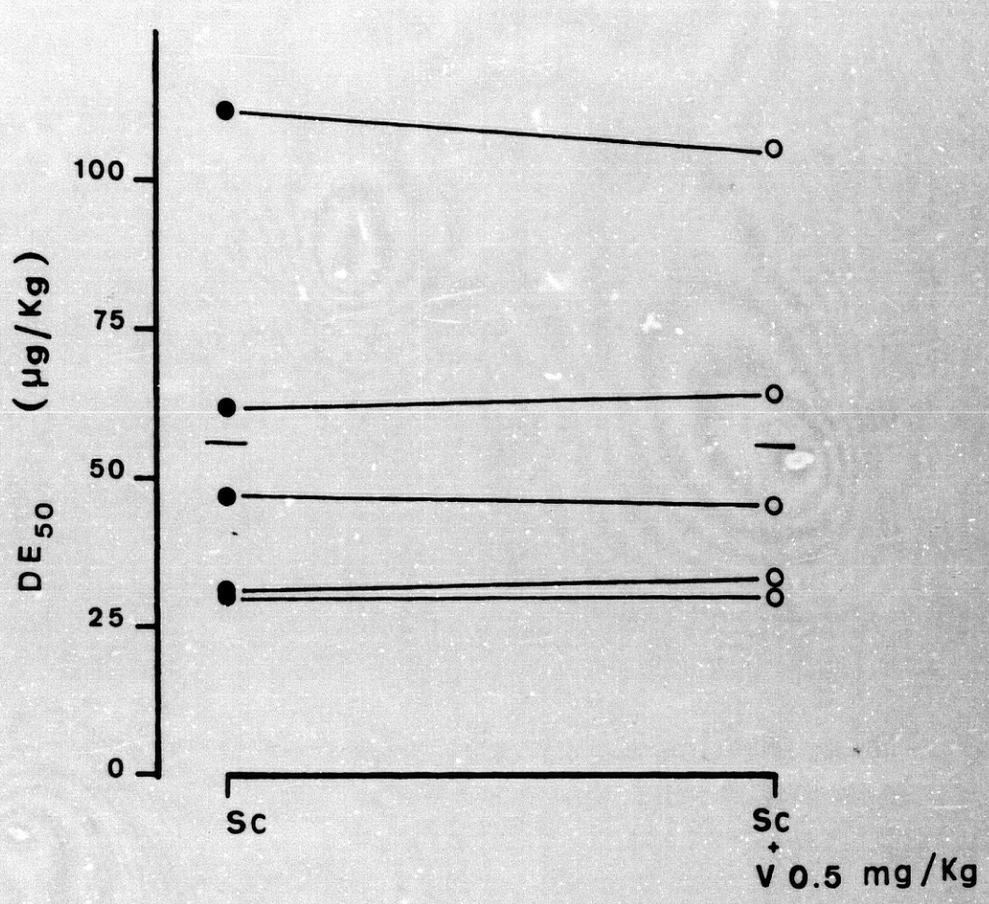



Fig. 23. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola administrada en bolos repetidos ( ● ) y asociada a 0.5 mg/kg de verapamil ( O ).

### III.3. *Efectos de d-cis diltiazem asociado a succinilcolina*

El bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina fue potenciado tras el tratamiento previo con 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem, observándose un desplazamiento paralelo hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta de succinilcolina (fig. 24).

La $DE_{50}$ de succinilcolina asociada a *d-cis* diltiazem fue significativamente diferente ($p<0.05$) de la $DE_{50}$ obtenida con el relajante solo, disminuyendo desde 54.23 ± 4.5 µg/kg para succinilcolina a 45.35 ± 4.9 µg/kg cuando se asoció *d-cis* diltiazem 0.5 mg/kg (fig. 25).

En resumen, 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem produjo una potenciación significativa del bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina.

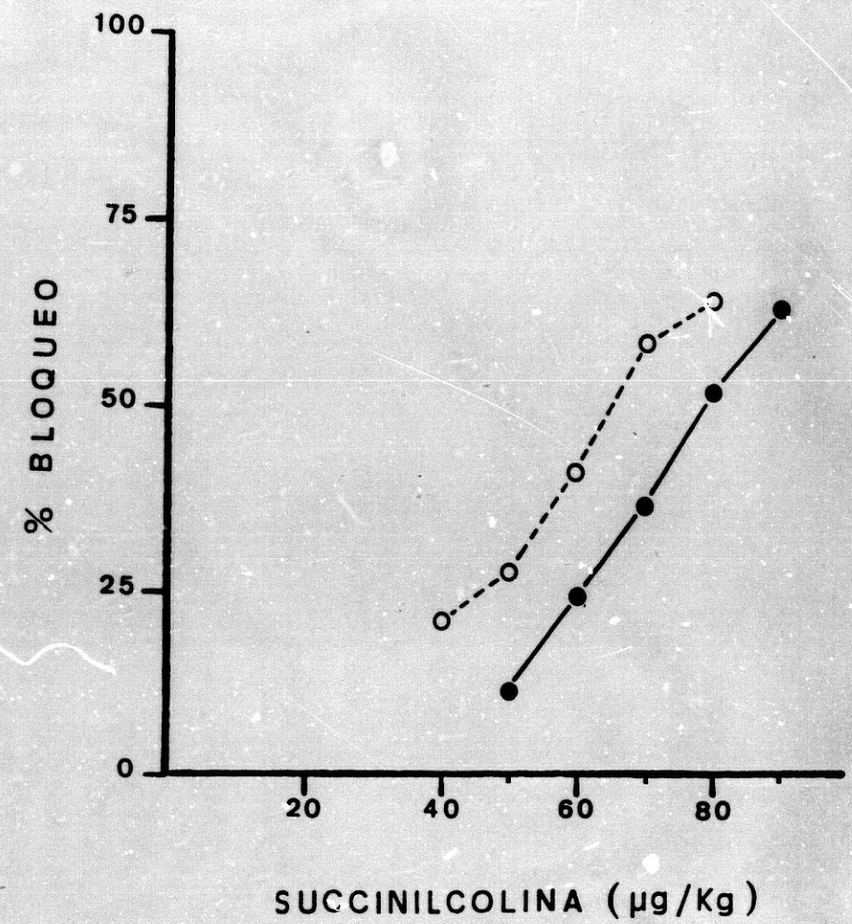



Fig. 24. Bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina sola administrada en bolos repetidos (●——●) y asociada a 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem (o---o).

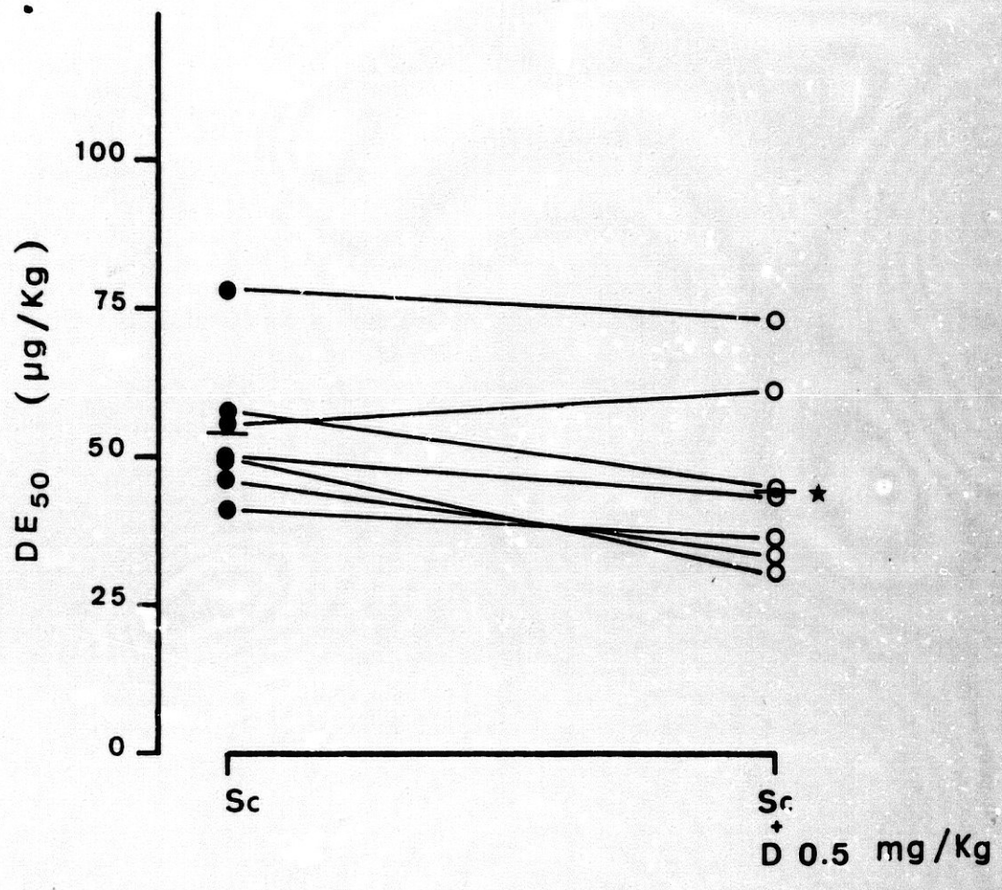



Fig. 25. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola administrada en bolos repetidos (●) y asociada a 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem (o). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: * = $p<0.05$.

### III.4. *Efectos de nicardipina asociada a succinilcolina*

El efecto de la interacción entre nicardipina (0.5 mg/kg) y succinilcolina administrada en bolos repetidos fue semejante al de succinilcolina sola. Al estudiar sus curvas dosis-respuesta no se observaron desplazamientos (fig. 26).

La $DE_{50}$ de la asociación de nicardipina y succinilcolina no fue significativamente diferente de la $DE_{50}$ del relajante solo (36.62 ± 3.25 µg/kg a 40.34 ± 1.54 µg/kg) (fig. 27).

En resumen, nicardipina (0.5 mg/kg) no tuvo efecto significativo sobre el bloqueo neuromuscular producido por bolos repetidos de succinilcolina.

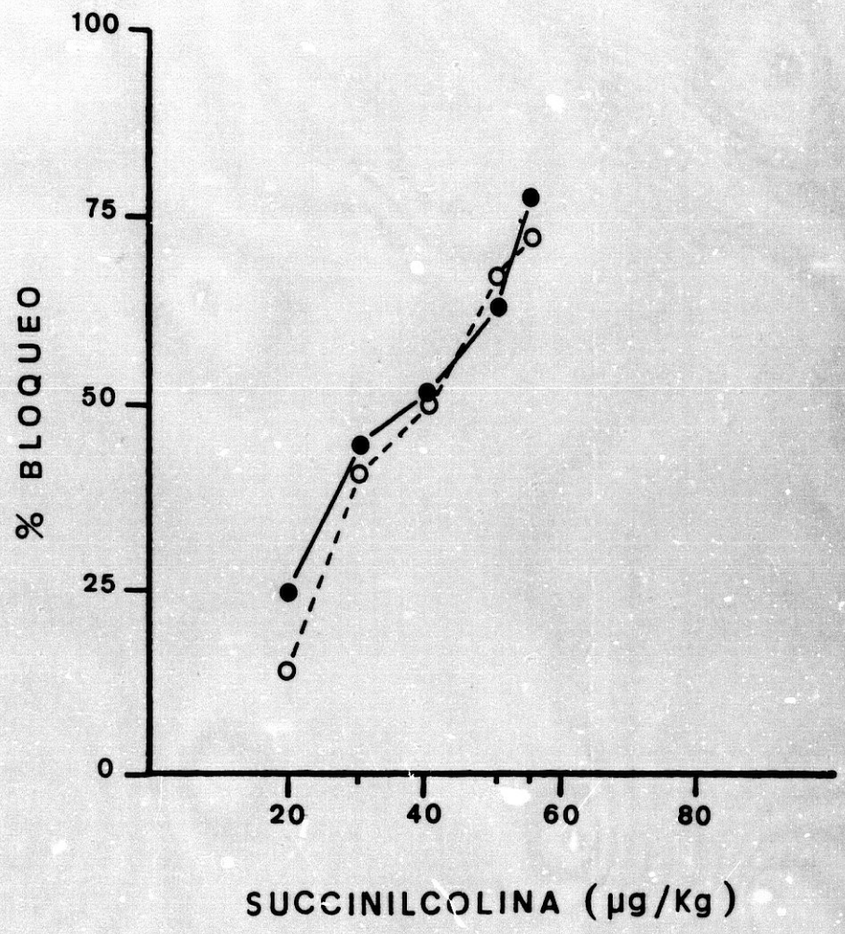



Fig. 26. Bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina sola administrada en bolos repetidos (●——●) y asociada a 0.5 mg/kg de nicardipina (O- -O).

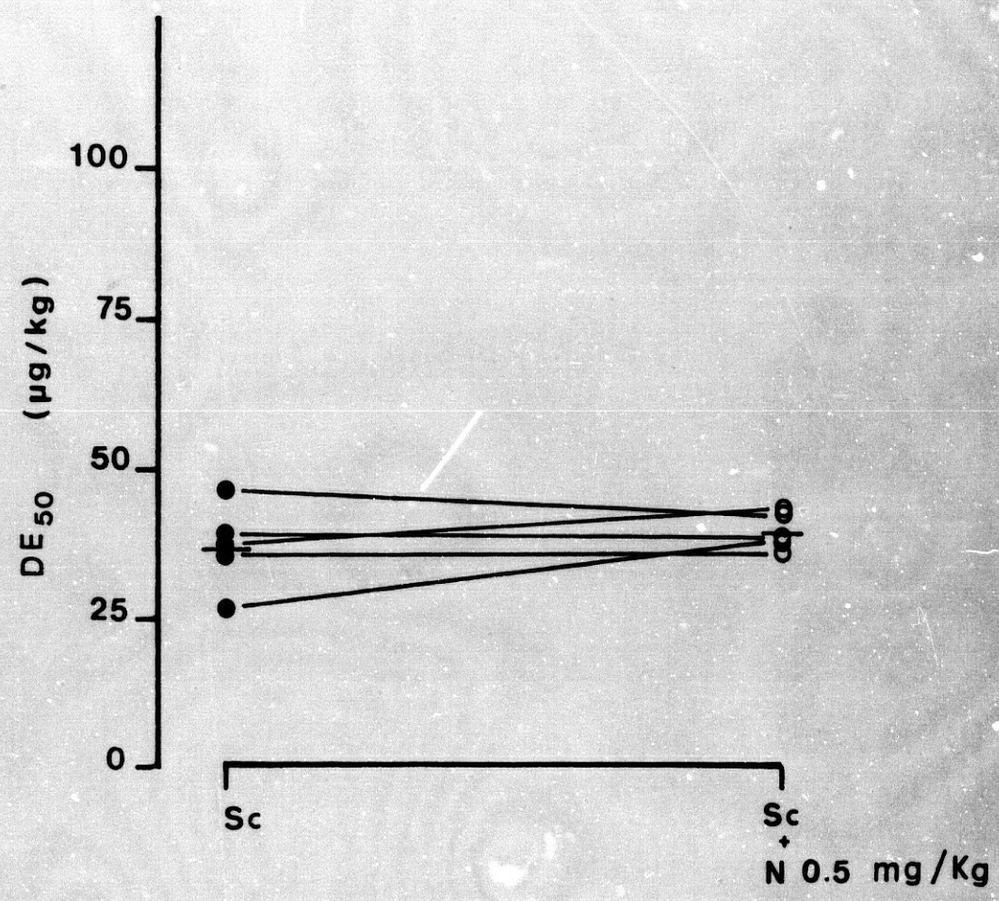



Fig. 27. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola administrada en bolos repetidos ( ● ) y asociada a 0.5 mg/kg de nicardipina ( O ).

### III.5. *Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina*

De los tres antagonistas del calcio estudiados a dosis de 0.5 mg/kg, solamente *d-cis* diltiazem potenció significativamente ($p<0.05$) el bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinicolina. Así, en la fig. 28, observamos como las razones de potencia solamente fueron superiores a la unidad cuando se administró 0.5 mg/kg de *d-cis* diltiazem.

Al comparar el efecto producido por verapamil y nicardipina con el deparado por *d-cis* diltiazem se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$), con lo que podríamos resumir el orden de potencia de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular producido por bolos repetidos de succinilcolina de la siguiente forma: diltiazem > verapamil = nicardipina (fig. 28).

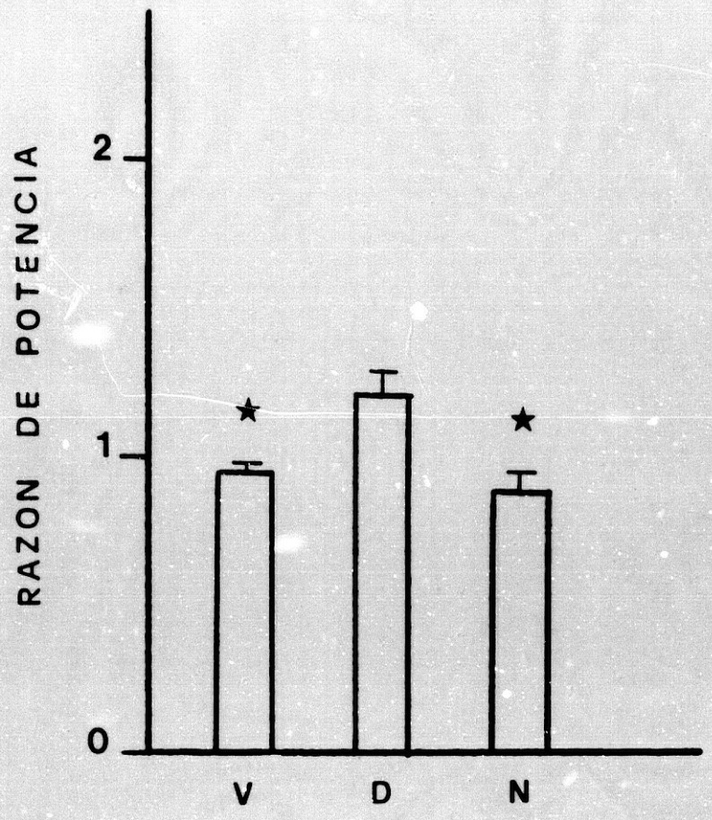



Fig. 28. Comparación del efecto de 0.5 mg/kg de verapamil (V), *d-cis* diltiazem (D) y nicardipina (N) en el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina administrada en bolos repetidos. Diferencias significativas respecto a *d-cis* diltiazem: * = $p<0.05$.

### III.6. *Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem asociados a bolos repetidos de succinilcolina*

Al contrario de lo que ocurre con *d-cis* diltiazem, el isómero *l-cis* (0.5 mg/kg) no modificó el bloqueo inducido con bolos repetidos de succinilcolina. Así las diferencias entre $DE_{50}$ de succinilcolina sola y asociada a *l-cis* diltiazem no fueron significativas (de 30.3 ± 7 µg/kg a 29 ± 6.93 µg/kg) mientras que si fueron estadisticamente diferentes las $DE_{50}$ de *d-cis* diltiazem y su control (de 54.23 ± 4.5 µg/kg a 45.35 ± 4.9 µg/kg) (fig. 29 A y B).

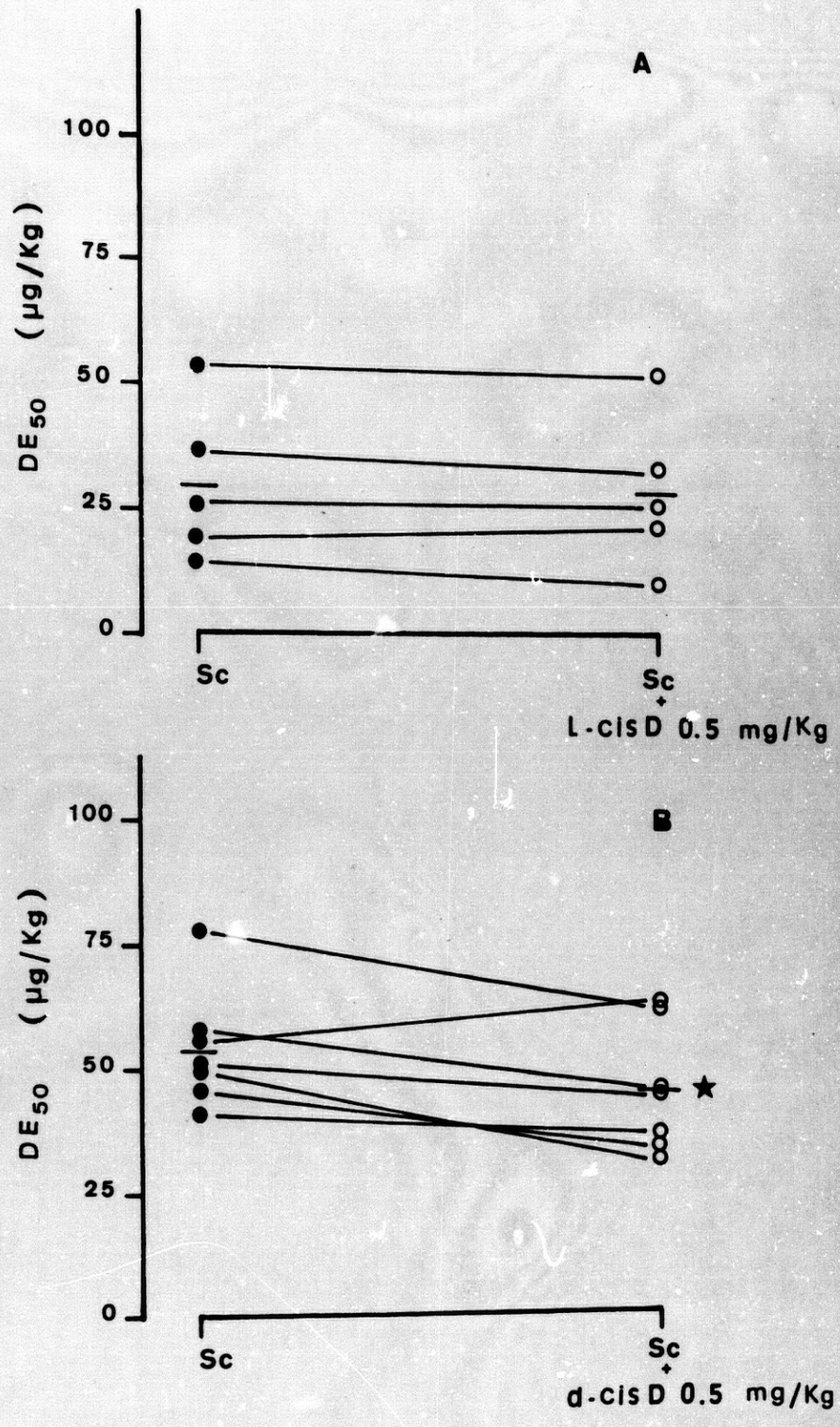



Fig. 29. Valores de $DE_{50}$ de succinilcolina sola administrada en bolos repetidos (●) y asociada a 0.5 mg/kg de *l-cis* diltiazem (A) y *d-cis* diltiazem (B) (o). Diferencias significativas respecto a succinilcolina sola: * = $p<0.05$.

# IV. COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LA ASOCIACION DE ANTAGONISTAS DEL CALCIO Y BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES

## IV.1. *Comparación de los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina administrada en infusión continua y en bolos repetidos*

En la fig. 30 podemos observar los efectos de los antagonistas del calcio estudiados (dosis de 0.5 mg/kg) en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina administrada tanto en forma de infusión continua como en bolos repetidos.

La potenciación por verapamil y *d-cis* diltiazem del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio fue semejante a la potenciación por estos antagonistas del calcio de los efectos de succinilcolina en infusión continua. Sin embargo, nicardipina potenció significativamente más a pancuronio que a succinilcolina en infusión (fig. 30).

Diferencias más marcadas existen entre los efectos de los antagonistas del calcio en el bloqueo inducido con succinilcolina según la forma de administración de este relajante. Así, tanto verapamil como *d-cis* diltiazem y nicardipina potencian más los efectos de succinilcolina cuando ésta se administró en

infusión, siendo la diferencia en todos los casos significativa desde el punto de vista estadístico (fig. 30).

Por otro lado, como ya se ha referido en secciones precedentes, cuando se comparan los efectos de los antagonistas del calcio entre sí en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio observamos que nicardipina provocó una potenciación significativamente mayor que cualquiera de los otros antagonistas del calcio estudiados. Por el contrario, en el bloqueo neuromuscular producido por infusión continua de succinilcolina, nicardipina fue el antagonista del calcio que presentó una razón de potencia menor en comparación con dosis equivalentes de verapamil y *d-cis* diltiazem (fig. 30).

Cuando el bloqueo neuromuscular fue inducido con bolos repetidos de succinilcolina, sólo *d-cis* diltiazem provocó una potenciación estadisticamente significativa. Así, al comparar este antagonista del calcio con los otros dos estudiados observamos que tanto verapamil como nicardipina eran significativamente diferentes de *d-cis* diltiazem (fig. 30).

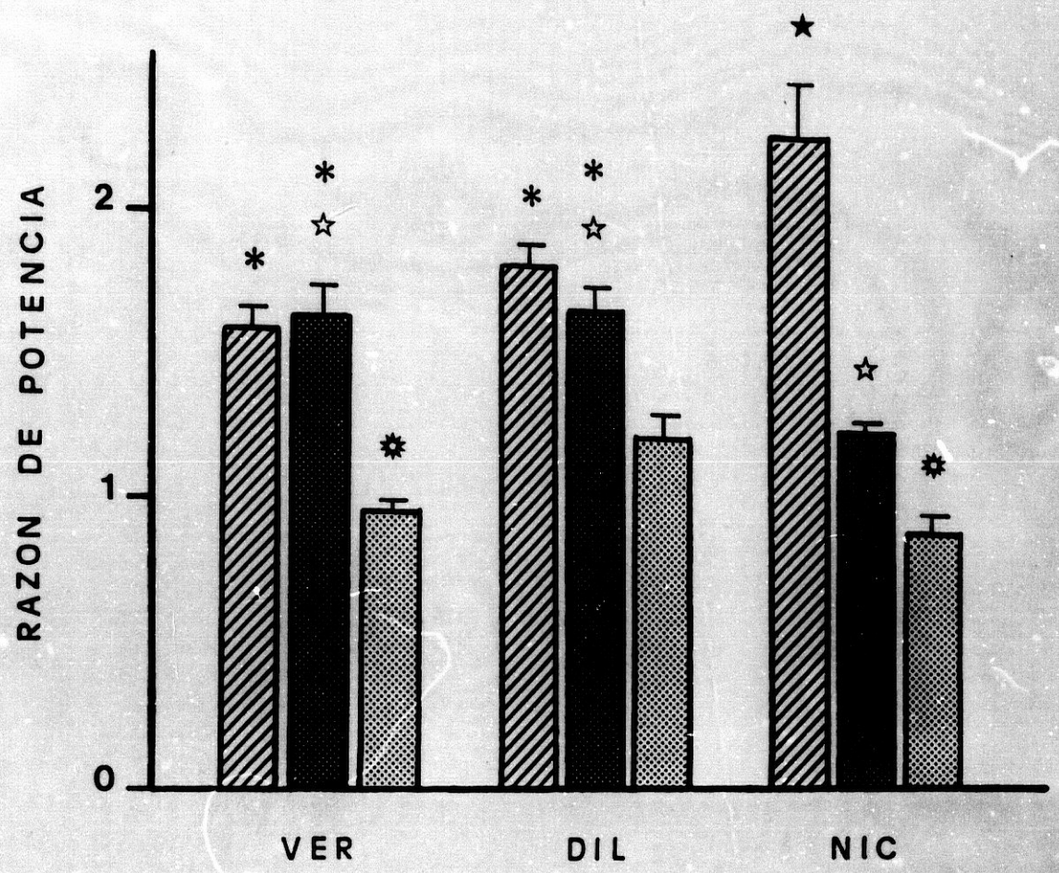



Fig. 30. Efectos de los 3 antagonistas del calcio (0.5 mg/kg) en el bloqueo neuromuscular (nm) inducido con pancuronio ( ▨ ), infusión continua de succinilcolina ( ■ ) y succinilcolina administrada en bolos repetidos ( ▩ ). Diferencias significativas entre el bloqueo nm inducido con pancuronio y succinilcolina en infusión: ★ = $p < 0.01$. Idem entre el bloqueo nm inducido con succinilcolina en infusión y en bolos repetidos: ☆ = $p < 0.01$. Diferencias significativas respecto a nicardipina: ✱ = $p < 0.05$ y respecto a *d-cis* diltiazem: ✲ = $p < 0.05$.

## IV.2. *Comparación de los efectos de los isómeros de diltiazem en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina administrada en infusión continua y en bolos repetidos*

En la fig. 31 comparamos los efectos de *d-cis* diltiazem y *l-cis* diltiazem (0.5 mg/kg) en el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio y succinilcolina administrada tanto en infusión continua como en bolos repetidos.

Aunque, ambos isómeros de diltiazem potenciaron el bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio la potenciación que produjo *d-cis* fue significativamente mayor que la de *l-cis* diltiazem. Tambien observamos un comportamiento similar de los dos isómeros de diltiazem cuando se asociaron a una infusión continua de succinilcolina (fig. 31).

Por otro lado, como se ha dicho anteriormente, *d-cis* diltiazem potenció significativamente el bloqueo neuromuscular inducido con bolos repetidos de succinilcolina mientras que *l-cis* no lo hizo. Sin embargo, al comparar las razones de potencia de ambos isómeros no se obtuvieron diferencias significativas (fig. 31.)

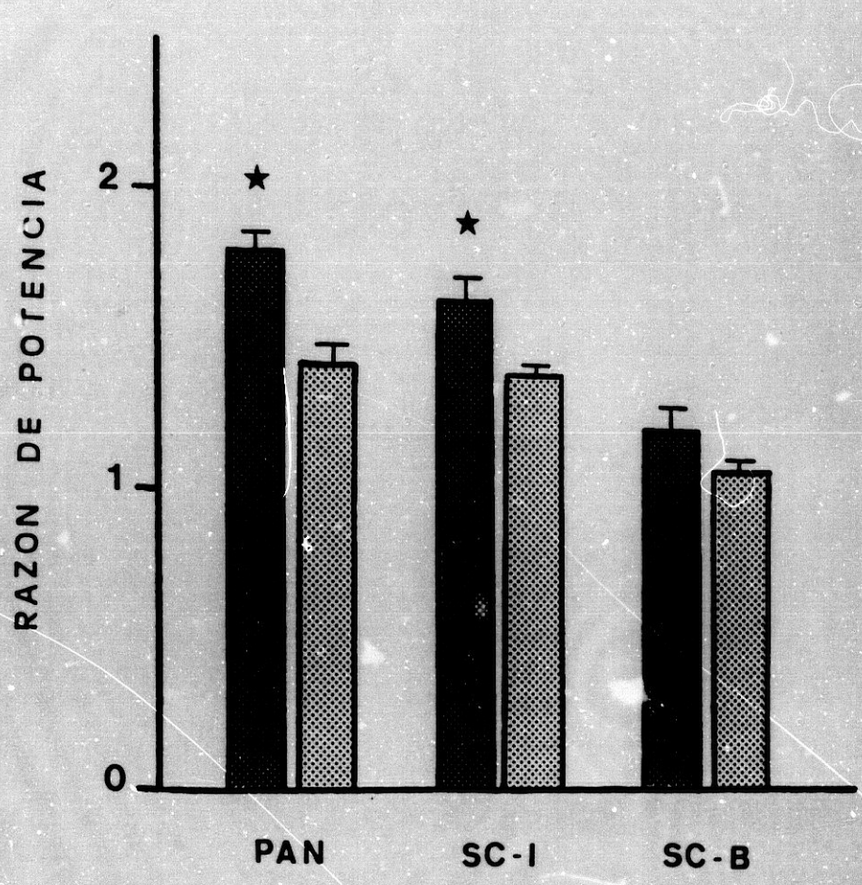



Fig. 31. Potenciación por *d-cis* ( ■ ) y *l-cis* diltiazem ( ▩ ) del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio (PAN), succinilcolina en infusión continua (SC-I) y bolos repetidos de succinilcolina (SC-B). Diferencias significativas entre ambos isómeros: * = $p<0.05$.

# DISCUSION

## I. DEL EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO SOBRE LAS CONTRACCIONES DEL MUSCULO ESQUELETICO INDUCIDAS CON ESTIMULACION ELECTRICA DEL NERVIO

En nuestro trabajo experimental realizado "in vivo" con la preparación nervio ciático-músculo tibial anterior en gatos, hemos podido observar como los antagonistas del calcio utilizados, verapamil, diltiazem y nicardipina, no modificaron la altura de las contracciones del músculo esquelético estimulado indirectamente.

Estos datos estan en consonancia con los resultados obtenidos en conejos por Durant et al. (1984) y en gatos por Anderson y Marshall (1985), quienes comprobaron como los antagonistas del calcio verapamil, bepridil y nifedipina no eran capaces de modificar la altura de la contracción del músculo tibial anterior estimulado indirectamente.

Por el contrario, otros autores (Kraynack et al., 1983a; Lawson et al., 1983 ) demuestran que verapamil, en un rango de dosis similar al nuestro, reduce las contracciones del músculo tibial anterior de gatos y perros tras estimulación indirecta. Sin embargo, en estos experimentos, la frecuencia de estimulación (1 Hz) fue 10 veces superior a la usada en nuestro trabajo (0.1 Hz), circunstancia experimental que posibilita una disminución del margen de seguridad de la transmisión neuromuscular. Además, teniendo en cuenta que la actividad de verapamil es frecuencia-dependiente (Zsóter y Church, 1983), se pondría más facilmente de manifiesto una posible acción bloqueante neuromuscular cuanto mayor sea la frecuencia de estimulación.

Además nuestros resultados "in vivo" concuerdan también con los obtenidos "in vitro", donde sólo se obtienen efectos bloqueantes cuando se utilizan concentraciones de antagonistas del calcio superiores a 10 μM (Del Pozo y Baeyens, 1986; Salvador et al., 1988; Wali, 1987). El hecho de que los agentes estudiados, a dosis de 0.1-0.5 mg/kg no afecten la contracción muscular contrasta con las acciones depresoras cardíacas e hipotensoras que, a esas dosis, producen (Anderson y Marshall, 1985; Lawson et al., 1983). En este sentido queda claro que la unión neuromuscular y el músculo esquelético constituyen preparaciones hasta cierto punto refractarias al efecto de los antagonistas del calcio. Ello se podría explicar teniendo en cuenta los siguientes hechos:

1. Los antagonistas del calcio exhiben selectividad de tejido, lo cual se ha confirmado en diferentes tipos de músculo liso (Flaim, 1982) y es, por supuesto aplicable a músculo esquelético, donde los efectos son sensiblemente menores a los que producen en músculo liso vascular o cardíaco (Zsóter y Church, 1983). Ello se puede entender, al menos en parte, teniendo en cuenta que los receptores para antagonistas del calcio de músculo esquelético y cardíaco no son iguales, puesto que recientemente se ha demostrado que la parte de reconocimiento del receptor para dihidropiridinas en músculo esquelético es diferente en su composición peptídica, comportamiento bioquímico y características inmunológicas a la del receptor del músculo cardíaco (Chang y Hosey, 1988).

2. Los fenómenos de excitación-secreción de acetilcolina y especialmente los de excitación-contracción de músculo esquelético son menos dependientes de la concentración de calcio extracelular que los de excitación-contracción de músculo liso (Bowman y Rand, 1980). De hecho, Idelfonse et al. (1985), Gónzalez-Serratos et al.(1982) y Walsh et al. (1988) han demostrado que concentraciones de antagonistas del calcio que abolían completamente la corriente lenta en músculo esquelético no afectaban en la misma medida el proceso de la contracción muscular.

3. El amplio margen de seguridad que existe en la unión neuromuscular, tanto en el proceso de liberación del neurotransmisor como en el número de receptores que tendrían que ser bloqueados (más de un 80%) para poder observar un descenso en la altura de la contracción muscular estimulada indirectamente (Paton y Waud, 1967).

## II. DE LA POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON PANCURONIO

Pancuronio indujo un bloqueo neuromuscular dosis-dependiente con las caraterísticas propias de un bloqueo competitivo, lo cual fue confirmado tras aplicar estímulos "tren de cuatro", puesto que como describiera Kienlen (1984), el cociente entre la 4ª y la 1ª respuesta al tren de estímulos fue superior a 0.7. Además, comprobamos que al alcanzar un 90% de bloqueo las últimas respuestas al tren de cuatro ($T_2$ $T_3$ y $T_4$) no se observan,

lo que está en consonancia con la valoración del bloqueo competitivo realizada por Ali (1985).

Tanto verapamil como diltiazem y nicardipina (en dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg) potenciaron de una forma dosis-dependiente el bloqueo neuromuscular producido por pancuronio. Es sabido que los efectos bloqueantes neuromusculares de pancuronio se antagonizan con calcio (Waud y Waud, 1980) y con 4-aminopiridina (Foldes et al., 1981), la cual aumenta el flujo transmembrana de este catión. En este sentido, no es de extrañar que fármacos que disminuyen la disponibilidad intracelular de calcio potencien el bloqueo neuromuscular de pancuronio.

Además, dicha potenciación es similar a la observada previamente en experimentos "in vivo" en ratas (Bikhazi et al., 1983; Bikhazi et al., 1988), conejos (Durant et al., 1984) y gatos (Kraynack et al.,1983a; Anderson y Marshall, 1985; Carpenter y Mulroy, 1986). También en preparaciones "in vitro" se observa un incremento del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio utilizando verapamil (Bikhazi et al., 1982; Kraynack et al., 1983b; Adams et al., 1985; Ilias y Steinbereithner, 1985; Wali, 1986; Salvador et al., 1988), así como con diltiazem y dihidropiridinas (Salvador et al., 1988; Bikhazi et al., 1988).

Nicardipina a dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg provocó una potenciación mayor del bloqueo neuromuscular producido por pancuronio que verapamil y diltiazem cuando se administraron a las mismas dosis. Ello está en consonancia con los trabajos realizados por Bikhazi et al. (1983; 1988), quienes observaron una mayor reducción de las $DE_{50}$ de pancuronio tras el tratamiento previo con

nifedipina que tras administrar verapamil y con los resultados obtenidos por Salvador et al. (1988) en preparaciones aisladas frénico-hemidiafragma de rata.

Esta interacción podría relacionarse con la capacidad anestésica local de los antagonistas del calcio, sin embargo ello no es probable, puesto que por un lado nicardipina carece de tal actividad a concentraciones micromolares (Patmore y Withing, 1984) y por otro, las dosis de verapamil y diltiazem requeridas para desarrollar un efecto anestésico local han de ser superiores a 10 μM (Hay y Wadsworth, 1982). Teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas que se obtienen tras administración de verapamil y diltiazem a animales son inferiores a 1 μM (Sugawara et al., 1988b; Hamann et al., 1983), es bastante improbable que un efecto sobre los canales de sodio contribuya a la interacción observada.

Hay varios hechos que inducen a pensar que la potenciación por antagonistas del calcio del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio se relaciona con la actividad bloqueante de los canales del calcio de estos agentes. En primer lugar, dicha potenciación es esteroselectiva, de manera que el isómero de diltiazem *d-cis* potencia a pancuronio significativamente más que *l-cis* diltiazem, el cual es menos activo como bloqueante del canal lento (Nagao et al., 1972). En segundo lugar, nicardipina potencia más a pancuronio que los otros antagonistas del calcio, al igual medida que este fármaco es más potente que diltiazem y verapamil como bloqueante del canal lento a nivel vascular (Bristow et al., 1984).

El sitio donde los antagonistas del calcio actúan para potenciar el efecto de pancuronio no se conoce. No obstante se puede especular con tres posibilidades:

1) A nivel presináptico, produciendo una disminución de la liberación del neurotransmisor que disminuyera el margen de seguridad de la transmisión neuromuscular. Ello no parece probable si tenemos en cuenta los trabajos de Chang et al. (1988), que revelan que sólo con concentraciones superiores a 10 μM de verapamil y diltiazem, se logra disminuir el contenido cuántico de *e.p.p.* en preparación frénico-hemidiafragma de ratón, en la que el margen de seguridad había sido reducido con d-tubocurarina; además estos autores no encuentran ningún efecto con la dihidropiridina nifedipina.

2) A nivel muscular inhibiendo el desarrollo del proceso contráctil directamente. Sin embargo, cuando en preparaciones en las que los antagonistas del calcio ejercen acciones bloqueantes neuromusculares, se comparan los efectos obtenidos tras estimulación eléctrica del nervio con los obtenidos tras estimulación directa del músculo, se observa, en casi todos los casos, que son mayores cuando la preparación es estimulada indirectamente, necesitándose siempre concentraciones mucho más altas para alterar directamente el proceso de contracción muscular (Wali, 1986 y 1987; Kraynack et al., 1983a; Lawson et al., 1983; Del Pozo y Baeyens, 1989). Ello hace muy improbable que los antagonistas del calcio a las dosis utilizadas en este trabajo, ejerzan efectos musculares directos.

3) A nivel de receptores nicotínicos postsinápticos. En este sentido hay estudios que demuestran que varios antagonistas del calcio bloquean los receptores nicotínicos postsinápticos. Así, Adam y Henderson (1986a) demostraron que diferentes dihidropiridinas (nicardipina y nitrendipina) y fenilalquilaminas (verapamil, bepridil y D-600), en concentraciones micromolares, inhibían la contracción y los flujos iónicos estimulados con el agonista nicotínico carbacol. No obstante, estos efectos no serían consecuencia de un bloqueo directo de receptores nicotínicos puesto que sólo se aprecian cuando se aplica un agonista exógenamente (Adam y Henderson, 1986a) y además el análisis de la inhibición que produce verapamil de la unión de α-bungarotoxina marcada a los receptores postsinápticos sugiere un mecanismo alostérico, no competitivo, puesto que la relación entre concentración y desplazamiento de α-bungarotoxina no es lineal (Siegel y Lukas, 1986).

Se podría pensar que los antagonistas del calcio, tras fijarse en sus receptores específicos, modificarían la unión de agonistas a receptores nicotínicos, de la misma manera que benzodiazepinas modifican la unión de GABA a sus receptores. Así, el agente con mayor actividad bloqueante sobre el canal lento sería también el que mayor bloqueo nicotínico produjera y como consecuencia, mayor actividad potenciadora del bloqueo neuromuscular inducido con pancuronio. Ello, evidentemente no esta confirmado, necesitándose otra aproximación experimental para comprobar esta hipótesis.

## III. DE LA POTENCIACION POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO DEL BLOQUEO NEUROMUSCULAR INDUCIDO CON SUCCINILCOLINA

El bloqueante neuromuscular, succinilcolina indujo un bloqueo de la contractilidad muscular dosis-dependiente, tanto cuando se administró en forma de infusión continua como si se administraba en bolos repetidos. No obstante, la preparación tuvo diferente sensibilidad a succinilcolina dependiendo de la forma de administración de ésta, ya que las $DE_{50}$ de succinilcolina administrada en forma de infusión continua fueron mayores (83.8 ± 4.73 µg/kg) que cuando se utilizaron bolos repetidos (49.62 ± 5.01 µg/kg).

Las características del bloqueo inducido con succinilcolina coinciden con las de un bloqueo despolarizante, puesto que como describiera Taylor (1985) se observaron fasciculaciones previas al comienzo del bloqueo y además, al aplicar estímulos "tren de cuatro", se mantuvieron todas las respuestas al tren de estímulos incluso cuando se alcanzaban grados de bloqueo del 90-95% tal y como describe Ali (1985) para caracterizar el bloqueo despolarizante puro.

En ninguna de las dos formas de administración de succinilcolina se observó bloqueo de fase II, lo que no esta totalmente de acuerdo con lo encontrado por otros autores administrando infusión continua de succinilcolina (Donati y Bevan, 1983). No obstante, en este caso la duración de la infusión fue al menos de 2-4 horas, mientras que en nuestro experimento el tiempo de infusión varió entre 30-50 minutos y ello podría explicar las

diferencias existentes. Así mismo los anéstesicos generales utilizados fueron distintos en ambos trabajos y es sabido que isofluorano y enfluorano favorecen la aparición de un bloqueo de fase II (Donati y Bevan, 1983), lo cual no se ha descrito en la interacción de succinilcolina con ketamina o uretano (anestésicos utilizados en nuestro experimento).

Puesto que los efectos de los antagonistas del calcio fueron diferentes cuando se utilizó una infusión continua de succinilcolina que cuando ésta se inyectó en forma de bolos repetidos, los analizaremos por separado.

a) ***Interacción entre antagonistas del calcio y succinilcolina administrada en infusión continua***

Dosis de 0.1 y 0.5 mg/kg de verapamil, diltiazem y nicardipina indujeron una potenciación del bloqueo neuromuscular producido mediante una infusión continua de succinilcolina. Estos resultados coincide con los trabajos realizados por Durant et al. (1984) quienes, "in vivo", también obtuvieron un aumento del bloqueo neuromuscular inducido por infusión continua de succinilcolina tras el tratamiento previo con verapamil a dosis comprendidas entre 0.1 y 1 mg/kg, y con los trabajos de Salvador et al. (1988) y Adam y Henderson (1986b) quienes demostraron potenciación por antagonistas del calcio de los efectos de succinilcolina "in vitro".

El máximo efecto potenciador de los antagonistas del calcio sobre el bloqueo neuromuscular inducido con succinilcolina es menor que la máxima potenciación de los efectos de pancuronio,

puesto que diltiazem potencia el efecto de succinilcolina 1.65 veces, mientras que nicardipina potencia el efecto de pancuronio 2.27 veces. Ello es lógico si se tiene en cuenta que los efectos de succinilcolina son menos sensibles a la reversión por calcio que los de pancuronio (Foldes, 1981).

El orden de potenciación por antagonistas del calcio fue nicardipina < verapamil = diltiazem. Nicardipina fue, pues, el fármaco menos potente, lo cual coincide con los resultados obtenidos "in vitro" por Salvador et al. (1988), pero no con los de Adam y Henderson (1986b) quienes demostraron que los efectos de nicardipina eran mayores que los de verapamil.

Se sabe que la actividad bloqueante de los canales del calcio es más uso-dependiente en el caso de verapamil y diltiazem, que en el de dihidropiridinas (Lee y Tsien, 1983; Triggle y Swamy, 1983). Dado que succinilcolina induce una despolarización mantenida de la membrana plasmática, se puede entender que el efecto de verapamil y diltiazem sobre el bloqueo neuromuscular inducido por succinilcolina sea mayor que el que ejerce nicardipina.

El efecto bloqueante nicotínico demostrado por Adam y Henderson (1986a) para nicardipina, podría contribuir a explicar la menor potenciación de los efectos de succinilcolina, puesto que los antagonistas nicotínicos contrarrestan los efectos de los bloqueantes despolarizantes (Bowman y Rand, 1980). Teniendo en cuenta ésto no es de extrañar que nicardipina potencie menos el efecto de succinilcolina .

Por último, es interesante resaltar que las acciones de diltiazem fueron esteroselectivas, siendo el isómero *d-cis* más potente que el *l-cis* lo cual sugiere que en los efectos de los antagonistas del calcio (al menos en el de diltiazem) estan implicadas las acciones bloqueantes de los canales lentos.

b) ***Interacción entre los antagonistas del calcio y succinilcolina administrada en bolos repetidos***

El efecto de succinilcolina administrada en bolos repetidos sólo fue potenciado por *d-cis* diltiazem, 0.5 mg/kg, pero no por esas mismas dosis de verapamil y nicardipina. Además la potenciación por *d-cis* diltiazem fue menor (ratio de potencia 1.21) que la que a las mismas dosis este agente produce cuando succinilcolina se administra en infusión continua (ratio de potencia 1.65). LLama pues la atención el hecho de que todos los antagonistas del calcio potencien en menor medida a succinilcolina cuando ésta se administra en forma de bolos.

Una posible explicación a ello podría basarse en parámetros cinéticos. Teniendo en cuenta que cuando succinilcolina se administra en bolos, los experimentos duraban al menos 90 minutos, mientras que en infusión duraban 50 minutos como máximo, se podría esperar una pérdida del efecto de los antagonistas del calcio por el descenso de los niveles plasmáticos de los mismos como consecuencia de su eliminación. Si ello fuera así se conservaría el efecto de los antagonistas del calcio al comienzo de la administración de succinilcolina y, por tanto se obtendría una potenciación de las dosis bajas de este bloqueante. Sin embargo, el

efecto de los antagonistas del calcio fue el mismo al comienzo y al final de los experimentos, lo que se opone a una explicación cinética.

Otra posible explicación, podría basarse en los mecanismos de feed-back positivos y negativos de la liberación del neurotransmisor que ejercen los receptores nicotínicos presinápticos, los cuales son estimulados por agonistas nicotínicos (succinilcolina lo es) en períodos de estimulación breve, mientras que el efecto es el opuesto cuando el período de estimulación se prolonga (Wessler, 1989). Así pues, cabría esperar una disminución de la liberación del neurotransmisor cuando succinilcolina se administra en infusión continua en cuyo caso tiene lugar una estimulación prolongada del receptor. Ello podría contribuir a disminuir el margen de seguridad de la transmisión neuromuscular y por tanto, a sensibilizar la placa motora al efecto de los antagonistas del calcio.

Es interesante señalar que el único antagonista del calcio que potenció el bloqueo neuromuscular fuera diltiazem (*d-cis*). No tenemos una explicación clara al respecto, aunque algunos autores opinan que este agente actúa preferentemente en el estado inactivo del canal del calcio (Lee y Tsien, 1983), el cual se asociaría con un estado de despolarización permanente de la membrana, tal y como sucede cuando se administra succinilcolina.

También en este caso, los efectos de diltiazem fueron esteroselectivos, puesto que *l-cis* diltiazem no los modificó. Ello, de nuevo sugiere que los canales del calcio juegan un papel en la interacción de estos agentes con bloqueantes neuromusculares despolarizantes.

Por último, hay que comentar que existen datos de potenciación por antagonistas del calcio de los efectos de algunos bloqueantes neuromusculares en humanos. En concreto, verapamil prolongó el tiempo de recuperación de pancuronio (Carlos y Erill, 1986) y vecuronio (Van Poorten et al., 1984). Por ello, el estudio de la interacción entre bloqueantes competitivos y despolarizantes con antagonistas del calcio, tanto en investigación animal como en clínica humana, e interesante.

# CONCLUSIONES

1. Los antagonistas del calcio verapamil, diltiazem (isómeros *d-cis* y *l-cis*) y nicardipina (0.1 y 0.5 mg/kg i.v.) no modificaron la altura de la contracción del músculo tibial anterior de gato estimulado electricamente a través del nervio ciático externo.

2. Verapamil, *d-cis* diltiazem y nicardipina potenciaron de un modo dosis-dependiente el bloqueo neuromuscular producido por pancuronio. El orden de potenciación fue nicardipina > *d-cis* diltiazem = verapamil.

3. La potenciación por diltiazem del efecto de pancuronio fue esteroselectiva, siendo el isómero *d-cis* más potente que el *l-cis*.

4. El bloqueo neuromuscular inducido con infusión continua de succinilcolina fue potenciado por todos los antagonistas del calcio utilizados. Sin embargo, en este caso el orden de potencia fue diferente. Así, *d-cis* diltiazem y verapamil fueron iguales y más potentes que nicardipina.

5. *l-cis* Diltiazem potenció los efectos de succinilcolina en infusión continua significativamente menos que lo hizo *d-cis* diltiazem.

6. Cuando succinilcolina se administró en bolos repetidos el único antagonista del calcio que potenció sus efectos neuromusculares fue *d-cis* diltiazem. Ni verapamil, ni nicardipina, ni *l-cis* diltiazem ejercieron ningún efecto.

7. La potenciación por diferentes tipos de antagonistas del calcio del efecto de bloqueantes neuromusculares competitivos y despolarizantes junto con la esteroselectividad demostrada para el efecto de diltiazem sugiere que los canales de calcio estan implicados en la interacción entre antagonistas del calcio y bloqueantes neuromusculares.

8. Nuestros datos indican que los antagonistas del calcio potencian los efectos de los bloqueantes neuromusculares "in vivo". Esta interacción, con todas las reservas que implica la extrapolación de datos de investigación con animales a humanos, podría manifestarse también en la práctica clínica, por lo que habría de ser tenida en cuenta en pacientes que reciban conjuntamente ambos tratamientos.

# BIBLIOGRAFIA

ABERNETHY, D.R. and SCHWARTZ, J.B.: Pharmacokinetic of calcium antagonists under development. *Clin. Pharmacokinet.* 15: 1-14, 1988.

ADAM, L.P. and HENDERSON, E.G.: Nicotinic receptor blockade by calcium channel antagonists in frog skeletal muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 463: 369-371, 1986a.

ADAM, L.P. and HENDERSON, E.G.: Augmentation of succinylcholine-induced neuromuscular blockade by calcium channels antagonists. *Neurosci. Lett.* 70: 148-153, 1986b.

ADAMS, A.P., JONES, R.M. and WALI, F.A.: Potentiation by verapamil of gallamine and pancuronium-induced blockade at the chick neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 85: 327P, 1985.

ADVENIER, C., CERRINA, J., DUROUX, P., FLOCH, A. and RENIER, A.: Effects of five different organic calcium antagonists in guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 82: 727-734, 1984.

AHMED, F., FOSTER, R.W. and SHALL, R.C.: Some effects of nifedipine in guinea-pig isolated trachealis. *Br. J. Pharmacol.* 84: 861-869, 1985.

ALNAES, E and RAHAMINOFF, R.: On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. *J. Physiol.* 248: 285-306, 1975.

ALI, H.H.: Monitoring of neuromuscular function. En R.L. Katz (dir.) *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects*, pp. 53-68. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

ANDERSON, K. E. and HÖGESTÄTT, E.D.: On the mechanism of action of calcium antagonist. *Acta Med. Scand.* (supp.) 681: 11-24, 1984.

ANDERSON, K.A. and MARSHALL, R.J.: Interactions between calcium entry blockers and vecuronium bromide in anaesthetized cats. *Br. J. Anaesth.* 57: 775-781, 1985.

ANTTILA, P. and VAPAATALO, H. : Decreased toxicity of d-tubocurarine after pretreatment with drugs elevating the intracelular level of AMPc in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 273: 175-178, 1972.

ARMSTRONG, D.L. and LESTER, H.A.: The kinetics of tubocurarine action and restricted diffusion within the synaptic cleft. *J. Physiol.* 294: 365-386, 1979.

AUERBACH, A. and BETZ, W.: Does curare affect transmitter release?. *J. Physiol.* 213: 691-705, 1971.

BAEYENS, J. M.: Interactions between calcium channel blockers and non-cardiovascular drugs: interactions with anticancer drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 63: 1-7, 1988.

BAEYENS, J.M., ESPOSITO, E., OSSOWSKA, G. and SAMANIN, R.: Effects of peripheral and central administration of calcium channel blockers in the naloxone-precipitated abstinence in morphine-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 9-14, 1987.

BAEYENS, J.M. and DEL POZO, E.: Interactions between calcium channel blockers and non cardiovascular drugs: interactions with drugs acting at the neuromuscular or the CNS level. *Pharmacol. Toxicol.* 62: 59-63, 1988.

BAKER, P., HODGKIN, A.L. and RIDGWAY, E.B.: Depolarization and calcium in squid giant axons. *J. Physiol.* 218: 709-755, 1971.

BAKER, P., HODGKIN, A.L. and STEINHARDT, R.A.: The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.* 200: 431-458, 1969.

BAKER, T., STANEC, A. and LOWNDES, H.E.: Prejunctional effects of vecuronium in the cat. *Anesthesiology* 65: 480-484, 1986.

BAKER, T., STANEC, A. and LOWNDES, H.E.: The prejunction effects of non-depolarizing muscle relaxants in the cat. *Anesthesiology* 69 (supp. 3A): A500, 1988.

BARNES, P.J.: Clinical studies with calcium antagonists in asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20: 2895-2985, 1985.

BARRIOS, M. and BAEYENS, J.M.: Differential effects of calcium channel blockers and stimulants on morphine withdrawal in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 152: 175-178, 1988.

BASTA, S.J., SAVARESE, J.J. ALI, H.H. et al.: Histamine-releasing potencies of atracurium, dimetyl tubocurarine and tubocurarine. *Br. J. Anaesth.* 55: 105S-106S, 1983.

BATES, R.F.L., BUCKLEY, G.A. and EGLEN, R.M.: Calcium antagonists: differential effects on guinea-pig and rat intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 77: 567P, 1982.

BELZ, G.G., DOERING, W., MUNKES, R. and MATTHEWS, J.: Interaction betweem digoxin and calcium antagonist and antiarrthymic drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33: 410-417, 1983.

BENCINI, A.F., MOL, W.E.M., SCAF, A.H.J., KERSTEM, U.W., AGOSTON, S. and MEIJER, R.F.: Uptake and excretion of vecuronium bromide and pancuronium bromide in the isolated perfused rat liver. *Anesthesiology* 69: 487-492, 1988.

BENEDEK, G. and SZIKSZAY, M.: Potentiation of termorregulatory and analgesic effects of morphine by calcium antagonists. *Pharmacol. Res. Commun.* 16: 1009-1018, 1984.

BENNETT, M.J. and HAHN, J.F.: Potentiation of the combination of pancuronium and metocurine by halothane and isofluorane in humans with and without renal failure. *Anesthesiology* 62: 759-764, 1985.

BEVAN, J.A., BEVAN, R.D., HWA, J.J. et al.: Calcium, extrinsic and intrinsic (myogenic) vascular tone. En *Calcium modulators*. Ed. by T. Godfraind, A. Albertini and R. Paoletti, pp. 125-132. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, 1982.

BIKHAZI, G.B., FLORES, C. and FOLDES, F.F.: The effect of verapamil and EGTA on the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Anesth. Analg.* 64: 505-508, 1985.

BIKHAZI, G.B., LEUNG, I. and FOLDES, F.F.: Interaction of neuromuscular blocking agents with calcium channel blockers. *Anesthesiology* 57A: 268, 1982.

BIKHAZI, G.B., LEUNG, I. and FOLDES, F.F.: Ca-channel blockers increase potency of neuromuscular blocking agents in vivo. *Anesthesiology* 59A: 269, 1983.

BIKHAZI, G.B., LEUNG, I., FLORES, C., MIKATI, H.M.J. and FOLDES, F.F. : Potentiation of neuromuscular blocking agents by calcium channel blockers in rats. *Anesth. Analg.* 67: 1-8, 1988.

BIKHAZI, G.B., THOMAS, K.C. and FOLDES, F.F.: Effects of verapamil and EGTA on mammalian muscle in vitro. *Anesthesiology* 51: S275, 1979.

BIRMINGHAM, A.T. and HUSSAIN, S.Z.: A comparison of the skeletal neuromuscular and autonomic ganglion-blocking potencies of five non-depolarizing relaxants. *Br. J. Pharmacol.* 70: 501-506, 1980.

BLABER, L.C.: The prejunctional actions of some non-depolarizing blocking drugs. *Br. J. Pharmacol.* 47: 109-116, 1973.

BLANK, T.J.J., RUNGE, S. and STEVESON, R.L.: Halothane decreases calcium channel antagonist binding to cardiac membranes. *Anesth. Analg.* 67: 1032-1035, 1988.

BLINKS, J.P., RUDEL, R. and TAYLOR, S.R.: Calcium transients in amphibian skeletal muscle fibers: detection with aequorin. *J. Physiol.* 277: 291-323, 1978.

BOLGER, G.T., RAFFERTY, M.F., CRAWLEY, J.N., PAUL, S.M. and SKOLNICK, P. : Effects of calcium antagonists on phencyclidine behaviors. *Pharm. Biochem. Behav.* 25: 45-49, 1986a.

BOLGER, G.T., RAFFERTY, M.F. and SKOLNICK, P.: Enhancement of brain calcium antagonist binding by phencyclidine and related compounds. *Pharm. Biochem. Behav.* 24: 417-423, 1986b.

BOLGER, G.T., RAFFERTY, M.F., WEISSMAN, B.A., RICE, K.C. and SKOLNICK, P. : Acylating phencyclidines irreversibly enhance brain calcium antagonist binding. *Pharm. Biochem. Behav.* 25: 51-57, 1986c.

BONGIANNI, F., CARLA, V., MORONI, F. and PELLEGRINI-SAMPIETRO, D.E.: Calcium channel inhibitors suppress the morphine-withdrawal syndrome in rats. *Br. J. Pharmacol.* 88: 561-567, 1986.

BOWMAN, W.C. and RAND, M.J.: Striated muscle and neuromuscular transmission. En *Textbook of pharmacology* (2ª ed.) pp. 17.1-17.53. Oxford. Blackwell, 1980.

BOWMAN, W.C.: Non-relaxant properties of neuromuscular blocking drugs. *Br. J. Anaesth.* 54: 147-160, 1982.

BOWMAN, W.C., MARSHALL, I.G. and GIBB, A.J.: Is there feedback control of transmitter release at the neuromuscular junction?. En R.L. Katz (dir.). *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects*, pp. 39-52. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

BRAUNWALD, E.: Mechanism of action of calcium channel-blocking agents. *N. Engl. J. Med.* 26: 618-1627, 1982.

BREGESTOVSKI, P.D., MILLER, R. and PARKER, I.: Calcium conductance of acetylcholine-induced endplate channels. *Nature* 279: 638-639, 1979.

BRISTOW, M.R., GINSBURG, R., LASER, J.A., McAULEY, B.J. and MINOBE, W.: Tissue selectivity of calcium antagonist is not due to heterogeneity of 3H-nitrendipine binding sites. *Br. J. Pharmacol.* 82: 309-320, 1984.

BUCKETT, W.R., MARJORIBANKS, C.E.B., MARWICK, F.A. and MORTON, M.B.: The pharmacology of pancuronium bromide (Org. NA 97), a new potent steroidal neuromuscular blocking agent. *Br. J. Pharmacol.* 32: 671-682, 1968.

BUHLER, F.R. and KIOWSKI, W.: Calcium antagonists and their potential for antihypertensive therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522: 584-599, 1988.

CARLOS, R. and ERILL, S.: Therapeutic rounds.*Clin. Ther.* 9: 22-23, 1986.

CARO, G., BARRIOS, M. and BAEYENS, J.M.: Dose-dependent and steroselective antagonism by diltiazem of naloxone-precipitated morphine abstinence after acute morphine-dependence in vivo and in vitro. *Life Sci.* 43: 1523-1527, 1988.

CARPENTER, R.L. and MULROY, M.F.: Edrophonium antagonizes combined lidocaine-pancuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology* 65: 506-510, 1986.

CHAFFMAN, M. and BRODGEN, R.N.: Diltiazem: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 29: 387-454, 1985.

CHANG, C.C.: Use α and β-bungarotoxins for the study of neuromuscular transmission. *Anesthesiology* 48: 309-316, 1978.

CHANG, F.C. and HONEY, M.M.: Dihydropyridine and phenilalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J. Biol. Chem.* 263: 18929-18937, 1988.

CHANG, C.C., OLIN, S., HONG, S. and CHIOU, L.C.: Neuromuscular block by verapamil and diltiazem and inhibition of acetylcholine release. *Brain Res.* 454: 332-339, 1988.

CHAPMAN, D.B. and WAY, E.L.: Metal ion interactions with opiates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 553-579, 1980.

CHAUDRY, I.A., TOROCSIK, A. and BIRO, K.: The effect of muscle relaxants on postsynaptic nicotinic and muscarinic receptors. *Anesthesiology* 69 (supp. 3A): A515, 1988.

CHIARANDINI, D.J., SANCHEZ, J.A. and STEFANI, E.: Effect of calcium withdrawal on mechanical threshold in skeletal muscle fibers of the frog. *J. Physiol.* 303: 153-163, 1980.

CHIN, J.H.: Differential sensitivity of calcium channels to dihydropiridines. The modulated receptor hypothesis. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4115-4120, 1986.

CHOI, W.W., GERGIS, S.D. and SOKOLL, M.D.: The effects of d-tubocurarine, pancuronium and atracurium on the responses of gastronecmius and soleus muscles in the cat. *Acta Anesthesiol. Scand.* 28: 608-611, 1984a.

CHOI, W.W., GERGIS, S.D. and SOKOLL, M.D.: Effects of succinylcholine chloride on the response on fast and slow muscle in the cat. *Acta Anesthesiol. Scand.* 28: 516-520, 1984b.

CLARK, A.L., HOBBIGER, F. and TERRAR, D.A.: Effects of pancuronium and hexametonium on paraoxon-induced twitch potentiation and antidromic firing in rat phrenic nerve diaphragm preparations. *Br. J. Pharmacol.* 80: 489-496, 1983.

CONTRERAS, E., TAMAYO, L. and AMIGO, N.: Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 463-466, 1988.

COOK, D.R., WINGARD, L.B. and TAYLOR, F.M.: Pharmacokinetic of succinylcholine in infants, children and adults. *Clin. Pharmacol. Ther.* 20: 493-498, 1976.

COOK, D.R., STILLER, R.L., CHAKRAVORTI, S. and MANNENHIRA, T.: Cimetidine does not inhibit plasma anticholinesterasa activity. *Anesth. Analg.* 67: 375-376, 1988.

CREESE, R. and MITCHELL, L.D.: Spontaneus recovery from depolarizing drugs in rat diaphragm. *J. Physiol.* 313: 173-186, 1981.

CRONNELLY, R.: Muscle relaxants antagonists. En R.L. Katz (dir.). *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects.* pp. 197-213. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

CRONNELLY, R. and MORRIS, R.B.: Antagonism of neuromuscular blockade. *Br. J. Anaesth.* 54: 183-194, 1982.

DAY, N.S., BLAKE, G.J., STANDAERT, F.G. and DRETCHEN, K.L.: Characterization of the train-of-four response in fast and slow muscles: effect of d-tubocurarine, pancuronium and vecuronium. *Anesthesiology* 58: 414-417, 1983.

DeBROS, F. and GISSEN, A.J.: Determination of d-tubocurarine by liquid-chromatography. *Anesthesiology* 51: S265, 1979.

DELBONO, O. OBEJERO PAZ, C.A. and MUCHNIK, S.: The effect of verapamil and Ca free solution on mechanical and electrical properties in fast twitch mammalian skeletal muscles. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinaam.* 37: 423-435, 1987.

DEL POZO, E. and BAEYENS, J.M.: Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.* 128: 49-54, 1986.

DEL POZO, E. and BAEYENS, J.M.: Neuromuscular blockade induced by flunarizine alone and in combination with pancuronium, suxamethonium or neomycin: studies in isolated rat phrenic-hemidiaphragm preparation. *Acta Anaesthesiol. Scand.* (en prensa), 1989.

DEL POZO, E., CARO, G. and BAEYENS, J.M.: Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 155-160, 1987.

DEFEUDIS, F.V. and CHRISTEN, M.O.: State and use-independent $Ca^{2+}$ antagonists offer hope in control of GI disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 170-172, 1989.

DIWAN, P.V., SHARMA, P.L. and VARMA, Y.S.: Neuromuscular blocking action of sodium nitropruside alone and with d-tubocurarine. *Eur. J. Pharmacol.* 63: 183-185, 1980.

DOCHERTY, J.R. and McGRATH, J.C.: Sympathomimetic effects of pancuronium bromide on the cardiovascular system of the pithed rat: a comparison with the effects of drugs blocking the neuronal uptake of noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* 64: 589-599, 1978.

DODGE, F.A. and RAHAMINOFF, R.: Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 193: 419-432, 1975.

DOENICKE, A.: Studies of enzymatic inactivation of suxamethonium. *Br. J. Anaesth.* 40: 834, 1968.

DOLIN, S.J. and LITTLE, H.J.: Augmentation by calcium channel antagonist of general anaesthetic potency in mice. *Br. J. Pharmacol.* 88: 909-914, 1986.

DONATI, F. and BEVAN, D.R.: Potentiation of succinylcholine phase II block with isofluorane. *Anesthesiology* 58: 552-555, 1983.

DONATI, F., WALSH, C.M., LAVELLE, P.A. and BEVAN, D.R.: Onset of pancuronium and d-tubocurarine blockade with priming. *Can. Anaesth. Soc. J.* 33: 571-577, 1986.

DORKINS, H.R.: Suxamethonium: The development of a modern drug from 1906 to the present day. *Med. Hist.* 26: 145-168, 1982.

DORMANDY, J.: Clinical use of calcium antagonists in peripheral circulatory disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522:611-620, 1988.

DREYER, F.: Acetylcholine receptor. *Br. J. Anaesth.* 54: 115-130, 1982.

DRIESSEN, J.J., VREE, T.B. and VAN EGMOND, J.: In vitro interaction of diazepam and oxazepam with pancuronium and suxamethonium. *Br. J. Anaesth.* 56: 1131-1138, 1984.

DRIESSEN, J.J., WUIS, E.W. and GIELEN, M.J.M.: Prolonged vecuronium neuromuscular blockade in a patient receiving orally administered dantrolene. *Anesthesiology* 62: 523-524, 1985.

DULHUNTY, A.F. and GAGE, P.W.: Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscles. *J. Physiol.* 399: 63-80, 1987.

DUNCAN, C.J. and STATHAM, H.E.: Interacting effects of temperature and extracellular calcium on the spontaneous release of transmitter at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 268: 319-333, 1977.

DURANT, N.N., HOWERTJES, M.C. and AGOSTON, S.: Renal elimination of Org NC 45 and pancuronium. *Anesthesiology* 51(supp. 3): S266, 1979a.

DURANT, N.N., MARSHALL, I.G., SAVAGE, D.S., NELSON, D.J., SLEIGH, T. and CARLYLE, J.C.: The neuromuscular and autonomic blocking activities of pancuronium, Org NC 45 and other pancuronium analogues, in the cat. *J. Pharm. Pharmacol.* 31: 831-836, 1979b.

DURANT, N.N. and KATZ, R.L.: Suxamethonium. *Br. J. Anaesth.* 54: 195-208, 1982.

DURANT, N.N., NGUYEN, N. and KATZ, R.L.: Potentiation of neuromuscular blockade by verapamil. *Anesthesiology* 60: 298-303, 1984.

EICHELBAUM, M., MIKUS, G. and VOGELGESANG, B.: Pharmacokinetics of (+), (-) and (±) verapamil after intravenous administration. *Br. J. Pharmacol.* 17: 453-458, 1984.

ERBRAHIM, Z., BULKLEY, R. and ROTH, S.: Carbamazepine therapy and neuromuscular blockade with atracurium and vecuronium. *Anesth. Analg.* 67 (supp. Si-S266): S55, 1988.

ERTAMA, P.M.: Histamine liberation in surgical patients following administration of neuromuscular blocking drugs. *Ann. Clin. Res.* 14: 27-31, 1982.

FIEKERS, J.F.: Effects of the aminoglycoside antibiotics, streptomycin and neomycin, on neuromuscular transmission. II. Postsynaptic considerations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225: 496-502, 1983.

FLAIM, S.F. and ZELIS, R.: Diltiazem pretreatment reduces experimental myocardial infarct size in rat. *Pharmacology* 2: 281-286, 1981.

FLAIM, S.F.:Comparative pharmacology of calcium blockers based on studies of vascular smooth muscle. En *Calcium blockers. Mechanism of action and clinical applications.* Ed. by S.F. Flaim and R. Zelis, pp. 155-177. Urban and Schwarzenbery. Baltimore. Munich, 1982.

FLAMENG, W.: Myocardial protection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522: 600-610, 1988.

FLECKENSTEIN, A.: Specificic pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pace-makers and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17: 146-166, 1977.

FLECKENSTEIN, A.: History of calcium antagonists. *Cir. Res.*(supp. I) 52: I3-I16, 1983.

FOLDES, F.F.: The significance of physiological $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ concentrations for in vitro experiments on synaptic transmission. *Life Sci.* 28: 1585-1590, 1981.

FOLDES, F.F., CHAUDHRY, I. and OHTA, Y.: The influence of stimulation parameters on the potency and reversibility of neuromuscular blocking agents. *J. Neural. Transm.* 52: 227-249, 1981.

FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E. and LAZDUNSKI, M.: 3H-nitrendipine labelling of the $Ca^{2+}$ channel in skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 86: 141-142, 1983.

FRANK, G.B., KONYA, L. and SUDHA, T.S.: Nitrendipine blocks high potassium contractures but not twitches in rat skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66: 1210-1213, 1988.

FRANKIS, N.H.: Verapamil and bepridil on potasium-evoked contractures of guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 80: 610P, 1983.

GALINDO, A.: Curare and pancuronium compared: effects on previously undepressed mammalian myoneural junction. *Science* 178: 753-755, 1972.

GALLANT, E.M. and GOETTL, V.M.: Effects of calcium antagonists on mechanical responses of mammalian skeletal muscles. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 259-265, 1985.

GARDIER, R.W., TSEVDOS, E.J. and JACKSON, D.B.: The effect of pancuronium and gallamine on muscarinic transmission in the superior cervical ganglion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204: 46-53, 1978.

GENCARELLI, P.J. and MILLER, R.D.: Antagonism of Org NC 45 (vecuronium) and pancuronium neuromuscular blockade by neostigmine. *Br. J. Anaesth.* 54: 53-56, 1982.

GERBER, H.R., ROMPPAINEN, J. and SCHWINN, W.: Potentiation of atracurium by pancuronium and d-tubocurarine. *Can. Anaesth. Soc. J.* 33: 563-570, 1986.

GERGIS, S.D., DRETCHEN, K.L., SOKOLL, M.D. and LONG, J.P.: The effect of neuromuscular blocking agents on acetylcholine release. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 693-695, 1971.

GERGIS, S.D., DRETCHEN, K.L., SOKOLL, M.D. and LONG, J.P.: Effect of pancuronium bromide on acetylcholine release. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139: 74-76, 1972.

GLIDDEN, R.S., MARTYN, J.A. and TOMERA, J.F.: Azathioprine fails to alter the dose-response curve of d-tubocurarine in rats. *Anesthesiology* 68: 595-598, 1988.

GODFRAIND, T., MILLER, R. and WIBO, M.: Calcium antagonists and calcium entry blockers. *Pharmacol. Rev.* 38: 321-417, 1986.

GONZALEZ, C. y SANCHEZ, C.F.: Antagonistas del calcio y circulación cerebral. *Farmacoterapia* 2: 28-31, 1985.

GONZALEZ-SERRATOS, H, VALLE-AGUILERA, R., LATHROP, D.A. and GARCIA, M.C.: Slow inward calcium currents have no obvius role in muscle excitation-contraction coupling. *Nature* 298: 292-294, 1982.

GRANGER, S.E., HOLLINGSWORTH, M. and WESTON, A.N.: A comparison of several calcium antagonist on uterine, vascular and cardiac muscles from the rat. *Br. J. Pharmacol.* 85: 255-262, 1985.

GREBB, J.A.: Nifedipine and flunarizine block amphetamine-induced behavioral stimulation in mice. *Life Sci.* 38 2375-2381, 1986.

GREBB, J.A., ELLSWORTH, K.A. and FREED, W.J.: Differences between calcium channel inhibitors in their effects on phencyclidine-induced behavioral stimulation in mice. *Pharm. Biochem. Behav.* 23: 613-618, 1985.

HAERING, J.M., FIAMENGO, S.A. and HARTMAN, G.S.: Pre and postjunctional interactions of vecuronium with succinylcholine in the cat. *Anesth. Analg.* 67 (supp.): S83, 1988.

HAMANN, S.R., BLOUIN, R.A. and McALLISTER, Jr. R.G.: Clinical pharmacokinetics of verapamil. *Clin. Pharmacokinet.* 9: 26-41, 1984.

HAMANN, S.R., TODD, G.D. and McALLISTER, R.G.: The pharmacology of verapamil. Tissue distribution of verapamil and norverapamil in rat and dog. *Pharmacology* 27: 1-8, 1983.

HARDER, D.R., BELARDINELLI, L., SPERELAKIS, N. : Differential effects of adenosine and nitroglycerin on the action potentials of large and small coronary arteries. *Cir. Res.* 44: 176-182, 1979.

HATAE, J.: Effects of nicardipine on frog skeletal muscle in normal and calcium-free media. *Jpn. J. Physiol.* 36: 339-348, 1985.

HAY, D.W. and WADSWORTH R.M.: Local anaesthetic activity of organic calcium antagonists: relevance to their actions on smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 77: 221-228, 1982.

HENNIS, P.J. and STANSKI, D.R.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic factors govern the clinical use of muscle relaxants. En R.L. Katz (dir.). *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects*, pp. 179-195. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

HERLICH, A., EISENKRAFT, J.B. and HUBBARD, M.: Atracurium pretratment for prevention of succinylcholine fasciculations. *Anesth. Analg.* 67: 419, 1988.

HIGUCHI, S., SASAKI, H. and SEKI, T.: Pharmacokinetic studies on nicardipine hydrochloride, a new vasodilator after repeated administration to rats, dogs and humans. *Xenobiotica* 10: 897-903, 1980.

HILL, D.C., CHELLY, J.E., DLEWATI, A., ABERNETHY, D.R., DOURSOUT, M.F. and MERJIN, R.G.: Cardiovascular effects of and interaction between calcium blocking drugs and anesthetics in chronically instrumented dog. VI. Verapamil and fentanyl-pancuronium. *Anestesiology* 68: 874-879, 1988.

HILL, G.E. and HODGES, M.R.: Lithium carbonate and neuromuscular blocking agents. *Anesthesiology* 46: 122-126, 1977.

HOLST-LARSON, H.: The hydrolisis of suxamethonium in human blood. *Br. J. Anaesth.* 48: 887-891, 1976.

HOSEY, M.M. and LAZDUNSKI, M.: Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membrane Biol.* 104: 81-105, 1988.

HUGENHOLTZ, P.G.: Calcium antagonists for angina pectoris. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522: 565-583, 1988.

HUGHES, R. and CHAPPLE, D.J.: Effects of non-depolarizing neuromuscular blocking agents on peripheral autonomic mechanism in cats. *Br. J. Anaesth.* 48: 59-68, 1976a.

HUGHES, R. and CHAPPLE, D.J.: Cardiovascular and neuromuscular effects of dymethil tubocurarine in anaesthetized cat and rhesus monkeys. *Br. J. Anaesth.* 48: 847-852, 1976b.

HUGHES, R. and CHAPPLE, D.J.: The pharmacology of atracurium: a new competitive neuromuscular blocking agent. *Br. J. Anaesth.* 53: 31-44, 1981.

HULL, C.J.: Pharmacodynamics of non-depolarizing neuromuscular blocking agents. *Br. J. Anaesth.* 54: 169-182, 1982.

HURWITZ, L.: Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 225-258, 1986.

IDELFONSE, M., JACQUEMOND, V., ROUGIER, O., RENAUD, J.F., FOSSET, M. and LAZDUNSKI, M.: Excitation contraction coupling in skeletal muscle: evidence for a role of slow $Ca^{2+}$ channels using $Ca^{2+}$ channels activators and inhibitors in the dihydropyridine series. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 904-909, 1985.

ILIAS, W. and STEINBEREITHNER, K.: Potentiation of pancuronium induced neuromuscular blockade by calcium channels blockers in vitro. *J. Neural. Transm.* 61: 285-293, 1985.

ILIAS, W.K., WILLIAMS, C.H., FULFER, R.T. and DOZIER, S.E.: Diltiazem inhibits halothane-induced contractions in malignant hyperthermia susceptible muscle in vitro. *Br. J. Anaesth.*57: 994-996, 1985.

IVANKOVICH, A.D., MILETICH, D.J., ALBRECHT, R.F. and ZAHED, B.: The effect of pancuronium on myocardial contraction and catecholamine metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 3499-3507, 1975.

IWATSUKI, N., KOGA, Y. and AMAHA, K.: Calcium channel blockers for treatment of malignant hyperthermia. *Anesth. Analg.* 62: 855-862, 1983.

JANIS, R.A. and SCRIABINE, A.: Sites of action of $Ca^{2+}$ channel inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 32: 3499-3507, 1983.

JEDEIKIN, R., DOLGUNSKI, E., KAPLAN, R. and HOFFMA, S.: Prolongation of neuromuscular blocking effect of vecuronium and antibiotics. *Anaesthesia* 42: 858-860, 1987.

JENDEN, D.J., KAMIJO, K. and TAYLOR, D.B.: The action of decamethonium on the isolated rabbit lumbrical muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 103: 229-240, 1954.

JOHNSON, S.M., MAURISON, D.R., WILLERSON, J.T. and HILLIS, L.D.: A comparison of verapamil and nifedipine in patients with Prinzmetal's variant angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 47: 398, 1981.

JONES, R.M.: Calcium antagonists. *Anaesthesia* 39: 747-749, 1984.

JONES, R.M.: Neuromuscular transmission and its blockade. Pharmacology monitoring and physiology updated. *Anaesthesia* 40: 964-976, 1985.

KAMBAM, J.R., DYMOND, D.R. and KRESTOW, M. : Effect of cimetidine on duration of action of succinylcholine. *Anesth. Analg.* 66: 191-192, 1987.

KAPUR, P.A., and FLACKE, W.E.: Epinephrine induced arrhythmias and cardiovascular function after verapamil during halothane anesthesia in the dog. *Anesthesiology* 55: 210-225, 1981.

KAPUR, P.A., GROGAN, D.L. and FOURNIER, D.J.: Cardiovascular interactions of lidocaine with verapamil or diltiazem in the dog. *Anesthesiology* 68: 79-85, 1988.

KATES, R.E.: Calcium antagonists: pharmacokinetic properties. *Drugs* 25: 113-124, 1983.

KATZ, A., MESSINEO, C. and HERBETTE, L.: Ions channels in membranes. *Circulation* 65 (supp. 1): I1-I10, 1982.

KATZ, B. and MILEDI, R.: Input-output relation of a single synapse. *Nature* 212: 1242-1245, 1966.

KATZ, B. and MILEDI, R.: Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature* 226: 962-963, 1970.

KATZ, R.L. and KATZ, G.J.: Clinical considerations in the use of muscle relaxants. En R.L. Katz (dir.). *Muscle relaxants.* pp. 313. Amsterdam. London. New York, 1975.

KATZ, R.L. and RYAN, J.F.: The neuromuscular effect of suxamethonium in man. *Br. J. Anaesth.* 41: 381-390, 1969.

KEEFE, D.L., YEE, Y.G. and KATES, R.E.: Verapamil protein binding in patients and in normal subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29: 21-26, 1981.

KEER, L.M. and SPERELAKIS, N.: Effects of the calcium antagonists bepridil (cerm-1978) and verapamil on $Ca^{2+}$-dependent slow action potentials in frog skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222: 80-86, 1982.

KIENLEN, J.: Neuromuscular junction and mechanism of action of muscle relaxants. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 3: 116-128, 1984.

KINOSHITA, M., MOTOMURA, M., KUSUKAWA, R. and KAWAKITA, S.: Comparison of hemodynamic effects between β-blocking agents and a new antianginal agent, diltiazem hydrochloride. *Jnp. Circ. J.* 43: 587-598, 1979.

KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, M. and FLECKENSTEIN, A.: Differentiation of the transmembrane Na and Ca-channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflügers Arch.* 335: 309-322, 1972.

KOHLHARDT, M, and FLECKENSTEIN, A.: Inhibition on the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 298: 267-272, 1977.

KOHLHARDT, M. and HAAP, K.: The blockade of Vmax. of the action potential produced by the slow channel inhibitors verapamil and nifedipine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Parmacol.* 316: 178-185, 1981.

KOTSIAS, B.A., MUCENIK, S. and OBEJERO, C.A.: $Cc^{2+}$, low $Ca^{2+}$ and verapamil reduce mechanical activity in rats skeletal muscles. *Am. Physiol. Soc.* C40-C46, 1986.

KRAYNACK, B.J., LAWSON, N.W. and GINTAUTAS, J.: Neuromuscular blocking action of verapamil in cats. *Can. Anaesth. Soc. J.* 30 (supp. 3I): 242-247, 1983a.

KRAYNACK, J.B., LAWSON, N.W., GINTAUTAS, J. and TJOENJTJAY, H.: Effects of verapamil on indirect muscle twitch responses. *Anesth. Analg.* 62: 827-830, 1983b.

KRIEG, N., RUTTEN, J.M.J. and CRUL, J.F.: Preliminary review of the interactions of Org NC 45 with anaesthetics and antibiotics in animals. *Br. J. Anaesth.* 52: 33S-36S, 1980.

KRIEG, N., HENDRICK, H.H.L. and CRUL, J.F.: Influence of suxamethonium on the potency of Org NC 45 in anesthetized patients. *Br. J. Anaesth.* 53: 259-262, 1981.

KUHLMANN, J.: Effects of nifedipine and diltiazem on plasma levels and renal excretion of β-acetyldigoxin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 37; 2: 150-155, 1985.

LAWSON, N.W., KRAYNACK, B.J. and GINTAUTAS, J.: Neuromuscular and electrocardiographic responses to verapamil in dogs. *Anesth. Analg.* 62: 50-54, 1983.

LAZZARRA, R., El-SHERIF, N. and HOPE, R.R.: Ventricular arrhytmias and electrophisiological consequences of myocardial ischemia and infarction. *Cir. Res.* 42: 740-748, 1978.

LEE, C.: Succinylcholine: its past, present and future. En R.L. Katz (dir.) *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects.* pp. 68-86. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

LEE, K.S. and TSIEN, R.W.: Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D-600, diltiazem and nifedipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302: 790-794, 1983.

LEWIS, B., HITH, A. and GOSTMAN, M.: Inmediate hemodinamyc effects of verapamil in man. *Cardiology* 60: 366-370, 1976.

LEWIS, J.C.: Adverse reactions to calcium antagonist. *Drugs* 25: 196-222, 1983.

LYNCH, C.: Combined depressant effects of diltiazem and volatile anesthetics on contractility in isolated ventricular myocardium. *Anesth. Analg.* 67: 1036-1046, 1988.

MARSHALL, I.G.: The ganglion blocking and vagolytic actions of three short-acting neuromuscular blocking drugs in the cat. *J. Pharm. Pharmacol.* 25: 530-536, 1973.

MARSHALL, R.J., McGRATH, J.C., MILLER, R.D., DOCHERTY, J. and LAMAR, J.C.: Comparison of the cardiovascular effects of Org NC 45 with those produced by other non-depolarizing neuromuscular blocking agents in experimental animal. *Br. J. Anaesth.* 52: 21S-32S, 1980.

MARSHALL, R. J. and OJEWOLE, J.A.O.: Comparison of the autonomic effects of some currently-used neuromuscular blocking agents. *Br. J. Pharmacol.* 66: 77P-78P, 1979.

MAS-OLIVA, J. and NAYLER, G.: The effect of verapamil on the $Ca^{2+}$ transporting and $Ca^{2+}$ ATPase activity of isolated cardiac sarcolemmal preparations. *Br. J. Pharmacol.* 70: 617-624, 1980.

MASSEY, I.J., WU, A.T. and KUSHINSKY, S.: A high pressure liquid chromatographic method for the simultaneous determination of nicardipine and its metabolite M-5 in plasma. *J. Pharm. Sci.* 73: 1444-1447, 1984.

McCLESKEY, E.W.: Calcium channels and intracellular calcium release are pharmacologically different in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 361: 231-249, 1985.

McINDEWAR, I.C. and MARSHALL, R.J.: Interactions between the neuromuscular blocking Org NC 45 and some anesthetic, analgesic and antimicrobial agents. *Br. J. Anaesth.* 53: 785-791, 1981.

MEIJER, D.K.F., WEITERING, J.G., VERMEER, G.A. and SCAF, A.H.: Comparative pharmacokinetic of d-tubocurarine and metocurine in man. *Anesthesiology* 51: 402, 1979.

MELLOW, A.M., PERRY, B.D. and SILINSKY, E.M.: Effects of calcium and strontium in the process of acetylcholine release from motor nerve endings. *J. Physiol.* 328: 547-562, 1982.

MILLER, R.D.: Pharmacokinetics of competitive muscle relaxants. *Br. J. Anaesth.* 54: 161-167, 1982.

MILLER, R.D.: Vecuronium. En R.L. Katz (dir.). *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects.* pp. 103-115. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

MILLER, R.J.: Multiple calcium channel and neuronal function. *Science* 235: 46-52, 1987.

MITCHELSON, F. and ZIEGLER, A.: The effect of gallamine, gallopamil and nifedipine on response to acetylcholine and carbachol in the taenia of the guinea-pig caecum. *Br. J. Pharmacol.* 83: 145-155, 1984.

MOLGO, J.: Effects of aminopyridines on neuromuscular trasmission. En *Advances in the biosciences. Aminopyridines and similary acting drugs.* Ed. P. Lechat et al., pp. 95-116. Oxfor and New York, Pergamon Press, 1982.

MOLGO, J., LEMEIGNAN, M. and LECHAT, P.: Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 203: 653-663, 1971.

MOREL, N. and GODFRAIND, D.T.: Selective modulation by membrane potential of the interaction of some calcium entry blockers with calcium channels in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 95: 252-258, 1988.

MORITA, K., MATSUO, S., NAGASHIMA, H., KANAREK, B., DUNCAL, F.D. and FOLDES, F.F.: In vivo muscle relaxants-local anaesthetic interactions. *Anesthesiology* 51: S282, 1979.

MOSS, I., ROSOW, C.E. and SAVARESE, J.J.: Role of histamine in the hypontensive action of d-tubocurarine in humans. *Anesthesiology* 55: 19-25, 1981.

MURPHY, K.M. and SNEYDER, S.: Calcium antagonist receptor binding sites labelled with 3H-nitrendipine. *Eur. J. Pharmacol.* 77: 201-202, 1982.

NADEMANEE, K.and SINGH, B.N.: Control of cardiac arrhytmias by calcium antagonism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522: 536-552, 1988.

NAGAO, T., SATO, M., IWASAWA. Y., TAKADA, T., ISHIDA, R., NAKAJIMA, H. and KIYOMOTO, A. : Studies on a new 1.5 -benzothiazepine derivate (CRD 401). III. Effects of optical isomers of CRD 401 on smooth and other pharmacological properties. *Jpn. J. Pharmacol.* 22: 467-478, 1972.

NAKAMURA, K., KOIDE, M. and IMANAGA, T.: Prolonged neuromuscular blockade following trimetaphan. *Anaesthesia* 35: 1202-1207, 1980.

NAYLER, W.G. and DILLON, J.S.: Calcium antagonists and their mode of action: an historical overview. *Br. J. Pharmacol.* 21: 97S-107S, 1986.

NICOLA-SIRI, L., SANCHEZ, J.A. and STEFANI, E.: Effect of glycerol treatment of calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 305: 87-96, 1980.

NINOMIYA, K.: A study in the interaction of d-tubocurarine and succinylcholine using evoked electromyography in man. *Jpn. J. Anaesth.* 35: 114-124, 1986.

NORDGREN, J.K., FORNEY, R.B. and CARROLL, F.J.: Analysis of succinylcholine in tissues and body fluids by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Toxicol.* 53 (supp. 6): 339-350, 1983.

NOWICKY, M.C., FOX, A.C. and TSIEN, R.W.: Three tipes of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440-443, 1985.

PANG, D.C. and SPERELAKIS, N.: Nifedipine, diltiazem, bepridil and verapamil uptake into cardiac and smooth muscles. *Eur. J. Pharmacol.* 87: 199-207, 1983.

PATMORE, L. and WITHING, R.L.: Selective calcium entry blocking properties of nicardipine. IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology Abstracts: 880 P. Londres, 1984.

PATON, W.D.M. and WAUD, D.R.: The margin of safety of neuromuscular transmission. *J. Physiol.* 191: 59-60, 1967.

PENNER, R. and DREYER, F.: Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Plügers Arch.* 406: 190-197, 1986.

PILLAI, N.P. and ROSS, D.H.: Opiate receptor mediated hyperthermia responses in rat following $Ca^{2+}$ channel antagonist. *Pharm. Biochem. Behav.* 25: 555-560, 1986a.

PILLAI, N.P. and ROSS, D.H.: Interaction of k receptor agonist with $Ca^{2+}$ channel antagonist in the modulation of hypothermia. *Eur. J. Pharmacol.* 132: 237-244, 1986b.

POLLARD, B.J. and JONES, R.M.: Interactions between tubocurarine, pancuronium and alcuronium demonstrated in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Br. J. Anaesth.* 55: 1127-1131, 1983.

POTREAU, D. and RAYMOND, G.: Slow inward calcium current and contraction on frog single muscle fibers. *J. Physiol.* 282: 17P-18P, 1978.

PUBLICOVER, S.J. and DUNCAN, C.J.: The action of verapamil on the rate of spontaneous release of transmitter at the frog neuromuscular junction. *Eur. J. Pharmacol.* 54: 119-127, 1979.

QUILL, T.J., GLASS, P.S.A. and BEACH, C.A.: Efficacy of vecuronium by continuous infusion with either isofluorane or fentanyl-nitrous oxide anaesthesia. *Anesth. Analg.* 67 (supp.): S176, 1988.

RAMEIS, H., MAGOMETSCHNIGG, D. and GANZINGER, U.: The diltiazem-digoxin interaction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36; 2: 183-189, 1984.

RAMSEY, F.M., LEBOWITZ, P.W., SAVARESE, J.J. and ALI, H.H.: Clinical charasteristics of long-term succinylcholine neuromuscular blockade during balanced anesthesia. *Anesth. Analg.* 59: 110, 1980.

RASHKOVSKY, O.M., AGOSTON, S. and KET, J.M.: Interaction between pancuronium bromide and vecuronium bromide. *Br. J. Anaesth.* 57: 1063-1066, 1985.

RASMUSSEN, H.: The calcium messenger system. *N. Engl. J. Med.* 314: 1094-1101, 1986.

REILLY, C.S. and NIMMO, W.S.: New intravenous anaesthetics and neuromuscular blocking drugs. A review of their properties and clinical use. *Drugs* 34: 98-135, 1987.

REUTER, M.: Calcium channels modulations by neurotransmitter, enzymes and drugs. *Nature* 301: 569-574, 1983.

REVES, J.G., KISSIN, I., LELL, W. and TOSONE, S.: Calcium entry blockers: use and implications for anethesiologists. *Anesthesiology* 57: 504-518, 1982.

ROSENBERGER, L.B., TICKUM, K. and TRIGGLE, D.J.: The effects of $Ca^{2+}$ antagonists on mechanical responses and $Ca^{2+}$ movements in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 333-347, 1979.

ROTH, S. and EBRAHIM, Z.Y.: Resistance to pancuronium in patients receiving carbamazepine. *Anesthesiology* 66: 691-693, 1987.

ROVEI, V., GOMENI, R. and MIRCHARD,M.: Pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in man. *Acta. Cardiol.* 35: 35-45, 1980.

SALT, P.J., BARNES, P.K. and CONWAY, C.M.: Inhibition of neuronal uptake of noradernaline in the isolated perfused rat heart by pancuronium and its homologues, Org 6368, Org 7268 and NC 45. *Br. J. Anaesth.* 52: 313-317, 1980.

SALTZMAN, L.S.: Hiperkaliemia and cardiovascular collapse after verapamil and dantrolene administration in swine. *Anesth. Analg.* 63: 473-478, 1984.

SALVADOR, A., BAEYENS, J.M., DEL POZO, E. and CARLOS, R.: Potentiation by calcium antagonist of pancuronium and suxamethonium-induced neuromuscular blockade. *Rev. Pharmacol. Clin. Exp.* 2: 133, 1985.

SALVADOR, A., DEL POZO, E., CARLOS, R. and BAEYENS, J.M.: Differential effects of calcium channel blocking agents on pancuronium and suxamethonium-induced neuromuscular blockade. *Br. J. Anaesth.* 60: 495-499, 1988.

SATO, T. and ONO, H.: Facilitation of neuromuscular transmission by calcium antagonist, diltiazem, nifedipine and verapamil in dogs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 249: 235-246, 1981.

SATOH, E., ASAI, F. and ITOH, K.: Mechanism of cadmium-induced blockade of neuromuscular transmission. *Eur. J. Pharmacol.* 77: 251-257, 1982.

SAVARESE, J.J.: The autonomic margins of safety of metocurine and d-tubocurarine in the cat. *Anesthesiology* 50: 40-46, 1979.

SCAPPATICCI, K.A., HAM, J.A. and SOHN, Y.J.: Effects of furosemide on the neuromuscular junction. *Anesthesiology* 57: 381-388, 1982.

SCOTT, R.P.F. and SAVARESE, J.J.: The cardiovascular and autonomic effects of neuromuscular blocking agents. En: R. L. Katz (dir.). *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects.* pp. 117-141. Orlando, Grune and Stratton, 1985.

SEGARRA, J., CARLOS, R., RODRIGUEZ, J.M.: Pancuronium bromide: an indirect sympathomimetic agent. *Br. J. Anaesth.* 48: 1143-1148, 1976.

SHAKER, N., ELDEFRAWI, A.T., AGUAYO, L.G., WARNICK, J.E., ALBUQUERQUE, E.X. and ELDEFRAWI, M.E.: Interactions of d-tubocurarine with the nicotinic acetylcholine receptor/channel molecule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 172-177, 1982.

SIEGEL, H.N. and LUKAS, R.J.: Allosteric modification of α-bungarotoxin binding by the "calcium channel antagonist" verapamil. *Mol. Brain Res.* 1: 37-42, 1986.

SILINSKY, E.M.: An estimate of the equilibrium dissociation constant for calcium as an antagonist of evoked acetylcholine release: implications for excitation-secretion coupling. *Br. J. Pharmacol.* 61: 691-693, 1977.

SINGH, B.N.: An overview of slow channel blocking drugs: pharmacological basis for therapeutics applications. *Cardiology* 69 (suppl. 1): 2-25, 1982.

SINGH, B. N. and DRYDEN, W.F.: Sites of action of dihydropyridine drugs in the mouse hemidiafragm muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 247-255, 1988.

SINGH, B.N., ELLRODT, G. and PETER, C.T.: Verapamil: a review of its parmacological properties and therapeutics use. *Drugs* 15: 169-197, 1978.

SKIRBOLL, L.R., HOWARD, R.A. and DRETCHEN, K. L.: The effect of verapamil on the gastronecmius and soleus muscles of the cat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 60: 15-21, 1979.

SMITH, M., BENYUNES, M., BJORNSSON, T.D., SHAND, D.G. and PRITCHETT, E.L.C.: Influence of cimetidine on verapamil kinetics and dynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 36: 551-554, 1984.

SNYDER, S.H. and REYNOLDS, J.J.: Calcium antagonist drugs. Receptor interactions that clarify therapeutics effects. *N. Engl. J. Med.* 313: 995-1002, 1985.

SOKOLL, M.D. and GERGIS, S.D.: Antibiotics and neuromuscular function. *Anesthesiology* 55: 148-159, 1981.

SORKIN, E.M. and CLISSOLD, S.P.: Nicardipine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of angina pectoris, hypertension a related cardiovascular disorders. *Drugs* 33: 296-345, 1987.

SPEDDING, M.: Assessment of "$Ca^{2+}$-antagonist" effects of drugs in $K^+$-depolarized smooth muscle. Differentiation of antagonist subgroups. *Arch. Pharm.* 318: 234-240, 1982.

SPEDDING, M.: Functional interactions of calcium antagonist in $K^+$-depolarized smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 80: 485-488, 1983.

SPEDDING, M.: Changing surface charge with salicylate differentiates between subgroups of calcium-antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 83: 211-220, 1984.

SPEDDING, M.: Calcium antagonist subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 109-114, 1985.

SPEIGHT, T.M. and AVERY, G.S.: Pancuronium bromide: a review of its pharmacological properties and clinical application. *Drugs* 4: 163-226, 1972.

SPIVACH, C., OCKEN, S. and FRISHMAN, W.H.: Calcium antagonist. Clinical use in the treatment of systemic hypertension. *Drugs* 25: 154-177, 1983.

STANDAERT, F.G.: Release of transmitter at the neuromuscular junction. *Br. J. Anaesth.* 54: 131-145, 1982.

STANEC, A. and BAKER, T.: Prejunctional and postjunctional effects of tubocurarine and pancuronium in man. *Br. J. Anaesth.* 56: 607-611, 1984.

STIR, [illegible].A., SPERRY, R.J. and DIFAZIO, C.A.: Cimetidine and succinylcholine: potential interaction and effect on neuromuscular blockade in man. *Anesthesiology* 69: 607-608, 1988.

SUGAI, N., HUGHES, R. and PAYNE, J.P.: The skeletal muscle response to repeated administration of suxamethonium and its interaction with edrophonium in anesthetized man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2: 487, 1975.

SUGAWARA, Y., OHASHI, M., NAKAMURA, S., USUKI, S., SUZUKI, T., ITO, Y., KUME, T., HARIGAYA, S., NAKAO, M., GAINO, M. and INOVE, H.: Metabolism of diltiazem. I. Structure of new acidic and basic metabolites in rat, dog and man. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11: 211-223, 1988.

SUGAWARA, Y., NAKAMURA, S., USUKI, S., ITO, Y., OHASHI, M. and HARIGAYA, S.: Metabolism of diltiazem. II. Metabolic profile in rat, dog and man. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11: 224-233, 1988.

TALLARIDA, R.J. and MURRAY, R.B.: *Manual of pharmacologic calculations with computer programs.* Ed. by Tallarida R.J. and Murray R.B. 297 pags. Virginia. R.R. Donelly and Sons, 1987.

TAYLOR, P.: Neuromuscular blocking agents. En: A.G. Gilman, L. S. Godman, T.W. Rall and F. Murad (dirs.). Godman and Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics* (7ª ed.). pp. 222-235. New York, MacMillan, 1985.

THEROUX, P., TAEYMANS, Y. and EATERS, D.D,: Calcium antagonists, clinical use in the treatment of angina. *Drugs* 25: 178-195, 1983.

THOMPSON, J.M.: Pancuronium binding by serum proteins. *Anaesthesia* 31: 219, 1976.

THUILLEZ, C., GUERET, M., DUHAZE, P., LHOSTE, F. and KIECHEL, J.R.: Nicardipine: pharmacokinetics and effects on carotid and brachial blood flows in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 18: 837-847, 1984.

TOMLISON, D.R.: On the mechanism of pancuronium-induced supersensitivity to noradrenaline in rat smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 65: 473-478, 1979.

TRIGGLE, D.J.: Biochemical pharmacology of calcium blockers. Mechanism of action and clinical applications. En *Calcium blockers.* Ed. by S.F. Flaim and R. Zelis, pp. 121-133. Urban and Schwarzenbery, Baltimore, Munich, 1982.

TRIGGLE, D.J. and SWAMY, Ph. D.: Pharmacology of agents that affect calcium. Agonism and antagonism. *Chest* 78: 171-179, 1980.

TRIGGLE, D.J. and SWAMY, V.C.: Calcium antagonist. Some chemical pharmacologic aspects. *Cir. Res.* 52 (supp. I): 17-27, 1983.

TSAI. S.K. and LEE, C.: Ketamine potentiates nondepolarizing neuromuscular relaxants in a primate. *Anesth. Analg.* 68: 5-8, 1989.

ULMSTEN, V., ANDERSON, K.E. and WINGERUP, L.: Treatment of premature labor with calcium antagonist nifedipine. *Arch. Gynecol.* 229: 1-5, 1980.

VAN DER SPEK, A.F.L., ZUPAN, J.T., POLLARD, B.J. and SCHORK, M.A.: Interactions of vecuronium and atracurium in an in vitro nerve-muscle preparation. *Anesth. Analg.* 67: 240-246, 1988.

VANHOUTTE, P. and PAOLETTI, R.: The WHO classification of calcium antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 4-5, 1987.

VAN POORTEN, J.F., DHASMANA, K.M., KUYPERS, R.S.M. and ERDMANN, W.: Verapamil and reversal of vecuronium neuromuscular blockade. *Anesth. Analg.* 63: 155-157, 1984.

VERCRUYSSE, P., BOSSUYT, P., HANEGREEFS, G., VERBEUREN, T.J. and VANHOUTE, P.M.: Gallamine and pancuronium inhibit pre and postjunctional muscarinic receptors in canine saphenous veins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209: 225-230, 1979.

VIBY-MOGENSEN, J.: Interaction of others drugs with muscle relaxants. En R.L. Katz (dir.) *Muscle relaxants. Basic and clinical aspects.* pp. 233-256. Orlando. Grune and Stratton, 1985.

VITAL BRAZIL, O. and PRADO-FRACESCHI, J.: The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamicin. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 179: 78-85, 1969.

VIZI, E.S., SOMOGY, G.T. and NAGASHIMA, H. : Tubocurarine and pancuronium inhibit evoked release of acetylcholine from the mouse hemidiafragm preparation. *Br. J. Anaesth.* 59: 226-231, 1987.

VOLLE, R.L. and HENDERSON, E.G.: Pre and postjunctional neuromuscular blockade by carbachol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 291: 359-370, 1975.

WACHTEL, R.E.: Effects of diltiazem and verapamil on responses to acetylcholine. *Br. J. Pharmacol.* 92: 561-566, 1987.

WALI, F.A.: Verapamil intensifies neuromuscular blockade produced by gallamine and pancuronium at the chick neuromuscular junction. *Pharmacol. Res. Commun.* 18: 529-541, 1986.

WALI. F.A.: Interaction of verapamil with d-tubocurarine and cholinergic agonists at the avian neuromuscular junction. *Acta Anesthesiol. Scand.* 31: 15-20, 1987.

WALI, F.A. and SUER, A.H.: Effect of verapamil on $Ca^{2+}$ influx to rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Br. J. Anaesth.* 59: 1571-1578, 1987.

WALSH, K.B., BRYANT, S.H. and SCHWARTZ, A.: Effects of calcium currents in mammalian skeletal muscle fiber. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 403-407, 1986.

WALSH, K.B., BRYANT, S.M. and SCHWARTZ, A.: Action of diltiazem on excitation-contraction coupling in bullfrog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 531-536, 1988.

WAUD, B.E. and WAUD, D.R.: Interaction of calcium and potasium with neuromuscular blocking agents. *Br. J. Anaesth.* 52: 863-866, 1980.

WAUD, B.E., WAUD, D.R. and PHIL, D.: Quantitative examination of the interaction of competitive neuromuscular blocking agents on the indirectly elicited twitch. *Anesthesiology* 61: 420-427, 1984.

WEBER, S., BRANDOM, B.W., POWERS, D.M., SARNER, J.B., WOELFEL, S.K. and COOK, D.R. : Mivacurium chloride (BW B1090U)-induced neuromuscular blockade during nitrous oxide-isofluorane and nitrous oxide-narcotic anaesthesia in adult surgical patients. *Anesth. Analg.* 67: 495-499, 1988.

WESSLER, I.: Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 110-114, 1989.

WILLIAMS, N.E., WEBB, S.N. and CALVEY, T.N.: Differential effects of myoneural blocking drugs on neuromuscular transmission. *Br. J. Anaesth.* 52: 1111-1115, 1980.

WINCARD, L.B. and COOK, D.R.: Clinical pharmacokinetics of muscle relaxants. *Clin. Pharmacokinet.* 2 : 330-343, 1977.

WOELFEL, S.K., BRANDOM, B.W., COOK, D.R., WHITEHEAD, B. and BORLAND, L.M.: Relationships between the time to begining of recovery after the initiated bolus of muscle relaxants and the infusion rate requirements for mivacurium and succinylcholine. *Anesthesiology* 69 (suppl. 3A): A 521, 1988.

ZELIS, R.: Clinical pharmacology of the calcium blockers. En *Calcium blockers. Mechanism of action and clinical applications.* Ed. by S.F. Flaim and R. Zelis, pp. 193-200. Urban and Schwarzenbery, Baltimore, Munich, 1982.

ZSOTER, T. and CHURCH, J.: Calcium antagonist. Pharmacodinamyc effects and mechanism of action. *Drugs* 25: 93-112, 1983.

ZUKAITIS, M.G., HOECH, G.P., WILLIAMS, C.H. and SIMPSON, S.: Verapamil attenuation of the malignant hyperthermia syndrome in susceptible pig. En *Environment, drugs and thermoregulations.* Ed. by P. Lomax and E. Schönbaum, pp. 167-168. Karger, Basel, 1983.