

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS
CALCIOANTAGONISTAS Y ANTIHISTAMINICOS H2 EN LA
RATA.**

TESIS DOCTORAL

María Jesús de la Iglesia Diez

Madrid, 1993

María Jesús de la Iglesia Díez

**ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS
CALCIOANTAGONISTAS Y ANTI-
HISTAMINICOS H2 EN LA RATA**

Director: Prof. José Manzanero Yllana

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

JOSE MANZANERO YLLANA, PROFESOR ASOCIADO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

TIENE A BIEN INFORMAR:

Que el Proyecto de trabajo presentado por la Doctorando Dña. M^a JESUS DE LA IGLESIA DIEZ, titulado: "Acciones neuromusculares de los fármacos calcio-antagonistas y antihistamínicos H₂ en la rata", reúne las condiciones académicas y científicas necesarias para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 6 de Mayo de 1993

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: J. Manzanero Yllana

(fecha y firma)
D.N.I. 3.056.384

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

EL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

INFORMA:

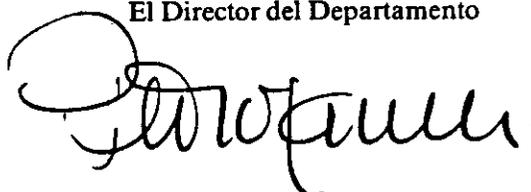
Favorablemente la presentación, exposición y defensa del Proyecto de trabajo presentado por Dña. M^a JESUS DE LA IGLESIA DIEZ y dirigida por D. Jose Manzanero Yllana, dado que reúne las condiciones académicas y científicas requeridas para ser considerado como Tesis Doctoral.

Madrid, 6 de Mayo de 1993

Fecha reunión
Consejo Departamento

6-5-1993

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. P. Lorenzo

(fecha y firma)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Unv. Complutense de Madrid. A su Director, el Prof. P. Lorenzo Fernández deseo manifestar mi gratitud por brindarme su ayuda y los medios técnicos para su realización.

Al Dr. J. Manzanero Yllana, por su decidido apoyo, orientación y dirección de la presente tesis.

A los Drs. Tamargo, Anadón, Barrigón y Leza por la ayuda recibida en algunas facetas del presente trabajo.

A M^a Elena por su colaboración en la redacción de algunos capítulos.

A otros miembros del Departamento por los ánimos recibidos en su realización.

A Eva M^a, Raquel y Sofía con cariño.

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. MUSCULO ESTRIADO Y TRANSMISION NEUROMUSCULAR.-..	4
I.1.a. Acoplamiento excitación-contracción.....	5
I.1.b. Relajación.-.....	9
I.1.c. Neurotransmisión en placa motora.-.....	11
I.1.d. Liberación espontánea de acetilcolina.-..	14
I.1.e. Liberación de acetilcolina por impulsos nerviosos.-	15
I.1.f. Localización y bioquímica del receptor nicotínico muscular.-.....	16
I.1.g. Los receptores de acetilcolina.-.....	18
I.2. CLASIFICACION DE LOS FARMACOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LA HISTAMINA.-.....	21
I.3. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS ANTI-HISTAMINICOS H ₂ .-.....	22
I.4. EFECTOS COLINERGICOS DE LOS ANTI- HISTAMINICOS H ₂ .-.....	27
I.5. ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LA HISTAMINA. ACCIONES NEUROMUSCULARES.-.....	31
I.6. ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS ANTI- HISTAMINICOS H ₂ .-.....	35

I.7.	ACCIONES EN PLACA MOTORA DE LOS BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES COMPETITIVOS.-.....	36
I.8.	ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS FÁRMACOS ANTICOLINESTERÁSICOS.-.....	38
I.9.	EFFECTOS NEUROMUSCULARES DE LOS CAMBIOS IÓNICOS EN PLACA MOTORA.-.....	40
I.10.	ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS INHIBIDORES DEL ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA.-.....	42
I.11.	ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS FÁRMACOS CALCIO-ANTAGONISTAS.-.....	43
I.12.	PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.-.....	49
II.	MATERIAL Y METODOS.-.....	52
A)	MATERIALES.-.....	53
1.	Animales.-.....	53
2.	Aparatos.-.....	53
a)	Copa y circuito.-.....	53
b)	Electrodo y sistema de estimulación.-.....	53
c)	Sistema de registro.-.....	55
3.	Líquido nutricio.-.....	55
4.	Oxigenación.-.....	55
B)	METODO EXPERIMENTAL.-.....	56
C)	FARMACOS EMPLEADOS.-.....	58
D)	ANALISIS ESTADISTICO.-.....	58

III. RESULTADOS.....	59
1. EFECTO DE LOS CAMBIOS IÓNICOS SOBRE LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA EN LA PREPARACIÓN FRENICO-DIAFRAGMA DE RATA .-.....	60
1.1) Acción contráctil de ranitidina en solución Tyrode normal.-.....	60
1.2) Efecto del K ⁺ en la acción contractil de ranitidina sola.-.....	61
1.3) Efecto del Ca ⁺⁺ en las respuestas con- tráctiles de ranitidina.-.....	63
1.4) Acción contráctil de ranitidina con variaciones de Mg ⁺⁺ en el líquido nutricio.-.....	64
2) EFECTO DE LOS CALCIOANTAGONISTAS EN LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA EN HEMIDIAFRAGMAS DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADOS.-.....	66
2.1) Efecto de diltiazem sobre la acción contráctil de ranitidina en líquido nutricio Tyrode normal.-.....	66
2.2) Efecto de verapamil sobre la acción contractil de ranitidina en solución Tyrode normal.-.....	70
3. EFECTO DE CAPTOPRIL SOBRE LA ACCIÓN CONTRACTIL DE RANITIDINA EN EL MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADO.-.....	75
3.1) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) en la preparación frénico-diafragma de rata con	

solución Tyrode normal.-.....	75
3.2) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) después de captopril 1 μ M.-.....	77
3.3) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) después de captopril 10 μ M.-.....	79
3.4) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) después de captopril 100 μ M.-.....	81
3.5) Efecto de captopril 10 μ M en la acción contráctil de ranitidina en medio nutricio Tyrode con 5.4 mM de K ⁺ .-.....	83
3.6) Efecto de la disminución de Ca ⁺⁺ en el líquido nutricio sobre la acción contráctil de ranitidina después de captopril 10 μ M.-.....	85
 4. INTERACCIÓN DE CAPTOPRIL CON EL ANTICOLINESTE- RÁSICO NEOSTIGMINA EN HEMIDIAFRAGMAS DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADOS.-	88
4.1) Curva dosis-respuesta de neostigmina (0.1 μ M - 10 μ M) en solución Tyrode normal.-.....	88
4.2) Efectos de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 110 μ M) después de captopril 10 μ M en solución Tyrode normal.-.....	90
4.3) Efectos de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 110 μ M) después de captopril 100 μ M en solución Tyrode normal.-.....	91
4.4) Efectos de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 110 μ M) después de captopril 10 μ M en solución Tyrode hipocálcico [Ca ⁺⁺]o 0.90 mM.-.....	93

4.5)	Efectos de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 110 μ M) después de captopril 10 μ M en solución Tyrode hiperpotásico [K ⁺] _o 5.4 mM.-.....	94
5.	ACCIÓN CONTRACTIL COMPARATIVA DE RANITIDINA Y NEOSTIGMINA EN HEMIDIAFRAGMA DE RATA AISLADO.- ..	97
5.1)	Acción de ranitidina y neostigmina en hemidiafragmas de rata en solución Tyrode normal directa e indirectamente estimulados.-.....	97
A)	Curvas dosis-respuesta de neostigmina (0.1 μ M - 10 μ M).-.....	97
B)	Acción de ranitidina después de neostigmina.-...	98
C)	Acción de neostigmina después de ranitidina.-...	99
D)	Acción contráctil comparativa de ranitidina y neostigmina.-.....	100
5.2)	Acción contráctil de ranitidina y neostigmina en hemidiafragmas de rata aislados en solución Tyrode hiperpotásico (8.1 mM).-.....	102
A)	Acción de ranitidina después de neostigmina.-..	102
B)	Acción de neostigmina después de ranitidina.-..	103
6.	ACCIÓN ANTICURARE COMPARATIVA DE RANITIDINA Y NEOSTIGMINA FRENTE A ATRACURIO.-	106
6.A)	Hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en solución Tyrode normal.-.....	106
6.A.1)	Acción de atracurio solo.-.....	106
6.A.2)	Acción anticurare de ranitidina después de neostigmina.-.....	108

6.A.3) Acción anticurare de neostigmina después de ranitidina.-.....	109
6.B) Hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en solución Tyrode hiperpotásico (K+ 8.1 mM).-.....	110
6.B.1) Acción de atracurio solo.-.....	110
6.B.2) Acción anticurare de ranitidina después de neostigmina.-.....	110
6.B.3) Acción anticurare de neostigmina después de ranitidina.-.....	112
 IV. DISCUSION.....	 114
 V. CONCLUSIONES.....	 139
 VI. BIBLIOGRAFIA.....	 146

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

El uso creciente de los antihistamínicos H_2 , aproximadamente en 1984, unos 30 millones con cimetidina y unos 2 millones con ranitidina, hace que poco a poco se vayan conociendo más efectos farmacológicos y más efectos adversos o secundarios. Los segundos son descritos cada día más frecuentemente en revistas de prestigio y ello es debido por una parte a que son moléculas de reciente descubrimiento y por otra parte que tienen un gran uso terapéutico. Por los grandes beneficios que generan las dos principales compañías ha originado fuertes tensiones comerciales con el uso antiulceroso de cimetidina versus ranitidina como señala Mc Carthy (1983): "Hasta ahora, esta batalla ha generado más agitación en Wall Street y entre las compañías en competencia que en las consultas médicas" y si bien ello es cierto relativamente, ya que hay un creciente interés de la clase médica en tomar partido por una u otra, debido al número creciente de publicaciones de efectos adversos de la otra, con lo que contribuye incluso a una más prudente utilización terapéutica y a unas preferencias cambiantes por el advenimiento de nuevos antihistamínicos H_2 .

Aunque la histamina es un poderoso agente secretor de ácido clorhídrico y pepsina por el estómago, en sinergia, con acetilcolina y gastrina, los agentes antisecretores del tipo de los antihistamínicos H_2 no parecen actuar tan selectivamente sobre los receptores H_2 gástricos, como lo demuestran los diversos efectos farmacológicos, poco conocidos, por ser menos

usuales como los endocrinos y metabólicos, incluso el simplista concepto de antagonistas H_2 , a nivel gástrico puede no ser directo, sino hipotéticamente afectando al movimiento del calcio intracelular y secundariamente la exocitosis o ambos mecanismos. En este trabajo hemos visto la influencia de estos agentes en un tejido no secretor, como es la preparación frénico-diafragma de rata con unos efectos específicos, también a rango de dosis muy específico y estrecho, aunque mayor que el preciso para el antagonismo de los receptores H_2 y siendo este efecto potencialmente beneficioso, como es la mejoría de la contracción muscular, al igual que a nivel cardíaco favorecen "in vitro" la inotropía, salvo algunos agentes nuevos. Cuando utilizamos ranitidina como agente anticurare in vitro, previamente el grado de curarización que realizamos con atracurio en esta tesis es alrededor de un 20 a 50 por ciento de valor basal según el preparado y el tipo de estímulo, con lo que a diferencia de otros autores que utilizan dosis supramáximas, nos permite ver, una vez alcanzada una disminución contráctil estable, el efecto subsiguiente del antihistamínico H_2 . A nuestro juicio, ensayar dosis de curare muy altas presenta el inconveniente de que producen una depresión supramáxima de la contracción diafragmática, la cual es muy persistente, pudiendo durar horas, incluso tras lavados sucesivos de la preparación. El ensayo ulterior de un fármaco para ver si revierte o potencia esta disminución de la contractilidad es difícil, porque si la potencia reversal es pequeña no es posible apreciarlo y si aumenta más la depresión no se puede apreciar, una vez anulada previamente ésta.

El interés de algunos antihistamínicos H_2 , estriba en que presentan algunas acciones farmacológicas nuevas, aunque esperables y sorprendentes como la que estudiamos en este trabajo. Ya era conocido el efecto contráctil de los antihistamínicos H_2 en miocardio de rata y cobayo, existiendo una bibliografía abundante y revisiones (Manzanero, 1979), estudiándose incluso en miocardio humano in vitro, donde cimetidina y ranitidina presentan efectos inotrópicos positivos (Coruzzi and col., 1983), al igual que mifentidina (Polí and col., 1985). En músculo liso son también innumerables las publicaciones de efectos descritos con los antihistamínicos H_2 . En músculo estriado hay diferencias de especie y se describen acciones de incremento y depresión contráctil. En la preparación frénico-diafragma de rata ranitidina tenía una acción contráctil óptima -cimetidina solo tenía ligeros efectos contráctiles-, mientras que en el cobayo no hay tal efecto, por lo que esta especie la hemos excluido. También ha sido estudiada la acción contráctil de ranitidina en esta preparación sobre dosis equimolares previas de histamina, para demostrar que el efecto contráctil no se debe a interacción sobre receptores H (Iglesia, 1982), así como después de la depresión contráctil neuromuscular de causa miogénica, por inhibición del calcio sarcoplasmático disponible para la contracción, causada por dantroleno. Es decir, el antihistamínico H_2 ranitidina antagonizaba los efectos de dantroleno por interacción con el calcio disponible para la contracción.

I.1. MUSCULO ESTRIADO Y TRANSMISION NEUROMUSCULAR.-

A continuación se resumen algunos aspectos de la farmacología y fisiología de la placa motora, para una mejor comprensión de esta tesis.

Dentro del citoplasma de las fibras musculares, llamado sarcolema están los miofilamentos dispuestos en cilindros de diámetro aproximado de 1 μm y cada grupo constituye una miofibrilla, que es el componente contráctil. En el sarcoplasma hay miles de núcleos, mitocondrias y otras organelas subcelulares. El retículo endoplásmico liso, se llama retículo sarcoplásmico y esta constituido por una amplia red compleja de túbulos, vesículas y sacos, ocupando un espacio intermiofibrilar. En estos túbulos se almacenan iones de calcio. Hay otros túbulos además de estos longitudinales, que tienen una disposición transversal, los túbulos T, que son invaginaciones de la membrana plasmática en estrecha oposición con las vesículas y sacos del retículo sarcoplásmico. Cada túbulo en T con las porciones vecinas del retículo sarcoplásmico forman la característica diada o triada en los mamíferos. Los miofilamentos gruesos contienen la proteína contráctil miosina, mientras que los delgados contienen actina, troponina y tropomiosina interrelacionados. La contracción muscular se produce cuando los filamentos de actina se deslizan entre si y acortan los sarcómeeros. La molécula de miosina tiene ATP-asa en su extremo y contiene una porción delgada llamada meromiosina ligera y otra porción más gruesa llamada meromiosina pesada. La movilidad de cabeza con cuello de la meromiosina pesada permite el enlace reversible con la actina

para formar la actomiosina. Los iones Ca^{++} por mediación de la troponina hacen permeables para las cabezas de miosina los puntos de unión con la actina.

I.1.a. ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.-

El desarrollo de la microscopía electrónica los estudios in vitro de las proteínas contráctiles, etc., han conseguido grandes avances, por lo que se resumen a continuación. La membrana plasmática de una fibra muscular estriada está polarizada, teniendo el interior negativo, de 50 a 90 mV en relación al exterior. En la mayor parte de las fibras musculares de los mamíferos el valor es de aproximadamente de -90 mV. El potencial de membrana en reposo es esencialmente el potencial de equilibrio del potasio. El estado contráctil de la fibra muscular guarda relación con el potencial a través de la membrana. Si la diferencia de potencial disminuye hasta un nivel crítico, es decir se despolariza, se produce una contracción de fibras musculares. La cadena de acontecimientos que acoplan la despolarización de la membrana plasmática muscular con la activación de las proteínas contráctiles se denomina acoplamiento excitación-contracción o acoplamiento electromecánico.

Un método experimental para despolarizar la membrana plasmática de células excitables se consigue mediante el incremento extracelular de K^+ . En la mayor parte de las fibras musculares de los mamíferos el primer potencial a través de la membrana disminuye desde su valor en reposo, de aproximadamente 90 mV a un valor de aproximadamente 50 mV, es decir se

despolariza de -90 mV a -50 mV. El valor de -50 mV se denomina umbral de activación mecánica. Al aumentar la intensidad de la despolarización se producen aumentos graduales de la contracción, hasta que el potencial de membrana se acerca a -20 mV. La despolarización más allá de este valor no produce ningún aumento de la contracción, por lo que se dice que con este valor se ha alcanzado la saturación mecánica. La relación entre despolarización de -50 mV -20 mV y contracción se expresa por una curva sigmoidea. Se han obtenido resultados similares con la técnica del pinzamiento o fijación del voltaje si se usa para despolarizar la membrana hasta valores controlados durante determinado tiempo. El empleo de esta técnica demuestra que durante períodos muy breves de despolarización los valores de umbral y de saturación de potencial de membranas varían según la duración de la despolarización, que cuando más breve es la duración de la despolarización, por debajo de un período crítico mayor es la despolarización. En la mayor parte de los tipos de fibras musculares estriadas, incluyendo casi todas las fibras de los músculos de mamífero, el mecanismo fisiológico que inicia la contracción es la despolarización producida por potenciales de acción que se propagan en la membrana. Asimismo, la mayor parte de las membranas de fibras musculares estriadas conducen potenciales de acción a una velocidad de aproximadamente 5 m/seg. El potencial de membrana varía entre -90 mV en reposo hasta +30 mV o +40 mV en el máximo de la espiga. El mecanismo en el cual se basa la generación y propagación del potencial de acción en las fibras musculares estriadas es esencialmente igual que el de las fibras nerviosas amielínicas. Como la saturación mecánica

tiene lugar con un potencial de membrana de aproximadamente -20 mV, la despolarización más allá de este valor, incluyendo el exceso del potencial de espiga, no produce mayor aumento de la contracción y esta parte del potencial de acción, es decir 50 mV, de -20 mV a +30 mV o 40 mV constituye un factor de seguridad. Este factor se confirma por experimentos en los cuales se disminuye el contenido de Na⁺ de la solución en la cual se bañan los músculos aislados. El contenido de Na⁺ tiene que reducirse hasta el momento en que la amplitud del potencial de acción cae en 50 mV aproximadamente antes de que disminuya la intensidad de la contracción asociada.

De lo dicho se deduce que la contracción muscular por si misma no es un fenómeno del "todo o nada", pues se producen contracciones graduales por despolarizaciones también graduales dentro de los límites de potenciales de membrana, desde aproximadamente -50 mV a -20 mV. Sin embargo, la contracción muscular parece obedecer a la ley del todo o nada, porque en circunstancias normales esta desencadenada por potenciales de acción que se propagan y la conducción nerviosa obedece a esta ley. Los potenciales de acción que se propagan pueden producirse en una membrana de célula muscular, aplicando los electrodos estimulantes directamente al músculo o bien estimulando indirectamente su nervio motor. El mecanismo en virtud del cual un potencial de acción que se desplaza en un nervio motor desencadena un potencial de acción en la membrana celular del músculo correspondiente, incluye la acetilcolina como neurotransmisor químico, es similar a la transmisión en cualquier otra parte.

Aunque la transmisión esta desencadenada por el potencial de acción del músculo dura mucho más que el cambio eléctrico. Ocurre así porque los acontecimientos iniciados por la despolarización se producen en forma relativamente lenta, y siguen después que el proceso de recuperación de la membrana ha terminado el cambio eléctrico. El cambio eléctrico en la membrana plasmática de la célula muscular es conducido al interior de la célula siguiendo las membranas de los túbulos T, que penetra en ella en la región de las membranas Z en el límite A-I. En alguna forma el cambio eléctrico de la membrana de los túbulos T provoca la liberación de una pequeña cantidad del llamado "Ca++ desencadenante" de las triadas de unión. Esto a su vez provoca la liberación de una cantidad mayor de "Ca++ activador" desde los sacos laterales y las vesículas del retículo sarcoplásmico, donde está almacenado, hacia el sarcoplasma en la unión de los miofilamentos.

En reposo, la cantidad de Ca++ libre en el sarcoplasma es baja y el complejo troponina-tropomiosina, junto con Mg++ ATP intacto, impide la formación de puentes cruzados entre filamentos gruesos y delgados de manera que persiste la relajación. Cuando se ha liberado Ca++ por el retículo sarcoplásmico y se ha unido al complejo troponina- tropomiosina-actina, desaparece la represión que existe para la contracción; la ATPasa de miosina es activada, ATP es hidrolizado y tiene lugar la interdigitación de filamentos, con la formación consiguiente de puentes cruzados (Bowman and Rand, 1984).

I.1.b. RELAJACION.-

El restablecimiento del estado de relajación requiere que Ca^{++} desaparezca del complejo troponina-tropomiosina que entonces puede volver a ejercer su acción inhibidora. La superficie exterior de los sacos laterales del retículo sarcoplásmico está jalonada con intervalos de unos 10 nm, de pequeños elementos a modo de nudos de 2-4 nm de diámetro. Se cree que intervienen en el transporte activo de Ca^{++} a través de la membrana del retículo sarcoplásmico hacia sus lugares de almacenamiento internos. En esta forma Ca^{++} a través de la membrana del retículo sarcoplásmico los atrapa en forma activa. Cuando los sacos laterales y las vesículas del retículo sarcoplásmico están plenamente saturados, el 80 % aproximadamente, del Ca^{++} está fijado electrostáticamente a lugares en la superficie interna de la membrana que contienen grupos de imidazol, fosfatidilserina y lecitina. El resto del Ca^{++} queda libre en solución dentro de los sacos. El transporte activo de Ca^{++} penetrando en el retículo sarcoplásmico depende de la hidrólisis de ATP por una ATPasa asociada con su membrana. El retículo sarcoplásmico también contiene la enzima adenilciclase, que cataliza la conversión de ATP en AMP cíclico. No sabemos hasta que punto esta enzima intervenga en la captación de Ca^{++} , aunque se ha señalado que esta captación por retículo sarcoplásmico aislado es estimulada por AMP cíclico.

Las mitocondrias del músculo también tienen gran capacidad de almacenar Ca^{++} , aunque su afinidad por él es menor que la del retículo sarcoplásmico, y se acumulan más lentamente. De todas maneras, también intervienen las mitocondrias controlando la

concentración intracelular de Ca^{++} libre; su importancia relativa en diversos tipos de músculos depende del número existente.

Si la membrana de una fibra muscular estriada se conserva a nivel despolarizado (esto es, con exceso de K^+ o por fijación de voltaje), la contracción resultante disminuye en forma gradual debido a un proceso de "acomodación", mal conocido del mecanismo contráctil, que incluye secuestro de Ca^{++} por el retículo sarcoplásmico, a pesar de persistir la despolarización. Por otra parte, si el potencial de membrana se restablece rápidamente hasta valor normal, como ocurre cuando la contracción es iniciada por un solo potencial de acción, entonces el mecanismo de relajación rápidamente sigue al proceso contráctil. La relajación se evita por una serie de potenciales de acción en rápida sucesión. Esto se denomina tétanos.

Además de su papel en la captación activa de Ca^{++} por el retículo sarcoplásmico, ATP desempeña otros papeles en el proceso de relajación. Es necesario alterar la capacidad de fijación de los sacos laterales en favor de Ca^{++} sobre otros iones. Posiblemente de ATP produce esta alteración provocando un cambio de conformación en los lugares de fijación. No sabemos si esta acción particular de ATP depende de su hidrólisis. Incluso cuando todo el Ca^{++} activador ha sido eliminado de los miofilamentos; no se produce relajación a menos que estén presentes Mg^{++} y ATP intacto; estas sustancias ejercen una acción directa sobre los miofilamentos que, además de la pérdida de Ca^{++} por el complejo troponina-tropomiosina, es necesaria para lograr que se produzca la relajación. Esta, por lo tanto, también incluye la resíntesis de ATP.

I.1.c. NEUROTRANSMISION EN PLACA MOTORA.-

La breve latencia y la rápida contracción de un músculo estriado, en respuesta a un solo impulso nervioso, hizo que muchos investigadores dudaran de que existiera un mecanismo humoral a nivel de la unión neuromuscular. Sin embargo, Dale, Feldberg y Vogt, en 1936, demostraron la liberación de acetilcolina al estimular un nervio motor somático. Perfundieron los vasos sanguíneos de la lengua de un gato; cuando estimulaban el nervio hipogloso, produciendo contracción del músculo estriado de la lengua, se identificó acetilcolina en el líquido de perfusión que salía de ellas. En otros experimentos se perfundió el músculo gastrocnemio de la pata del perro o del gato y se estimularon las raíces motoras del nervio ciático dentro de la columna cervical para evitar estimular más fibras nerviosas que las de motoneuronas. La sustancia que aparecía en el líquido de perfusión tenía cualitativa y cuantitativamente la misma acción que una solución estandar de acetilcolina ensayada con el músculo dorsal de la sanguijuela y con la presión arterial del gato. La presencia de la sustancia sólo se descubrió cuando se añadió fisostigmina al líquido de perfusión, para inhibir la colinesterasa. Dale y colaboradores luego comprobaron que la liberación de acetilcolina no dependía de la contracción del músculo. En primer lugar el curare suprimía la contracción, pero seguía presentándose acetilcolina en el líquido de perfusión después de estimular el nervio. En segundo lugar, la estimulación eléctrica directa del músculo denervado crónicamente desencadenaba contracciones, pero no se descubría acetilcolina

en el líquido de perfusión. En el desarrollo de esta tesis se han realizado experimentos estimulando el nervio frénico -estímulo indirecto- o el músculo diafragma -la contracción que se producía era sin liberación de Ach-.

Otros experimentos demostraron que la acetilcolina era liberada cuando se estimulaban los nervios motores y trabajos posteriores demostraron que remedaba el efecto de la estimulación nerviosa provocando la contracción. Cuando se inyecta directamente una pequeña cantidad de acetilcolina en arterias que riegan músculo esquelético se produce una contracción rápida y breve, similar a la causada por la estimulación nerviosa. Además, las contracciones producidas por la acetilcolina y las producidas por estimulaciones nerviosas son afectadas por diversas fármacos en forma similar. Así, el curare bloquea y la fisostigmina potencia la respuesta de las dos. Grandes dosis de acetilcolina después de la fisostigmina pueden deprimir las sacudidas desencadenadas por la estimulación nerviosa.

La acetilcolina, inyectada por vía intravenosa produce acciones intensas sobre estructuras inervadas por nervios autónomos, pero poca acción sobre músculos estriados, incluso después de inhibida la colinesterasa. De manera similar, la acetilcolina añadida al líquido del baño que contiene un tejido aislado con inervación autónoma, como un segmento de intestino, produce rápidamente una respuesta del músculo liso que contiene; sin embargo no ocurre así en el caso de músculos estriados aislados, constituidos principal o totalmente por fibras de inervación focal. Tales músculos pueden conservarse en estado funcional aislados del cuerpo y suspendidos en solución salina

fisiológica, siempre que sean suficientemente delgados para poderse oxigenar adecuadamente. Ejemplos empleados frecuentemente en experimentos farmacológicos incluyen diafragma de rata, músculo sartorio de rana y músculo dorsal ancho posterior del pollo. Estos músculos responden con sacudidas o con tétanos a la estimulación nerviosa adecuada. Sin embargo, no se pueden contraer añadiendo acetilcolina al líquido nutritivo.

El fracaso de la acetilcolina para producir una contracción del músculo estriado cuando se da por vía intravenosa, o cuando se añade al líquido del baño donde hay un músculo aislado, depende sobre todo de la rapidez con que es hidrolizada y la extraordinaria brevedad de las contracciones, aunque se pueden sumar para producir una respuesta visible cuando hay pequeñas cantidades de acetilcolina en el torrente vascular. Para que tenga lugar la sumación en un músculo estriado tienen que responder sincrónicamente un número elevado de fibras musculares. Esto sólo se produce cuando la contracción local de acetilcolina en placa motora es elevada. Por ejemplo, después de una rápida inyección arterial próxima que riega el músculo.

Es sabido que la transmisión de la excitación desde las terminaciones nerviosas motoras a las fibras estriadas de los músculos, no sólo de mamíferos sino también de pájaros y anfibios es por la acetilcolina que es sintetizada dentro de las terminaciones nerviosas motoras y almacenada en las vesículas sinápticas. Cuando es liberada de las terminaciones nerviosas por la llegada de impulsos nerviosos, la acetilcolina se difunde atravesando el estrecho espacio de unión y despolariza la membrana postunión, produciendo un potencial de placa terminal

(e.p.p.) o sea una respuesta similar a la del potencial postsináptico excitador (EPSP). Esta acción de la acetilcolina es remedada por la nicotina y por lo tanto, según la clasificación de Dale se describe como acción nicotínica de la acetilcolina (Bowman and Rand, 1984)

I.1.d. LIBERACION ESPONTANEA DE ACETILCOLINA.-

En ausencia de impulsos nerviosos la acetilcolina es liberada espontáneamente y al azar en cuantos de volumen aproximadamente uniformes; cada cuanto probablemente sería la cantidad contenida en una sola vesícula sináptica. El número máximo de moléculas de acetilcolina que pueden almacenarse en una vesícula de 40 nm de diámetro es de 45000, y las valoraciones más probables del número real en una vesícula están entre 12000 y 21000. La liberación espontánea origina pequeñas despolarizaciones de la membrana postunión conocidas como potenciales miniatura de placa terminal (m.e.p.ps), que se producen con frecuencias medias de 1-4 Hz en diferentes músculos. Son demasiado pequeñas para desencadenar el mecanismo contractil en un músculo. En fibras musculares de inervación focal los mepps tienen volumen aproximadamente uniforme cuando se registran con un microelectrodo en la placa terminal. En fibras de inervación múltiple aparecen en amplitud más variable y en cronología diferente, porque la gran densidad de placas terminales significa que se registran no sólo de las placas terminales más cercanas al electrodo de registros sino también de otras ligeramente más alejadas, cuyas respuestas han sido atenuadas por la distancia.

I.1.e. LIBERACION DE ACETILCOLINA POR IMPULSOS NERVIOSOS.-

Cuando un impulso nervioso alcanza la terminación nerviosa provoca un aumento breve, pero enorme, de la descarga de vesículas, de manera que se libera simultáneamente el contenido de varios centenares. Se ha calculado que un impulso nervioso a nivel de una sola unión libera más de 4 millones de moléculas de acetilcolina; o sea el contenido de 200 a 350 vesículas. Experimentos en los que se han despolarizado terminaciones nerviosas hasta grados fijos de impulsos despolarizantes de corriente, demuestran que la relación entre la magnitud de la despolarización nerviosa terminal y la intensidad de liberación de transmisor se expresa por una curva muy empinada en forma de S. De manera similar, la intensidad de liberación depende mucho de la duración de la despolarización terminal. El potencial de acción en la terminal nerviosa tiene un efecto muy neto sobre la liberación de transmisor.

La despolarización de membrana por el potencial de acción solo es la primera de una serie de reacciones que terminan en la liberación de acetilcolina. El intervalo entre el comienzo de la despolarización de la membrana terminal del nervio y el comienzo de la respuesta postunión a nivel de uniones neuromusculares de la rana a 2.5° C es prolongado, hasta de 3.5-7.0 mseg., y solo 0.15 mseg., de este retraso puede atribuirse al tiempo necesario para que la acetilcolina difunda a través del espacio de unión e interactue con los receptores postunión. Así pues, la mayor parte de retraso depende de los acontecimientos del acoplamiento

de excitación-liberación. El mejor conocido de estos acontecimientos es la entrada de Ca^{++} extracelular en el axoplasma terminal, que es acelerado por la despolarización de la membrana terminal. La cantidad de acetilcolina liberada por un impulso nervioso es función de la concentración de Ca^{++} libre, y parte de la liberación de Ca^{++} en la liberación de acetilcolina es por tanto vital. Los compuestos que desacoplan la fosforilización oxidativa hacen que las mitocondrias que hay dentro de las terminaciones nerviosas liberen Ca^{++} hacia el interior del axoplasma. Se ha comprobado que tales compuestos aumentan la liberación espontánea de acetilcolina a nivel de las uniones neuromusculares in vitro en ausencia de Ca^{++} externo.

Los iones de magnesio tienen una acción opuesta sobre los iones de calcio en cuanto a liberación de transmisor. Una concentración elevada (Mg^{++}) inhibe la liberación de acetilcolina y se opone a la acción de Ca^{++} . Por lo tanto, la liberación de acetilcolina, como la de otros transmisores, varía según el grado de despolarización de la terminal nerviosa y de la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} en el líquido extracelular (Bowman and Rand, 1984).

I.1.f. LOCALIZACION Y BIOQUIMICA DEL RECEPTOR NICOTINICO MUSCULAR. -

Para su identificación y localización se han utilizado ligandos como α -bungarotoxina, un polipéptido que se une de manera específica e irreversible a estos receptores (Lee, 1972).

Con radionúclidos o peroxidasas marcadas, α -bungarotoxina (α -BT) se puede ver su localización por microscopio electrónico. El receptor de acetilcolina (ACh-R) está localizado en las crestas de los pliegues de la unión neuromuscular, justo debajo de las zonas activas (Fertuck and Salpenter, 1974; Daniels and Vogel, 1975). El número de uniones a α -BT se estima por algunos autores alrededor de 30.000 nm^{-2} en estas áreas (Fertuck and Salpenter, 1976).

La bioquímica del receptor de acetilcolina según Drayer (1982) consiste en una glicoproteína que se extiende 5 nm al exterior de la membrana y unos 1.5 nm en el espacio intracelular (Ross and col., 1977). El receptor tiene un peso molecular de 250.000 y está constituido por varias subunidades. El receptor aislado es como una molécula de $14 \times 8 \text{ nm}$ y de 250.000 daltons. Esta se compone de subunidades de 40 a 69 mil daltons, con dos sitios de unión para la α -bungarotoxina y uno o dos de agonista-antagonista por molécula receptora (Heidmann and Changeux, 1978). La medición del número de receptores por unidad de superficie y la conductancia de membrana han demostrado que la translocación de iones es bastante rápida, unos 5×10^7 iones por segundo, para requerir movimiento a través de un canal abierto y no por un portador rotativo de iones. Además, los cambios de permeabilidad de iones, mediados por agonistas, es decir el movimiento de entrada de sodio y de salida de potasio, puede producirse por un solo tipo de canal iónico (Dionne and col., 1978). El sitio de unión con el agonista parece estar íntimamente acoplado con un canal iónico y la unión del agonista provoca un cambio rápido, que abre el canal. La densidad del

receptor según distintos autores oscila entre 10.000 nm⁻² a 30.000 nm⁻², tendiendo a localizarse en los puntos de los pliegues postsinápticos y presentando una cavidad centrada en la molécula receptora.

I.1.g. LOS RECEPTORES DE ACETILCOLINA.

De lo dicho hasta aquí se desprende que los receptores de acetilcolina que intervienen en el proceso de transmisión neuromuscular están localizados en la membrana postunión a nivel de la placa motora terminal. Además, está comprobada la existencia de receptores de acetilcolina antes de la unión; se hallan localizados en las terminaciones nerviosas, probablemente a nivel del primer nodo de Ranvier. La acetilcolina y otros agonistas nicotínicos interactúan con los receptores preunión produciendo despolarización de la membrana nerviosa terminal, y este efecto, como el de la membrana postunión, es bloqueado por la tubocurarina y fármacos similares. Es objeto de discusión si los receptores de acetilcolina preunión desempeñan algún papel en la transmisión fisiológica normal o bien tienen función neuromoduladora a este nivel. La mayor parte de los autores admiten que si lo ejercen, es muy pequeña con relación con el papel de los receptores postunión.

Se han hecho muchas deducciones acerca de la índole del receptor de la acetilcolina postunión basándose en relaciones de estructuración entre agonistas. Se ha comprobado que componentes

polipéptidos de los venenos de algunas serpientes de las familias Elapidae (cobras, Bungarus, corales, Dendraspis, tigres, serpientes africanas) e Hydrophiidae (serpientes de mar) se fijan fuertemente y en forma selectiva e irreversible a los receptores de acetilcolina. La mayor parte de los estudios se han efectuado con una α -bungarotoxina del veneno de la serpiente de Taiwan Bungarus multicinctus; la β -bungarotoxina del mismo veneno de serpiente tiene acción diferente.

El empleo de toxinas radiomarcadas y la técnica de autoradiografía han permitido efectuar estimaciones del número de receptores en una sola placa motora terminal. En músculos de rata, ratón y pollo se ha calculado que hay aproximadamente 50 millones de receptores por placa terminal motora. Las fibras musculares todavía responden en forma máxima a la estimulación nerviosa cuando el 45 % de los receptores están bloqueados por la toxina, pero viene rápidamente la parálisis cuando están bloqueados más del 45 %. Por lo tanto, cabe considerar que casi la mitad de los receptores son redundantes.

El componente muscular que se combina con la α -bungarotoxina radiomarcada puede separarse; se ha identificado como una proteína unida a la membrana compuesta de unidades con peso molecular de aproximadamente 80.000 agregados en tetrámeros. Esta proteína contiene el receptor para acetilcolina que ahora se ha aislado en forma pura del músculo denervado de mamífero (peso molecular = 43.000).

Los lugares receptores han de tener gran similitud estructural con los lugares activos de la enzima acetilcolinesterasa, ya que ambos poseen fuerte afinidad por la

acetilcolina. Frecuentemente se ha sugerido que son idénticos y que la acetilcolina es hidrolizada cuando interactúa con un lugar receptor. Sin embargo, resulta difícil explicar el hecho de que muchos fármacos que inhiben el enzima, tienen poca o ninguna capacidad de bloquear la transmisión colinérgica y carecen de efecto importante sobre la actividad colinesterasa. Los principales datos en contra de la hipótesis según la cual los colinoreceptores son idénticos a la acetilcolinesterasa, son los siguientes: 1) A nivel de la unión neuromuscular la micro-aplicación iontoforética de acetilcolina demuestra que hay puntos (receptores) sensibles a la acetilcolina fuera de la zona donde existe la acetilcolinesterasa. 2) En músculos crónicamente denervados (ver luego) se desarrollan receptores de acetilcolina sobre la membrana y no guardan relación con acetilcolinesterasa. 3) En células musculares esqueléticas de embrión cultivadas se desarrollan receptores de acetilcolina, mucho tiempo antes que aparezca la acetilcolinesterasa (funcional). 4) En todos los tipos de músculo es posible bloquear los receptores de acetilcolina con α -bungarotoxina y luego comprobar la presencia de acetilcolinesterasa en otros lugares empleando técnicas histoquímicas (Bowman and Rand, 1984).

I.2. CLASIFICACION DE LOS FARMACOS AGONISTAS Y

ANTAGONISTAS DE LA HISTAMINA.-

Son innumerables los fármacos que pueden tener uno u otro efecto. Así los fármacos capaces de liberar histamina como la morfina, el curare, etc., pueden producir efectos histamínicos: broncoconstricción, etc. Esta clasificación intenta basarse en la acción estimulante o inhibitoria sobre los receptores H₁, H₂ y otros no clasificados.

H1-agonistas:

- 2 -metil-histamina
- 2 -(2-piridil) etilamina
- 2 -(2-tiazolil) etilamina

H1-antagonistas:

- 1) Etanolaminas: difenhidramina
- 2) Etilendiaminas: antazolina
- 3) Alquilaminas: clorfeniramina.

Agonistas indirectos (favorecen la liberación de histamina):

Histamina	Derivados de piperidina
Diamidinas	Compuesto 48/80
Polimixina	Derivados de piridinio
Amodiaquina	Alcaloides
Morfina	

H2-agonistas:

- 5-metil-histamina
- Dimaprit
- Impromidina
- 5-metil-N-metilhistamina

Antagonistas indirectos:

- Cromoglicato
- Brocresina
- Hidrazinohistidina

H2-antagonistas:

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1) De molécula compleja: | 2) Derivados del imidazol: |
| Lamtidina | Burimamida |
| Loxtidina | Metiamida |
| BMY25368 | Cimetidina |
| BMY 25405 | |
| Famotidina | 3) Derivados del furano: |
| Etintidina | Ranitidina |
| Mifentidina (DA 4577) | |
| Tiotidina | 4) Isocitosinas: |
| AH 18801 | Oxmetidina |
| SKF 93479 | |
| SKF 91486 | |

I.3. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LOS

ANTI-HISTAMINICOS H₂.-

Los primeros compuestos con actividad antihistamínica H₂ consistían en derivados de la histamina, sobre todo conservando el anillo imidazol al que se adicionan diversos radicales. De unos doscientos compuestos iniciales, se vio que la burimamida tenía acción bloqueadora de receptores H₂ (Black and col, 1972). Esta primera serie de compuestos químicos conservan el anillo imidazol, la histamina, si bien con radicales más largos. Otros compuestos importantes fueron metiamida y cimetidina. Químicamente son moléculas hidrofílicas, polarizadas, de fácil eliminación en general, a diferencia de los antagonistas de receptores H₁, más lipofílicas. El anillo imidazol permite la unión y el reconocimiento del receptor H y el radical nuevo impide que de la unión fármaco-receptor se traduzca en un efecto estimulante, sobre todo porque la histamina es menos efectiva y además tienen más afinidad (Ganellin and col., 1976; Brinblecome and col., 1978; Ganellin, 1978 a, 1978 b). En la segunda serie de antagonistas de receptores H₂ destaca la ranitidina, la cual tiene en vez de anillo imidazol de la histamina un anillo de furano y el resto radicales similares a la cimetidina, aunque no idénticos, que confieren a estas moléculas complejas efectos estimulantes o inhibitorios de otras funciones de receptores no histamínicos. Cimetidina con radical derivado alquil ciano-

guanidina y ranitidina con grupo cianoalquílico similar en cadenas no cargadas -no presentan ionización- a pH fisiológico (Domschke and col., 1980). Cimetidina es más soluble en los lípidos que ranitidina (Bax and col., 1980).

Los antihistamínicos H₂ antagonizan la secreción ácida gástrica, estimulada por los tres secretagogos endógenos: histamina, acetilcolina y gastrina, si bien con diferencias significativas así Brittain and Daly (1980), comunican sus resultados en perros conscientes con sacos de Heindenhain obteniendo los siguientes resultados comparativos frente a histamina y betanecol (efecto colinérgico):

Tabla I.- Valores de DE50 antisecretora y potencias relativas (con límite de confianza del 95%) para ranitidina y cimetidina en el perro.

Secretagogo	Vía	Antagonista Compuesto	DE 50 antisecretoria en mg/Kg	Potencia rela- tiva a Cimeti- dina.
Histamina	i.v.	Ranitidina	0.07 (0.05-0.09)	5.9* (4.4-8.2)
		Cimetidina	0.43 (0.034-0.054)	1
	oral	Ranitidina	0.23 (0.17-0.29)	4.3* (3.2-5.8)
		Cimetidina	0.96 (0.80-1.15)	1
Betanecol	i.v.	Ranitidina	0.14 (0.10-0.27)	9.5* (5.4-16.5)
		Cimetidina	1.24 (0.85-2.14)	1
	oral	Ranitidina	0.11 (0.04-0.26)	9.2* (3.4-23.8)
		Cimetidina	0.97 (0.17-2.85)	1

* = significativamente diferente de cimetidina a p < 0.05

De esta relación se deduce que ranitidina tiene casi

doble potencia anticolinérgica que antihistamínica, comparada con cimetidina. Ello nos indujo a investigar en profundidad no sólo la bibliografía, sino también la estructura molecular para ver las similitudes y diferencias entre las moléculas de los agonistas y los antagonistas de la siguiente manera:

a) Similitudes de histamina con ranitidina y cimetidina. Consisten en un común anillo heterocíclico pentaatómico, imidazólico en histamina y cimetidina, mientras que en ranitidina el anillo furano es similar en parte con histamina y cimetidina.

Ranitidina tiene un oxígeno que hace de puente entre dos átomos de carbono como diferencia fundamental y ausencia en el anillo de dos átomos de nitrógeno. La disposición de los radicales alifáticos es similar en las moléculas e idéntico el primer grupo metileno.

b) Similitudes de acetilcolina con cimetidina y ranitidina

Hay que considerar lo poco disimilar que tienen algunos componentes de las moléculas de cimetidina y sobre todo ranitidina, respecto de acetilcolina, que podrían explicar efectos experimentales y clínicos de ambas. Ahora bien, ranitidina tiene destacados efectos de tipo colinérgico en unos órganos y anticolinérgico en otros, que tendrían relación con su parcial similitud estructural con acetilcolina y esta relación estructura-actividad es básica para comprender mejor nuestros resultados experimentales en la preparación frénico-diafragma de rata.

En los estudios sobre la química y el porqué de los efectos del curare, Santesson en 1900 vio que la metilación de las bases

terciarias, al convertirse en cuaternarias, reforzaban sus efectos. Por otro lado las sales de "onium" de Ing (1936), término genérico para los cationes amonium, fosfonium y sulfonium, tienen acciones curáricas (Velázquez, 1966). También existe un componente furtretonium derivado de ranitidina, que presenta propiedades colinérgicas, actualmente identificado como un residuo, correspondiendo a ioduro de 5-metil-3-trimetilamoniometil- dihidrofurano (Re and col. 1983).

Se admite que a pH fisiológico el nitrógeno terciario de ranitidina, se puede cuaternizar, con lo que contribuye a tener mayor similitud con acetilcolina, si bien limita su difusión a través de la barrera hematoencefálica, puede mimetizar sus efectos en otros órganos.

En la estructura de cimetidina también se ha señalado algún grupo activo con efectos colinérgicos. Otro aspecto interesante en las relaciones estructura actividad nicotínica en placa motora de ranitidina es su parcial identidad de componentes moleculares del anillo furano con el grupo dimetilamino, y el compuesto 4-dimetil aminopiridina y estos a su vez con similitud estructural también parcial respecto de acetilcolina. En algunos órganos in vitro, presentan acciones comunes, debido a esta parecida estructura química y grupos reactivos idénticos.

Ranitidina también presenta otros componente en su molécula, que aisladamente presentan también efectos nicotínicos en placa motora. Es decir las acciones farmacológicas de ranitidina en la unión neuromuscular de rata pueden estar relacionadas con el grupo dimetilamino unido por un grupo metilo al anillo heterocíclico furano y relacionado con fármacos de estructura

similar como 4-dimetilaminopiridina y de efectos similares.

También otros compuestos como el fenol y catecolaminas presentan un aumento de acetilcolina en placa terminal motora. El tetraetilamonio a dosis anticurare. Los fármacos α -agonistas también y lo mismo sucede con la guanetidina, los anticolinesterásicos y las aminofilinas, aunque por mecanismos diferentes.

Las relaciones estructura-actividad de los nuevos antihistamínicos H_2 son más complejas, ya que otros efectos que no son vehiculados por receptores H_2 persisten, siendo a veces opuestos, debido a una común afinidad receptorial con o sin actividad intrínseca dependiendo del órgano y la especie estudiada.

En resumen, ha existido un gran desarrollo en la química orgánica física así como en el desarrollo del análisis dinámico de la actividad estructural de los antagonistas de la histamina a nivel de los receptores H_2 (Ganellin, 1981). En un principio se observó que las imidazolilalquilguanidinas, isotioureas y carboxamidas eran agonistas parciales y por ello se intentó cambiar el componente agonista, alargando la cadena lateral y sustituyendo el grupo fuertemente básico en estas moléculas, por grupos no básicos. Este enfoque convirtió las tioureas y cianoguanidinas en antagonistas competitivos, por ejemplo burimamida y cimetidina. Después se descubrieron otros grupos químicos no básicos para las estructuras antagonistas, tales como las 1.1-diamino-2-nitroetenes y 2-amino-piridin-4 (isocitosinas). Estas mitades se incorporaron, respectivamente a los antagonistas H_2 recientes, ranitidina y oxmetidina

(Ganellin, 1981). Posteriormente se descubrieron una gran cantidad de compuestos químicos muy heterogéneos, con actividad antagonista de receptores H_2 , que precisan de una mayor perspectiva farmacológica para destacar su trascendencia y posible utilidad clínica.

I.4. EFECTOS COLINERGICOS DE LOS ANTIHISTAMINICOS H_2 .

Para entender muchos de los efectos que en esta tesis doctoral se han experimentado con los antihistaminicos H_2 , es preciso conocer los efectos colinérgicos que estos fármacos presentan. El estudio de los efectos anticolinérgicos de los antihistaminicos H_2 tiene interés porque su principal efecto es el antisecretor gástrico y este efecto está mediado por Ach y por otro lado los efectos neuromusculares in vitro tienen que ver con las acciones colinérgicas, en cuanto que ello supone unos niveles de Ach en el líquido nutricional mayores, es decir, que al menos experimentalmente si se estimula este sistema los niveles de Ach que hay en el líquido nutricional tienen efecto aditivo con la Ach que se libera con el impulso nervioso por estímulo eléctrico y es sabido que a mayor incremento de Ach en placa motora, mayor contracción muscular.

Hasta fecha relativamente reciente no se van conociendo las bases farmacológicas que expliquen la diversidad de efectos indeseables de estos agentes antiulcerosos. A continuación se resumen los efectos experimentales de los antihistaminicos H_2 , así como los efectos adversos en clínica que afectan

particularmente al sistema colinérgico. En 1983 Hansen and Bertl describen los efectos anticolinesterasa de cimetidina, conociéndose mucho antes la acción bradicardizante de cimetidina (Levi and col., 1975) explicando simplísimamente el fenómeno como debido al antagonismo de receptores histamínicos H_2 , si bien por nuestros estudios en frénico-diafragma y antes otros autores en diversas preparaciones, relacionaron efectos sobre canales de calcio de los antihistamínicos H_2 , e incluso acciones vagales evidenciadas con ranitidina en diversas preparaciones in vivo e in vitro (Berteccini and Coruzzi, 1982).

Algunos estudios de tejido muscular humano en tiras auriculares, tanto cimetidina como ranitidina no presentan efectos inotrópicos positivos, incluso con dosis altas y por el contrario oxmetidina y el nuevo compuesto SKF 93479 muestran un efecto inotrópico negativo, que se observa con dosis mayores que las requeridas para el antagonismo de los receptores H_2 , relacionando este efecto con la movilización del ión calcio y en este sentido estos compuestos se podrían considerar como calcio-antagonistas potenciales. (Coruzzi and col., 1983), si bien en ciertas condiciones la liberación de catecolaminas se ha observado con ambas cimetidina y ranitidina (Itskovitz, 1983) por lo cual incluso estos agentes se comportarían como ionóforos de calcio ocasionales a nivel presináptico terminal, ya que hay diferencias de especie y órgano. Así con ranitidina, menos utilizado que cimetidina, estadísticamente presenta también menos efectos adversos de bradicardia (Camarri and col., 1982; Shah, 1982) interpretando este efecto Bertaccini and Coruzzi (1982) como dispar, ya que otros pacientes no muestran alteración vagal,

a pesar del aumento de dosis. De todas formas los prospectos de ranitidina inyectable en la RFA son obligados a señalar el riesgo bradicárdico, cuando se utiliza en bolo i.v.

Otros antihistamínicos H_2 presentan acciones anticolinérgicas como etintidina y tiotidina (Bertaccini, 1983). Todos estos efectos no están mediados por receptores H_2 .

La inhibición de acetilcolinesterasa y pseudocolinesterasa presenta grandes diferencias entre ranitidina (con dosis sobre $0.1 \mu M$) y cimetidina que el efecto se consigue con dosis mil veces mayor (Hansen and Bertl, 1983) siendo estos efecto colinérgicos, demostrando también otras preparaciones aisladas (Re and col., 1983). Jones and col. en 1983 han observado que la aplicación iontoforética de ranitidina ($0.1 M$) produce una excitación de las neuronas de la médula de rata, sensible a atropina, que es similar a la aplicación de acetilcolina y esta última es potenciada por ranitidina.

Otros efectos sobre el tracto gastrointestinal no están todavía aclarados. La diarrea o constipación observadas con cimetidina o ranitidina pueden ser por afectación colinérgica ocasional en ciertos pacientes, sobre todo con ranitidina debido a una directa o indirecta activación del sistema colinérgico en la diarrea, ya que la atropina es inhibidora en administración previa. Además en humanos la administración de ranitidina en bolo i.v. causa aumento de tono del esfínter esofágico inferior -efecto colinérgico- aumento de la secreción salivar así como retraso del vaciamiento gástrico Bertaccini and col. (1983) han observado en pacientes con gastroparesia idiopática, la formación de ondas migratorias en el estómago, tras dar ranitidina, así

como un incremento plasmático de motilina.

En la literatura se han descrito los siguientes efectos adversos de ranitidina, que pueden ser debidos en parte a interacción con el sistema nervioso vegetativo: bradicardia, hipertensión, cardiopatía isquémica, palpitaciones-arritmias, síncope, depresión, vértigo, somnolencia, fatiga-cansancio, irritabilidad-mal genio, colapso nervioso, tinnitus, colitis, constipación, diarrea, dispepsia, epigastralgia, meteorismo, vómito, síntomas de reflujo gástrico, aumento de creatinina, rash-prurito, alérgia, anafilaxia, astenia, coriza, sequedad de mucosas, fiebre, cefalea, eritema facial, hipoestesia, aumento de asma, aumento de presión intraocular, lagrimeo, dolor muscular, parestesias y sialorrea, entre otras muchas. Hay que señalar que de los efectos adversos señalados, se han descrito a veces un solo caso y que de cimetidina hay descritos también más casos de efectos secundarios y adversos por llevar más años de utilización clínica.

En resumen, ranitidina puede ejercer acciones colinérgicas o anticolinérgicas ocasionalmente, como lo demuestran los efectos colinérgicos en unas preparaciones como el esfínter esofágico inferior (Bertaccini and Coruzzi, 1982), y en otros como músculo traqueal de cobayo (Re and col., 1983), aunque en el hombre normalmente no hay aumento del tono del músculo tráqueobronquial. Por ello este efecto colinérgico no es ubicuo, dado que está completamente ausente en algunos tejidos (Bertaccini and col., 1981; Daly, 1982). También se observan efectos de sinergismo o antagonismo colinérgico según las condiciones naturales o farmacológicas (Re and col., 1983).

I.5. ACCIONES FARMACOLOGICAS DE LA HISTAMINA. EFECTOS NEUROMUSCULARES.-

Aunque considerada como autacoide hasta hace pocos años, hoy se le atribuyen funciones también como neurotransmisor exclusivo en neuronas histaminérgicas, así como neuromodulador en la neurotransmisión de otros sistemas, todavía mal conocido por lo sutil y escasa cuantía. A veces afecta los movimientos del Ca^{++} . Aunque los efectos neuromusculares de histamina son poco conocidos, en algunas sinápsis incluidas las colinérgicas se comporta como neuromodulador (Yamada and col., 1982), mientras que en placa motora de rana disminuye la sensibilidad de los receptores a acetilcolina (Ach) (Scuka, 1973; Otha and col., 1984) por mecanismo desconocido y puede actuar como antagonista de Ach en el sitio de unión del complejo receptor nicotínico-canal iónico (Ariyoshi and col., 1985). El estímulo de los receptores histamínicos H_2 presinápticos puede aumentar o disminuir la liberación de Ach de las uniones neuromusculares de rana (Scuka, 1973). Por otro lado, histamina bloquea no solo la unión específica al receptor de Ach sino que interacciona con el sitio del canal de Ach, actuando como un antagonista que modula la transmisión colinérgica (Ariyoshi and col., 1985). También puede aumentar o disminuir la liberación de Ach de las uniones neuromusculares de rana (Scuka, 1973). Estos efectos, aunque parecen ser contrapuestos, es posible que sean debidos a que histamina puede actuar con función moduladora en sitios asociados con el receptor nicotínico (Ariyhosi and col. 1985), desconociéndose su interacción con la movilización del Ca^{++}

citosólico o sarcoplásmico. En células miocárdicas histamina incrementa el turnover de Ca^{++} (De Mello, 1976). Sobre el sistema nervioso las vías histaminérgicas tienen efectos de modulación córtico-subcortical, con acciones sobre hipotálamo vegetativo.

En placa motora de rata (frénico-diafragma) histamina 100 μM deprimía más el estímulo directo que el indirecto y la adicción posterior del antihistaminico H_2 ranitidina a dosis equimolares antagonizaba más el estímulo directo que el indirecto (Iglesia, 1986), ello indica que el efecto de histamina no está relacionado con la liberación del neurotransmisor acetilcolina en placa motora y si posiblemente con movimientos de calcio del retículo endoplásmico. La inhibición de receptores H_1 podría contribuir a aclarar el problema del mecanismo de acción de la histamina en placa motora, pero los fármacos que ejercen tal acción tienen otras propiedades como la acción anestésica local o gangliopléjica que en mayor o menor cuantía enmascaran un efecto puro sobre receptores H_1 . Así pyrilamina, prometazina, y difenhidramina inhiben la acción de Ach a nivel postsináptico (Katayama and Tasaka, 1985). También histamina deprime la sensibilidad del los receptores de Ach por mecanismo desconocido (Scuka, 1973). Por otro lado, histamina bloquea la unión irreversible de erabutoxina con el sitio receptor de Ach en placa motora de rana (Ariyoshi and col., 1985) y para estos autores histamina bloquea no solo las uniones específicas con Ach sino también con el complejo canal-receptor. Es decir, histamina compite con acetilcolina. También los efectos musculares de los antagonistas de receptores H_1 tales como fatiga y laxitud no

pueden ser considerados específicos ya que tienen acciones sobre SNC. Los receptores H_3 han sido localizados en neuronas colinérgicas, no adrenérgicas y no colinérgicas del plexo mientérico, teniendo un control negativo (inhibición) de la liberación de neurotransmisores (Bertaccini and col., 1991) y secreción ácida gástrica.

Los receptores H_1 se comportan como nociceptores y los H_2 como antinociceptores, siendo activadores de la respuesta al stress los H_1 (¿se oponen los H_2 ?). La actividad locomotora está en relación con los H_2 y sistemas 5-HT. Los H_1 inhiben conducta agresiva, que estimulan los H_2 . Los H_1 disminuyen temperatura corporal, vía hipotálamo anterior, mientras que el estímulo de los receptores H_2 aumentan la temperatura corporal, si bien la hipotermia en el ratón causada por histamina, no se inhibe por antihistamínicos H_1 y H_2 (Costetin and col., 1973). Hay efectos histaminérgicos en SNC sobre conducta, comportamiento, memoria, aprendizaje, presión arterial, ADH, polarización de neuronas y emesis.

También histamina induce la despolarización del ganglio cervical superior de rata que era antagonizada por mepiramina (antagonista H_1) pero no por cimetidina (antagonista H_2) por lo que Field and Newberry (1991) concluyen que ello es debido a la activación de receptores H_1 , mientras que con alta concentración de histamina también causa una rápida despolarización pero parece ser mediada por receptores H_1 , H_2 o H_3 .

Por otro lado histamina (100 nM - 1 mM) deprimía de forma reversible la amplitud máxima de la corriente de entrada inducida por Ach de forma dosis-dependiente; histamina prevenía la unión

especifica de Ach con el complejo canal receptor, sugiriendo que histamina puede actuar como un antagonista que modula la transmisión colinérgica nicotínica en placa motora de rana (Ariyoshi and col., 1985.).

También histamina se comporta como un potente secretor de pentapéptidos (met- y leu-encefalina) en células cromafines suprarrenales in vitro, efecto dependiente del Ca^{++} extracelular y reducido por bloqueantes de canales de calcio tales como cobalto, D-600 y nifedipina, siendo antagonizado por el H_1 -antagonista clemastina, mientras que los antagonistas H_2 ranitidina y cimetidina eran un 20 % menos efectivos (Bommer and col., 1987).

A nivel vascular produce dilatación arterial, con hipotensión y disminución de la presión arterial sistólica y diastólica. También causa dilatación capilar y aumento de la permeabilidad capilar con edema.

El corazón aumenta de fuerza y frecuencia de contracción por histamina, siendo posible la disminución dromotrópica en nodo A-V, al igual que en determinadas circunstancias estimula la liberación de noradrenalina, quizás por aumento presináptico del influx de Ca^{++} .

En SNC la histamina aumenta la presión arterial y la frecuencia cardíaca, vía hipotálamo anterior.

En aparato digestivo, aumenta secreciones salivar, gástrica, pancreática e intestinal. El aumento de secreción gástrica es interdependiente con gastrina, acetilcolina, prostaglandinas y somatostatina.

El aparato respiratorio puede presentar broncoconstricción

y aumento de secreciones por histamina. El efecto broncoconstrictor está mediado por receptores H_1 y el aumento de permeabilidad por receptores H_2 (Braude and col., 1984).

Otros efectos de la histamina son menos conocidos o importantes. Así relaja útero de rata, que es contraído por ranitidina por efecto de tipo colinérgico. También presenta acciones sobre linfocitos T y B, acciones inmunitarias, etc.

I.6. ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS ANTIHISTAMINICOS H_2 .-

El antihistaminico H_2 ranitidina ejerce efectos no relacionados con el antagonismo de receptores H_2 ya que posee acciones sobre receptores colinérgicos (Daly, 1982; Re and col. 1983), bien de estímulo colinérgico (Bertaccini and Coruzzi, 1.981 y 1.983), bien de inhibición colinérgica (Bradshaw and col., 1.979, Bertaccini and Coruzzi, 1981, Re and col 1.983). Por eso no es de extrañar que haya acciones descritas aparentemente contrapuestas de este fármaco en placa motora, dependiendo del protocolo experimental. En músculo estriado tiene acciones tanto de bloquo neuromuscular ((Galatulas and col. 1980; Gwee and Cheah, 1986) como de estímulo contráctil (Re and col., 1.983; Re and Rossini, 1.984). Las acciones contráctiles en músculo estriado serían por inhibición de colinesterasa e incremento en

placa motora de los niveles de acetilcolina.

Por otro lado, aunque ranitidina también potenciaba la respuesta a Ach en el útero de rata (Poli and col., 1984), músculo abdominal aislado de sapo (Cheah and col., 1985) e ileo de cobayo (Kouneis and col., 1986), estas acciones pueden no ser colinérgicas y ser mediadas por movimiento de Ca^{++} libre, etc.

I.7. ACCIONES EN PLACA MOTORA DE LOS BLOQUEANTES NEUROMUSCULARES COMPETITIVOS.-

La ocupación reversible de receptores de Ach en placa motora es la acción farmacológica fundamental de los agentes que producen selectivamente parálisis muscular duradera. La anulación del tétanos (50 Hz durante 5 s. por ejemplo) y la disminución a bajas dosis y anulación a dosis mayores del tren de a cuatro (TOF) derivan de lo anterior.

Los bloqueantes neuromusculares competitivos no modifican la corriente que fluye a través de cada canal ni altera el tiempo de apertura media de un canal, si bien reducen la frecuencia de apertura en placa motora. y por ello acetilcolina es capaz de combinarse con los mismos receptores competitivamente, ya que estos compuestos actúan de forma reversible y si la densidad de acetilcolina se incrementa localmente por inhibición de colinesterasa, los receptores no bloqueados se activan y se

desplaza al bloqueante neuromuscular de los receptores comunes. Sólo α -bungarotoxina es de unión irreversible con receptores nicotínicos en placa motora. La duración de acción es un índice de la reversibilidad del bloqueo de receptores, aunque también intervienen otros factores. El incremento de potasio extracelular disminuye la sensibilidad al bloqueo competitivo. Paralelamente, a mayor concentración de calcio menor despolarización por acetilcolina (Waud and Waud, 1980) y menor afinidad de d-tubocurarina por el receptor nicotínico (Jenkinson, 1960).

El estandar de referencia del bloqueo neuromuscular se hace in vitro mediante la valoración de la contracción realizada con estímulos de 0.2 Hz de duración y de intensidad supramaximal. Así por ej. el 50 % del bloqueo neuromuscular se refiere al 50 % de reducción de la altura de la contracción a un estímulo simple. Este no deberá estar condicionado por otros factores tales como el que esté precedido por un tétanos o trenes de estímulos, ya que su altura real se modificaría. Los trenes de estímulos de 50 Hz durante 5 s. tienen también un efecto depresor de la contracción cuando se dan relajantes musculares competitivos y son una forma más de valorar el grado de curarización. Por último, el análisis del tren de a cuatro (train of four, TOF), de cuatro estímulos durante 2 s y 2 Hz de frecuencia constituye una valiosa ayuda para conocer el grado de relajación muscular y reversibilidad del bloqueo. El análisis de la "ratios" (cocientes) entre los cuatro impulsos nos da información de la altura del mismo y la evolución con cada dosis de fármaco. En términos generales, los fármacos bloqueantes y depresores neuromusculares causan un gradiente del TOF decreciente, mientras

que los fármacos ionóforos de calcio producen gradiente del TOF creciente y causan incremento contráctil muscular. Los anticolinesterásicos causan incremento contráctil y siempre causan gradiente del TOF decreciente aunque aumentado de altura.

Atracurio como nuevo bloqueante neuromuscular competitivo supone un gran avance hacia el relajante muscular ideal por su escasa acumulación, así como la latencia, la corta duración de acción y la rapidez, que le hacen equiparable a pancuronio y vecuronio (Gramstad and col. 1983), teniendo un amplio margen entre la dosis relajante y la que causa otros efectos (Hughes and Chapple, 1981). Presenta eliminación Hofmann, dependiente de la temperatura corporal y el pH así como hidrólisis estérica (Neill et al., 1983), lo que dificulta su posible acumulación.

I.8. ACCIONES NEUROMUSCULARES DEL LOS FARMACOS ANTICOLINESTERASICOS.-

Los fármacos anticolinesterásicos incrementan la fuerza contráctil del músculo estriado al inhibir colinesterasa verdadera y aumento subsiguiente de los niveles de acetilcolina en placa motora (Bowman, 1980). Neostigmina es un fármaco anticurare en base a su acción anticolinesterasa (para revisión ver Cronnelly and Morris, 1982) y su acción contráctil de neostigmina está en relación con la concentración plasmática y la inhibición de colinesterasa (Cronnelly and Morris, 1982). Neostigmina tiene también efectos directos en placa motora no relacionados con la actividad anticolinesterasa (Fickers, 1985).

Ranitidina tiene también actividad anticolinesterasa (Hansen and Bertl, 1983; Galli and col. 1984), por lo que el incremento de acetilcolina puede explicar sus efectos sobre músculo estriado (Galatulas and col. 1980; Re and col. 1983).

Los agentes anticolinesterásicos aumentan la respuesta al estímulo simple, causando por el contrario una rápida anulación del tétanos (inhibición Wedensky), por estímulos a altas frecuencias (Morrison, 1977; Hedfron & Hobbinger, 1979, Clark & Hobbinger, 1983, Clark and col. 1983; 1984).

La elevación continuada o crónica de los niveles de acetilcolina en placa motora puede disminuir la sensibilidad de los receptores a la misma (Gwilt & Wray, 1986), así como una disminución de receptores a α -bungarotoxina (Chang and col., 1973). Es decir, en un exceso crónico de acetilcolina puede causar una adaptativa reducción en la carga pasada por un único canal junto con una reducción en el número de AChRs en placa motora; estando la frecuencia de apertura de canales reducida (Gwilt & Wray, 1986). Por el contrario, en la denervación hay un déficit crónico de acetilcolina, incrementándose los receptores (Axelson & Theslef, 1959; Miledi, 1960) así como el tiempo de apertura de los canales (Wray, 1980), que origina un aumento del flujo de iones a través de tales canales, produciendo un incremento de la despolarización producida por la apertura de un canal simple (Katz & Miledi, 1972). Todos estos cambios son modulativos, ya que tienden a amortiguar y adaptarse al incremento o disminución de acetilcolina. Neostigmina también tiene efecto aditivo con Ach por acción estimulante nicotínica directa (Ricker and Wescoe, 1946).

El gradiente del tren de a cuatro -train of four- (TOF) es un índice tanto del grado de curarización (Waud and Waud, 1972) como de la recuperación del bloqueo neuromuscular (Ali and col., 1981), así como de la sensibilidad postsináptica (Lee, 1975). La depresión del tren de a cuatro, "train of four (TOF) fade" y del tétanos, "tetanic fade" también son índices tanto del grado de curarización (Waud & Waud, 1972) como de la recuperación del bloqueo neuromuscular (Ali & col., 1981). La disminución del latido "twitch" y del tétanos se produce en el bloqueo postsináptico de los colinoceptores (Bowman, 1980). La potenciación post-tetánica (PTP) es un incremento transitorio de la respuesta al estímulo simple que sigue a la estimulación repetitiva del nervio (Hughes, 1958).

El tren de a cuatro (TOF) permitirá conocer el grado de ocupación de receptores en placa motora y en unión del tétanos daría más información que las respuestas al estímulo simple (Bowman, 1980). La facilitación posttetánica varia con los fármacos empleados.

I.9. EFECTOS NEUROMUSCULARES DE LOS CAMBIOS IONICOS EN PLACA MOTORA.-

Todos los fármacos que actúan sobre membranas excitables, se puede modificar su acción por cambios en la concentración iónica. Así, a nivel de placa motora los cambios iónicos producen modificaciones electrofisiológicas. El exceso de potasio en el medio nutricio disminuye el potencial de membrana (Katz, 1966; Asai and col., 1982) también incrementa a nivel presináptico

tanto la frecuencia de potenciales miniatura de placa (Ginsburg and Jenkinson, 1976) como la cantidad de transmisor liberado (Van der Kloot, 1978). El incremento en el medio de potasio tiene un efecto despolarizante en nervio y músculo. No obstante, un exceso de potasio extracelular inactiva la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico del músculo estriado por despolarización de la membrana (Bowman, 1980a) En nuestros resultados también se observó un aumento de la fuerza contráctil muscular incrementando la concentración de potasio en el líquido nutricional.

La liberación de Ach en placa motora es también dependiente de la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} extracelular (Bowman, 1980a) de la siguiente forma: a) el aumento de la concentración de calcio aumenta la liberación de Ach; b) la disminución de la concentración de magnesio aumenta la liberación de Ach (Hubbard and col., 1968) y c) viceversa, disminuyendo $[Ca^{++}]_o$ o aumentando $[Mg^{++}]_o$ disminuye la cantidad de acetilcolina liberada (Bowman, 1980a), ya que la liberación espontánea del neurotransmisor en la unión neuromuscular es parcialmente dependiente del calcio extracelular (Elmqvist and Felman, 1965). El calcio a nivel postsináptico disminuye el grado de despolarización producido por acetilcolina (Ginsburg and Jenkinson, 1976), altera la afinidad del receptor por tubocurarina (Jenkinson, 1960), mientras que a nivel presináptico puede incrementar la liberación de Ach si se incrementa la concentración de calcio (Katz and Miledi, 1965).

A nivel postsináptico los iones de calcio aumentan el umbral de excitabilidad de la membrana (Bowman and Rand, 1980), se disminuye la permeabilidad al sodio y desencadena la despolarización postsináptica.

En la contracción muscular también el calcio juega un papel importante ya que inactiva la proteína inhibidora troponina y activa la ATPasa, que produce la energía para las uniones entre actina y miosina (Braunwald, 1982). Con la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico se incrementa el calcio activo para causar la contracción, mientras que el calcio externo que penetra en la célula no causa contracción muscular aunque aumenta la cantidad de calcio activo en el retículo sarcoplásmico (Nicola-Siri and col., 1980).

I.10. ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS INHIBIDORES DEL ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA.-

La literatura sobre los efectos en placa motora de los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina es muy escasa. Los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (ECA) como captopril disminuyen la presión arterial por bloqueo periférico de la formación de angiotensina II (Sweet and col., 1983). Asimismo, la literatura sobre los efectos de captopril en músculo estriado es limitada, principalmente porque carece de efecto manifiesto sobre la contracción in vitro, aunque potencia el sistema prostaglandina- kinina- kalikreina, (Matsumo and col. 1986). Por otro lado, ECA es idéntico con kininasa II y la reducción de su actividad por un inhibidor de ECA puede no sólo disminuir la concentración de angiotensina II sino también elevar los niveles de kininas (Dietze, 1987). Angiotensina II

incrementa la liberación de acetilcolina (Ach) y tiene acción contráctil en músculo esquelético (Wali, 1986).

Tanto captopril como enalapril no causan efectos contráctiles manifiestos en músculo de rata (Matsumo, 1986), no obstante captopril interfiere con la transmisión adrenérgica (Antoniaccio and Kervin, 1981) y angiotensina II en bajas dosis incrementa el flujo de noradrenalina (Zimmerman and Gisslen, 1968). Puesto que las aminas simpaticomiméticas mejoran la contracción muscular (Bowman , 1980), por este doble mecanismo es posible que la contracción muscular sea afectada. También hay que tener en cuenta que angiotensina puede facilitar la neurotransmisión colinérgica (Brown and col., 1980; Wali, 1983).

Angiotensina II aumenta la transmisión neuromuscular y la contracción por mecanismo pre y postsináptico (Wali, 1985).

I.11. ACCIONES NEUROMUSCULARES DE LOS FARMACOS CALCIO-ANTAGONISTAS.-

Los bloqueantes de canales lentos de calcio tienen acciones sobre musculatura lisa, estriada, cardíaca, neuronas y SNC. En la década actual (1990) existe tal cantidad de fármacos activos sobre los canales de calcio que se precisa hacer un breve resumen de estos canales iónicos así como de los diferentes tipos de calcio-antagonistas. Recientemente se han clasificado (Sppeding and Paoletti, 1992) y ello ha permitido el análisis de los

diferentes tipos de canales iónicos específicos de calcio como sigue:

1. Canales voltaje-dependientes Ca⁺⁺-selectivos:
Tipo L (subtipos L1, 2, 3 y 4; subunidades α_1 ,
 α_2 , β , τ y δ).
Tipo T
Tipo N
Tipo P

2. Otros canales calcio-selectivos:

- Canales de liberación de Ca⁺⁺ en retículo sarcoplásmico.
- Canales de Ca⁺⁺ receptor-operativos.

También existen a nivel de placa motora otros canales iónicos específicos de Na⁺, K⁺, etc.

Sobre este tipo de canales actúan de forma selectiva o más preferentemente los diferentes tipos de calcio-antagonistas, según se resumen a continuación:

1. Compuestos con unión selectiva a sitios de canales de tipo L:
 - a. Sitio de dihidropiridinas (DHP): nifedipina (protipo), nicardipina, etc. Es grupo muy numeroso y de alto uso clínico.
 - b. Sitio de benzotiazepinas: diltiazem.
 - c. Sitio de fenilalquilaminas: verapamil, gallopavil, etc.
2. Agentes que actúan sobre otros canales de calcio voltaje-dependientes:
Canales T: flunarizina
Canales N: conotoxina
Canales P: agatoxina
3. Moduladores de canales de calcio no selectivos: fendilina, cinarizina, flunarizina, etc.
4. Otros fármacos activos en canales calcio-selectivos:
 - I) Canales de liberación de Ca⁺⁺ en RS: ryanodina.
 - II) Canales receptor-operativos:
 - a. Canales de a.a. excitatorios.
 - b. Canales de angiotensina.
 - c. Canales de α -adrenoreceptores.
 - d. Canales de nucleótidos/nucleósidos.

Los fármacos de los grupos 1 y 2 son voltaje-dependientes. Los canales tipo L (de long, lasting) son abundantes en músculo estriado y dentro de estos cabe destacar la subunidad α_1 que es homóloga en un 55 % con la estructura del canal de Na⁺ y esto explicaría la doble afinidad por ambos de algunos fármacos (Grima and col., 1986). Los canales tipo T (de trasient) de actividad

marcapasos en algunos tejidos, se han localizado también en neuronas. Por otro lado, los canales tipo N (de neuronal, ni L ni T) están asociados a liberación de neurotransmisor. Todos ellos son los que más interesan a nivel neuromuscular, si bien son solo un anticipo que se alargará en el futuro. Estarían excluidos de la zona neuromuscular los canales tipo P (de Purkinje) ubicados en el cerebelo.

En las membranas t-tubulares del músculo esquelético se ha observado que son una fuente rica en sitios de unión de dihidropiridinas (Foset and col., 1983; Schwartz and Triggle, 1984) y se han llegado a purificar macromoléculas asociadas con el canal de Ca^{++} usando nitrendipina (Glossman and col., 1983). La corriente ICa^{++} se ha estudiado en músculo de rana (Almers and Palade, 1981), así como en músculo de rata (Danaldson and Beam, 1983). Aunque abundan los receptores de canales de calcio en músculo estriado (membranas, túbulos T y retículo sarcoplásmico principalmente), algunas DHPs como nitrendipina carecen de efecto a este nivel (Whalsh and col., 1986). Por otro lado, la fijación en el receptor de DHP no supone su inactivación aparentemente. El receptor de Ca^{++} ha sido estudiado y al mismo habría una unión alostérica y estereoespecífica para verapamil, diltiazem y DHP. Los tres tipos tiene una zona común y por otra son complementarios (Glasman and col., 1985). El hecho de que algunas DHP no sean activas en músculo estriado se ha explicado que ello sería debido al actuar sobre receptores silentes en determinadas condiciones experimentales e incluso subtipo de canales de calcio DHP-insensibles (Wlahs and col., 1986). Lo cierto es que todos los fármacos calcio-antagonistas son muy liposolubles y se fijan

en membranas, túbulos T, etc. Las DHPs causan en general vasodilatación en el músculo, por lo que por un lado antagonizan, por otro es posible sea contrareestado con un mayor aporte de calcio. Verapamil y diltiazem son dos representantes típicos con efectos neuromusculares y con mayor literatura en este campo.

Mientras que químicamente nifedipina es una 1,4 - dihidropiridina, verapamil es un análogo de papaverina y diltiazem una benzotiazepina, difieren bastante, comparten similares acciones farmacológicas y mecanismo de acción.

Desde 1969 se pudo interferir selectivamente sobre las corrientes transmembrana de Ca^{++} y de Na^{+} y con ello un mejor estudio de los inhibidores de las corrientes de entrada de calcio. Obviamente los primeros estudios fueron a nivel cardíaco y fibra lisa vascular. Los calcioantagonistas en placa motora bloquean la entrada de calcio a través de los canales lentos del músculo esquelético y causan relajación muscular. A nivel muscular existen acciones de los calcioantagonistas a nivel presináptico y postsináptico. A nivel presináptico se libera acetilcolina en pequeñas proporciones que no activan el proceso contráctil, pero dejan cierto estado de despolarización y producen unas deflexiones pequeñas, de bajo voltaje los llamados m.e.p.ps. La frecuencia de estos minipotenciales depende de la concentración de Ca^{++} axoplásmica y puede modificarse con variación de la temperatura y fármacos. En reposo la mayoría de los canales de Ca^{++} están cerrados y en actividad o por estímulo eléctrico pasan a estar abiertos. El potencial de acción postsináptico se produce por liberación de acetilcolina en mayor concentración en la terminación nerviosa. El calcio juega un

papel muy importante en este evento. Así, la amplitud de los potenciales de acción se modifica por la concentración externa de calcio y no se afecta por tetrodotoxina, inhibidor selectivo de la entrada de sodio, en cambio el manganeso y magnesio lo antagonizan de forma competitiva. Es decir, los antagonistas de calcio es posible que ejerzan acciones a nivel pre y postsináptico ya que hay potenciales de acción mediados por calcio a nivel postsináptico (Sánchez and Stefani, 1978: y a nivel presináptico (Katz and Miledi, 1969; Baker and col., 1971).

En reposo muscular no está aclarado si verapamil reduce el influx pasivo de calcio entre el gradiente de concentración intracelular 10^{-7} mol/litro y el extracelular de 2.54 mmol/litro. El verapamil a concentración alta, mayor de 10^{-4} M también causa aumento de la frecuencia de los potenciales miniatura (Publicover and Duncan, 1979).

Verapamil disminuye de forma dosis dependiente la amplitud de los potenciales de acción en músculo sartorio de rana en medio nutricio con potasio alto y sin cloro y sodio, revirtiendo en parte en medio con incremento de calcio (Kerr and Sperelakis, 1982). Los autores encuentran efectos dispares de verapamil. En términos generales a dosis bajas causa disminución de la contracción (Lawson and col., 1983; Kraynack and col., 1983) y a dosis altas incremento contráctil (Sato and Ono, 1981), quizás por incremento de salida de calcio del retículo sarcoplásmico (Bondi, 1978).

Verapamil y diltiazem bloquean la transmisión neuromuscular en el ratón solo a concentración alta, mayor o igual a 100 micro M, desapareciendo el potencial de placa (e.p.p.) con estímulos

a 0.1 Hz, mientras que a 100 Hz el bloqueo de músculo y nervio era a concentraciones menores de 10 micro M; si la transmisión neuromuscular se reduce por D-tobocurarina o incrementando el Mg^{++} y disminuyendo el Ca^{++} del medio nutritivo, se produce una disminución de la contracción por verapamil o diltiazem por un mecanismo de inhibición de la liberación del neurotransmisor (Chang and col., 1988). Por otro lado, la cantidad de calcio liberado del retículo sarcoplásmico (RS) por 4-aminopiridina (4-AP), un inhibidor de los canales de K^{+} -RS, no era afectado por verapamil a dosis 20 μM (Fink and Stefenson, 1987).

Nifedipina y diltiazem potencian el bloqueo neuromuscular de los relajantes musculares, sin que el incremento de calcio en el medio nutritivo tenga efecto reversal y postulando su efecto debido a bloqueo del influx de calcio y a la liberación de acetilcolina (Wali, 1986).

En diafragma de rata verapamil causa incremento contráctil seguido de depresión, que no es revertido por incremento de calcio (Varagic and Kentera, 1978; Bilkhazi and col., 1985). En músculo de gato puede o aumentar la contracción (Skirboll and col., 1979), o disminuirla (Krainck and col., 1983), dependiendo del protocolo experimental. Por otra parte se ha sugerido que verapamil y nifedipina incrementan la actividad bloqueante neuromuscular de fármacos bloqueantes neuromusculares no despolarizantes (Bikhazi and col., 1982; Kraynack and col., 1982).

I.12. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.-

El propósito fundamental de esta tesis era hacer un amplio estudio de las acciones nicotínicas en placa motora de algunos antihistaminicos H_2 , de los cuales había una literatura escasa. Previamente se ensayó con cimetidina, ranitidina y famotidina. La preparación frénico-diafragma de rata resultó también muy útil, ya que era muy sensible a ranitidina. Esta misma preparación era poco sensible a ranitidina en el cobayo. De los parámetros de estudio, el estímulo indirecto era el principal ya que remeda el estímulo fisiológico; el estímulo directo al músculo también permitía conocer los efectos musculares, excluyendo teóricamente la neurotransmisión. Los trenes de impulsos estandarizados son también unos valiosos parámetros de valoración indirecta de la contracción muscular, por la diferente y a veces específica modificación farmacológica. El tren de cuatro -cuatro impulsos acoplados de frecuencia 2 Hz. y duración 2 s.- (TOF) y el tétanos de 50 Hz durante 5 s. eran utilizables con este fin, si bien el tétanos era suprimido en algunos protocolos cuando o bien no era modificado por diferentes concentraciones de fármaco o bien la repetición excesiva y reiterada causaba per se efectos negativos sobre la contracción. Cuando se realizó el tétanos se valoró la potenciación postetánica que era otro medida muy útil en el análisis del fármaco. Naturalmente que estudios electrofisiológicos, histoquímicos, cinética de Ca^{45} radiactivo, etc. hubiera permitido ampliar más los conocimientos de estos fármacos, pero ello excedería en el tiempo y en medios materiales.

Conocida la acción contractil de ranitidina se planteó si tendría un origen colinérgico de tipo nicotínico o bien mediado por Ca^{++} . Con este motivo, se modificaron por un lado las concentraciones de Ca^{++} , Mg^{++} y K^+ del líquido nutricional, modificando la despolarización del nervio y/o músculo, así como la liberación del neurotransmisor acetilcolina y por otro lado se utilizaron dos tipos de calcio-antagonistas: verapamil y diltiazem.

Pensando en la posibilidad de que captopril, inhibidor del enzima convertidor de angiotensina, presentara efectos de tipo calcio-antagonista inespecíficos en placa motora, también se empleó para conocer el modo en que afectaba la acción de ranitidina.

Por otra parte, los efectos colinérgicos de algunos antihistamínicos H_2 como ranitidina descritos en diferentes preparaciones se fundamentan en la inhibición de colinesterasa. El enzima colinesterasa y el receptor de Ach es conocido que tienen similitud estructural como cabría esperar por tener un sustrato común fisiológicamente. El inhibidor prototipo es neostigmina. Por esta razón un análisis comparativo de ranitidina y neostigmina permitiría conocer si este antihistamínico H_2 tenía acciones de este tipo y cuantificables en esta preparación. Estos dos fármacos se ensayaron con curvas dosis-respuesta y con dosis óptimas solos y en asociación. También si ranitidina tenía acciones de inhibición de colinesterasa, tendría acciones anticurares, por lo que con este fin fue también comparado su efecto con neostigmina.

En Medicina son múltiples los campos de aplicación de los

antihistamínicos H₂, además del principal gastroenterológico. En Anestesiología, Cuidados intensivos, Medicina interna, etc., se utilizan asiduamente y los efectos clínicos adversos observados no siempre han tenido una explicación satisfactoria. Es más, los efectos contrapuestos que se observan dependen de la dosis - inhiben o activan enzimas- y del animal y órgano estudiado. Sirva esta tesis como pequeña aportación para aclarar algunas acciones y abra nuevas perspectivas para el futuro

II. MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS.-

A) MATERIALES.

1. ANIMALES.

En nuestros experimentos hemos utilizado ratas de ambos sexos SPRAGUE DAWLEY de un peso comprendido entre 220 a 310 grs.

2. APARATOS.

a) Copa y circuito.

Para baño de órganos se utilizaron copas de Alhin de 145 ml de capacidad, de vidrio con una doble pared, por cuyo interior circulaba agua caliente que se mantenía a una temperatura constante de 36° C en todo su recorrido, por medio de un Ultra Thermostat K5 Colora que actuaba como bomba y termostato a la vez. La copa tenía también un orificio lateral inferior por donde entraba la solución nutritiva y otro en la parte lateral superior por donde rebosaba dicho líquido nutritivo y permitía el lavado de las preparaciones. Este líquido de perfusión antes de llegar a la copa pasaba por un serpentín por el que circulaba el agua caliente del circuito termostático y de este modo las preparaciones no se afectaban por las diferencias de temperatura. Por la parte inferior tenían un tapón con membrana porosa para

la oxigenación de la preparación mediante la mezcla carbógena.

b) Electrodos y sistema de estimulación.

Un electrodo especial en forma de L, servía de soporte de la preparación, así como aplicar estímulos eléctricos indistintamente al nervio frénico o al músculo diafragma. En este último caso, con un electrodo adicional en forma de gancho se insertaba en el músculo diafragma. Mediante un dispositivo de acero inoxidable en forma de pinza, por su parte inferior se sujetaba el músculo diafragma en su porción osteocartilaginosa, mientras que la porción fibrosa era sustentada con un hilo a un transducer fuerza desplazamiento. Por la parte superior de este electrodo eran conectados los correspondientes electrodos, procedentes del estimulador Grass SD-9.

c) Sistema de registro.

El registro de la fuerza contráctil y de la frecuencia de estimulación se realizaba mediante un polígrafo UGO-BASILE de un canal conectado a un transducer UGO-BASILE. El polígrafo permitía un registro de la contracción y del tiempo según la velocidad del papel.

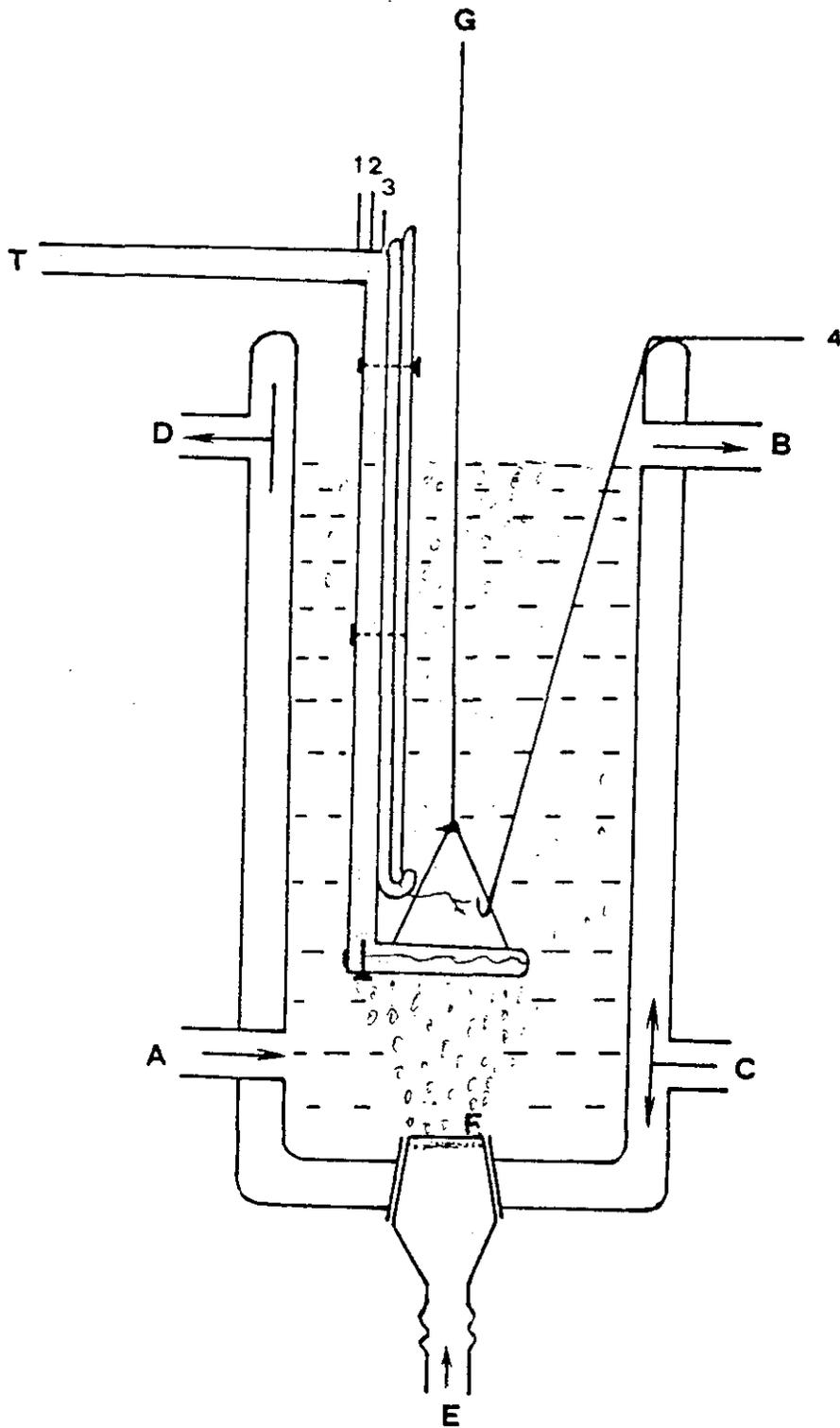


Fig. A-1.- Copa de Allhin y electrodo especial (T) para la preparación frénico-diafragma. El líquido nutritivo entra por la parte inferior (E) regulado por una llave de paso, permitiendo también el lavado del órgano y saliendo por rebosamiento (B). Por la copa de doble pared recircula agua a temperatura prefijada (C y D). La oxigenación se hace a través de una membrana microporosa (F). La preparación se ata a un hilo (G) para el registro contráctil isotónico. De un estimulador salen impulsos bien al nervio (1 y 2), bien al músculo (3 y 4).

3. LIQUIDO NUTRICIO.

Como líquido nutricio se utilizó solución Tyrode, con la siguiente composición expresada en gramos y milimoles por litro respectivamente:

ClNa	8 g/l.	136.0 mM
Cl ₂ Mg. 6 H ₂ O (1ml al 10%)	0.1 g/l.	1.05 mM
ClK	0.2 g/l.	2.7 mM
Cl ₂ Ca (20 ml al 10%)	2 g/l.	1.8 mM
PO ₄ H ₂ Na	0.05 g/l.	0.42 mM
CO ₃ HNa	1 g/l	11.9 mM
Glucosa	2 g/l.	11.0 mM.

Se añadía agua desionizada y bidestilada hasta completar 1.000 ml.

4. OXIGENACION.

Era mediante una mezcla carbógena cuya composición porcentual es la siguiente:

Oxígeno	94.9 %.
Anhidrido carbónico	5.1 %.

La oxigenación se hacía mediante burbujeo continuo de la mezcla carbógena sobre el líquido nutricio, a través de una membrana microporosa, situada en la parte inferior de la copa de ALLHIN.

B) METODO EXPERIMENTAL.-

Se utilizaron ratas de raza Sprague-Dawley, de ambos sexos, de peso entre 220 y 310 gr., a las que tras decapitación y sangrado previo, se procedió a la disección de una porción triangular del músculo diafragma y el nervio frénico correspondiente, según el método de Bulbring (1.946). La preparación se montó en un baño de órganos de 140 ml conteniendo solución Tyrode. Las variaciones de $[K^+]_o$, $[Mg^{++}]_o$ y $[Ca^{++}]_o$ se hicieron sin modificar la $[Na^+]_o$.

La oxigenación se hacía con 95% O_2 y 5% CO_2 manteniendo el líquido nutricio a $36^\circ C$ y pH 7.4. El ajuste de la tensión basal era a 2 gr. y se realizaba por medio de un hilo que se ataba por un lado al vértice del músculo y por otro al transducer Ugo-Basile. Las contracciones isométricas se registraron por medio de un polígrafo Ugo-Basile. Mediante electrodos bipolares de platino se aplicaban estímulos eléctricos rectangulares tanto al nervio frénico como al músculo diafragma. El voltaje en los estímulos indirectos era supramaximal, mientras que en los estímulos directos al diafragma se incrementaba hasta alcanzar la máxima altura de los estímulos indirectos. En ambos casos la frecuencia era 0.16 Hz y duración 0.2 ms. Cada experimento se dejaba estabilizar unos 30 min., antes del comienzo de la adicción al baño de uno o más fármacos, cuyo efecto máximo servía para obtener las curvas concentración acumulativas-respuestas, en las que cada punto representaba la media \pm e.s.m. de al menos 6 experimentos.

La valoración de la acción de cada fármaco era cuando

alcanzaba el efecto máximo añadido al líquido nutritivo, excepto en el bloqueo neuromuscular competitivo ya que la transmisión neuromuscular era parcialmente bloqueada por la adición al líquido nutritivo de 8 μM de atracurio y la depresión contráctil cuando alcanzaba los 15 min. se procedía a poner los fármacos anticuráricos.

La latencia de un fármaco era el tiempo desde su adicción al baño y el comienzo de su acción contráctil. En esta preparación no fue posible hacer una curva con dosis acumulativas de neostigmina hasta obtener un efecto máximo, ya que cuando había respuesta con dosis mínimas esta era máxima. Las contracciones inducidas por los fármacos eran expresadas como porcentaje de la respuesta basal o control, sin fármacos en la misma preparación. En la curva-dosis respuesta, la concentración que producía un efecto del 50 % del efecto máximo (E_{max}) era la CE_{50} , mientras que la concentración que causaba el 50 % del decremento máximo era la CI_{50} . Todos los resultados de esta tesis están expuestos como la media \pm e.s.m. Cada preparación era expuesta una sola vez al test de los fármacos. Las concentraciones de los fármacos eran expresadas como concentración molar final en baño.

Los estímulos del tren de a cuatro "train of four" (TOF) eran conducidos a una frecuencia de 2 Hz, duración del tren 2 sec. (0.5 sec. entre cada estímulo) y repetidos cada 10 sec. En el tétanos la frecuencia de estimulación era de 50 Hz durante 5 sec. La potenciación posttética (PTT) era también estudiada en algunos protocolos. El valor del % de potenciación posttética (% PTP) se hacía con la fórmula: $\% \text{ PTP} = (\text{PTT} \times 100) / T - 100$

donde T era el valor de la contracción por estímulo indirecto.

C) FARMACOS EMPLEADOS.-

Los fármacos empleados fueron:

Ranitidina (Glaxo),

Atracurium besilate (Wellcome),

Neostigmine metilsulfonate (prostigmine, Roche).

Captopril (Squibb).

Verapamil (Knoll).

Diltiazem (Parke-Davis).

Las soluciones de estos fármacos eran preparadas inmediatamente antes de su uso en agua desionizada y las diluciones en solución Tyrode.

D) ANALISIS ESTADISTICO.-

Se usó el test de la t de Student para probar el significado estadístico entre la altura contráctil en el control estable y los efectos máximos resultantes tras cada fármaco. Las diferencias entre medias eran consideradas significativas para valores de P menores de 0.05 y datos no apareados.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

1) EFECTO DE LOS CAMBIOS IÓNICOS SOBRE LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA EN LA PREPARACIÓN FRÉNICO-DIAFRAGMA DE RATA.-

1.1) Acción contráctil de ranitidina en solución Tyrode normal.-

La acción de ranitidina en un rango de concentración entre 20 μM - 1 mM sobre la contracción diafragmática en solución Tyrode normal se muestran en fig. C-1. El comienzo de la acción contráctil era con dosis 20 μM , alcanzando una altura contráctil máxima con dosis 1 mM, de 270.0 ± 12.6 % con estímulo indirecto y de 257.5 ± 11.6 % con estímulo directo. Cada dosis tenía un efecto instantáneo y altura máxima en unos 10 min. La concentración de ranitidina que causaba el 50 por ciento del efecto máximo en cada CDR era la CE_{50} (tabla C-I). También en esta tabla se representa la concentración que causaba el efecto máximo (Emax.). En la tabla C-II se muestra el % de la altura contráctil basal -sin fármacos- en solución Tyrode con variaciones iónicas, comparativamente con la altura contráctil basal (valor 100.0) en solución Tyrode normal.

T a b l a C-I

Análisis comparativo de la CE_{50} y E_{max} en la curva dosis-respuesta de ranitidina variando los iones del medio nutricio, en preparaciones frénico-diafragma de rata directa (SD) e indirectamente (SI) estimuladas.

Solución Tyrode	SI		SD	
	CE_{50} ($\times 10^{-5}M$)	E_{max} (M)	CE_{50} ($\times 10^{-5}M$)	E_{max} (M)
Normal	2.4±0.3	10^{-3}	3.2±0.4	10^{-3}
K+ 5.4 mM	4.8±0.2	10^{-3}	5.0±0.3	10^{-3}
K+ 8.1 mM	1.2±0.1	4×10^{-5}	1.6±0.1	4×10^{-5}
Mg++ 0 mM	3.2±0.4	10^{-3}	3.0±0.3	10^{-3}
Mg++ 6 mM	5.5±0.3	10^{-3}	4.5±0.2	10^{-3}
Mg++ 12 mM	5.9±0.3	10^{-3}	5.8±0.2	10^{-3}
Ca++0.45 mM	3.5±0.5	8×10^{-5}	3.4±0.3	8×10^{-5}
Ca++0.90 mM	5.1±0.4	10^{-4}	5.1±0.3	10^{-4}
Ca++3.6 mM	4.0±0.1	10^{-3}	4.0±0.2	10^{-3}
Ca++0.6mM-Mg++6mM	75.0±0.1 ^a	10^{-3}	63.0±0.1 ^a	10^{-3}

^a concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). Todos los valores eran la media ± e.s.m. de 6 experimentos. Nótese el paralelismo de la altura contráctil en la curva dosis-respuesta de ranitidina a los estímulos indirecto y directo.

1.2) Efecto del K+ sobre la acción contráctil de ranitidina.

En líquido nutricio Tyrode con doble concentración de K+ (5,4 mM) la curva dosis respuesta a ranitidina (20 μM - 1 mM) se desplazaba hacia abajo y a la derecha, obteniendo una altura contráctil máxima de 204.5±14.3 por ciento del control ($p < 0.05$) con estímulo indirecto y de 199.7±15.1 por ciento del control ($p < 0.05$) con estímulo directo (fig. C-1). El efecto máximo de cada dosis era en unos 4.1 min. Con Tyrode triple concentración de K+ (8.1 mM), la CDR de ranitidina (20 μM - 1 mM) perdía la acción de incremento contráctil y se aplanaba. Solo había un ligero incremento contráctil con 20 μM y 40 μM de ranitidina. La menor altura contráctil era con dosis 10^{-3} M de ranitidina, de

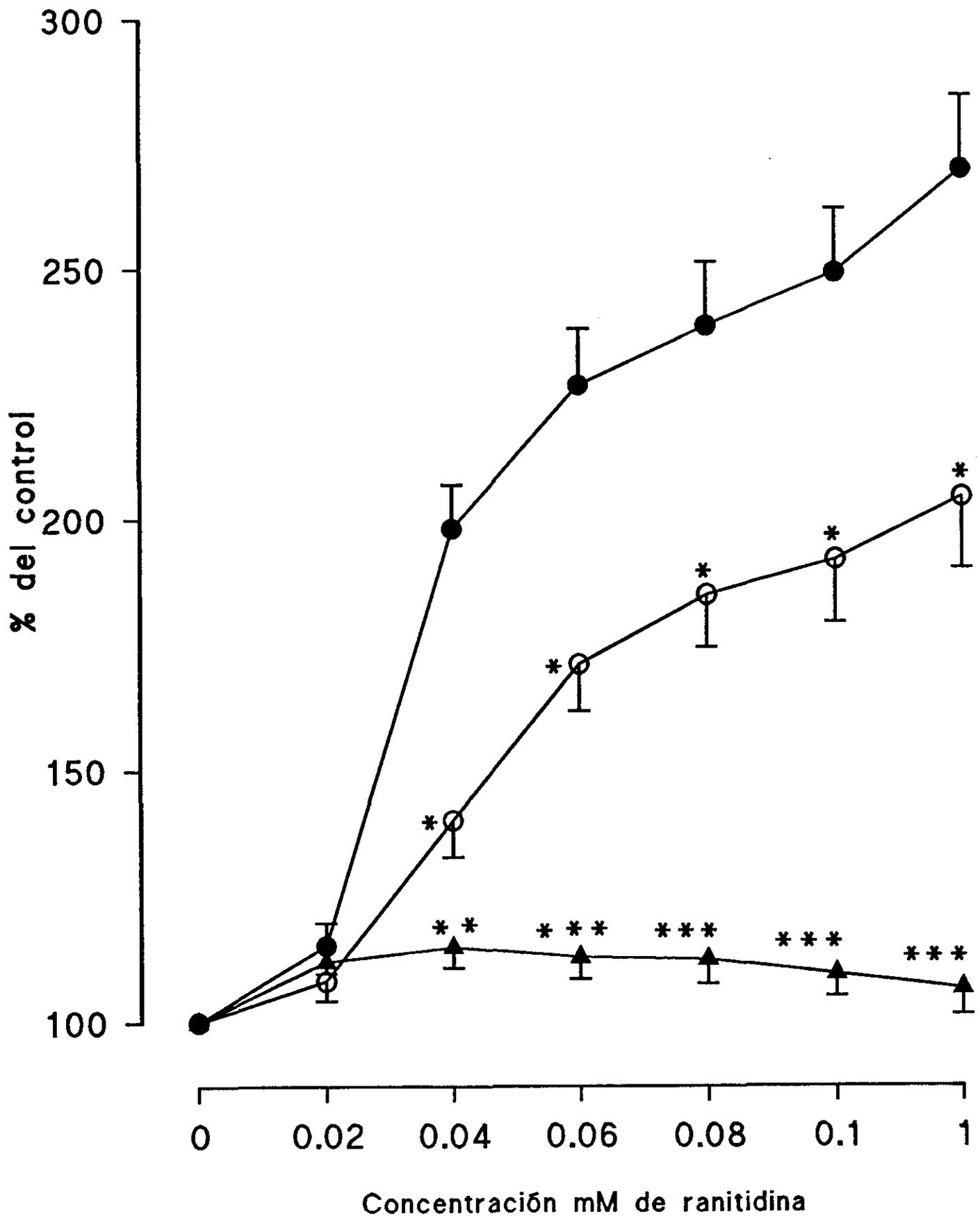


Fig. C-1.-Acción contráctil de ranitidina en preparaciones frénico-diafragma de rata indirectamente estimulados con Tyrode normal (●) e hiperpotásico, K⁺ 5.4 mM (○) y K⁺ 8.1 mM (▲). Cada punto era la media de 6 experimentos ± e.s.m. Diferencias significativas del control *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

106.5±7.4% del control (p<0.001) estimulando el nervio frénico (fig. C-1) y de 108.1±9.1 % del control (p<0.001) estimulando el músculo diafragma. La altura máxima con cada dosis se obtenía en 2.5 min. aprox. CE₅₀ y Emax disminuían con el incremento de la concentración de K+ de 5.4 mM a 8.1 mM (tabla C-I), sin embargo la altura contráctil control en medio hiperpotásico comparado con las variaciones de calcio y magnesio, era mayor tanto al estímulo indirecto como directo (tabla C-II). En la fig. C-2 se muestra la altura contráctil de ranitidina con las variaciones del potasio extracelular.

Tabla C-II

% de altura contráctil control y después del efecto máximo de ranitidina (20 µM - 1 mM) según la variación iónica del medio, en hemidiafragmas de rata y estimulando el nervio frénico (SI) o el diafragma (SD).

Solución nutricia Tyrode	SI		SD	
	% Altura control	Emax	% Altura control	Emax
Normal	100.0	100.0	100.0	100.0
K+ 5.4 mM	152.7	75.7	143.8	77.5
K+ 8.1 mM	145.5	39.4	152.4	41.9
Mg++ 0 mM	116.0	83.7	114.8	84.3
Mg++ 6 mM	115.6	74.4	116.9	75.5
Mg++ 12 mM	103.7	62.1	107.8	61.1
Ca++ 0.45 mM	127.8	56.1	130.9	57.5
Ca++ 0.90 mM	104.2	77.0	107.0	77.3
Ca++ 3.6 mM	105.4	92.0	105.7	93.0
Ca++0.6mM-Mg++6mM	87.3	-60.4	93.8	-59.6

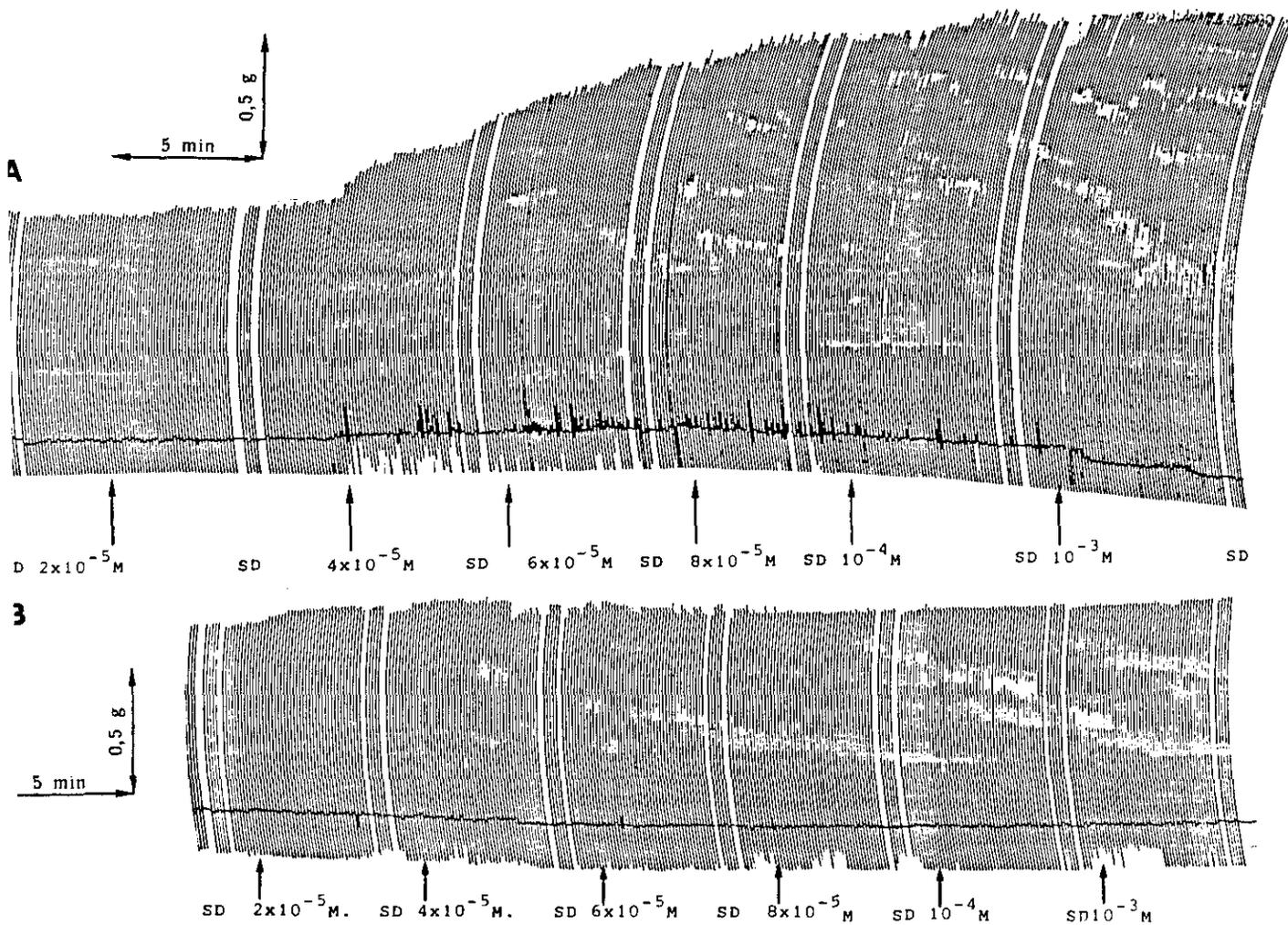


Fig. C-2.- Altura contráctil de ranitidina en la preparación frénico-diafragma de rata directa (SD) e indirectamente estimulada en solución Tyrode hiperpotásico: 5.4 mM (A) y 8.1 mM (B).

1.3) Efecto del Ca⁺⁺ en las respuestas contráctiles de ranitidina.

En solución Tyrode con 3.6 mM de Ca⁺⁺ ranitidina en el rango 20 μ M - 1 mM, tenía un incremento contráctil máximo con dosis 1 mM, que era de 248.6 \pm 15.1 % y 239.6 \pm 12.4 % del control con estímulos indirecto y directo respectivamente y el efecto máximo de cada dosis era después de 5 min. aproximadamente. Cuando la concentración de Ca⁺⁺ se reducía a 0.9 mM había un desplazamiento a la derecha y abajo de la CDR de ranitidina (fig. C-3) y la acción contráctil se producía después de 5 min. con cada dosis y era máxima con 100 μ M de ranitidina de 207.9 \pm 11.9 % del control con estímulo indirecto y de 199.2 \pm 12.3 % del control con estímulo directo, ya que con dosis 1 mM de ranitidina disminuía la altura contráctil. Con Ca⁺⁺ 0.45 mM se producía un mayor desplazamiento de la CDR de ranitidina a la derecha y abajo con una altura contráctil máxima de cada dosis de ranitidina que se alcanzaba en unos 3.2 min. La mayor contracción era de 151.5 \pm 11.8 % del control (p<0.05) y 148.2 \pm 9.7 % del control (p<0.01) respectivamente con estímulos indirecto y directo con dosis 80 μ M, ya que dosis superiores de ranitidina causaban una acción depresora contráctil (fig. C-4). La CE₅₀ se deprimía proporcionalmente en el rango de variación del [Ca⁺⁺]_o de 3.6 mM a 0.45 mM e igual curso seguía la E_{max}. (Tabla C-I). En la fig. C-3 también se muestra la acción depresora contráctil adicional con la disminución del Ca⁺⁺ y la elevación del Mg⁺⁺ en el medio

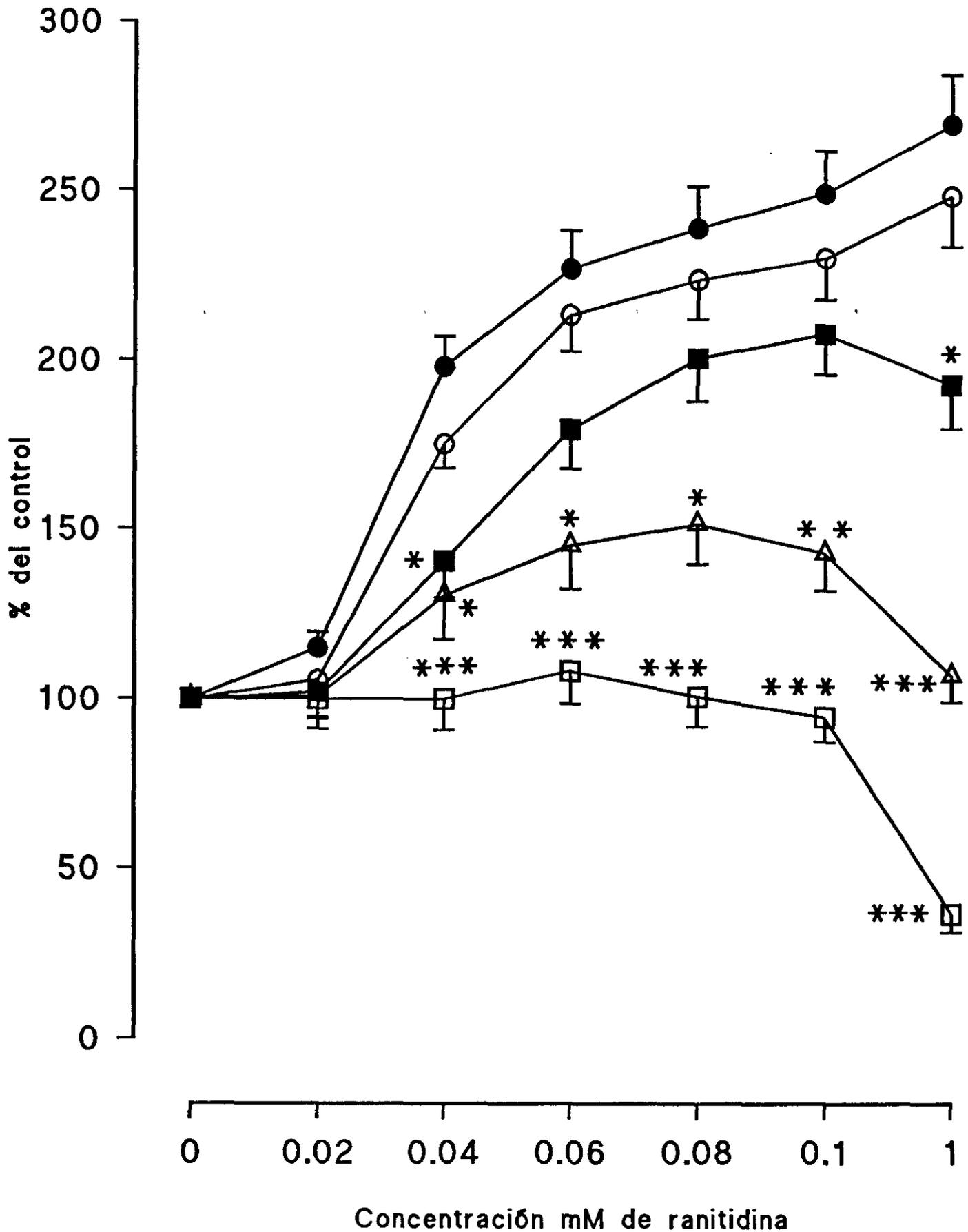


Fig. C-3.- Acción contráctil de ranitidina en Tyrode normal (●) y con variaciones iónicas: Ca⁺⁺ 3.6 mM (○), Ca⁺⁺ 0.9 mM (■), Ca⁺⁺ 0.45 mM (△) y Ca⁺⁺ 0.6 mM-Mg⁺⁺ 6 mM (□) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Cada punto era la media ± e.s.m. de 6 experimentos. Diferencias significativas del control *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

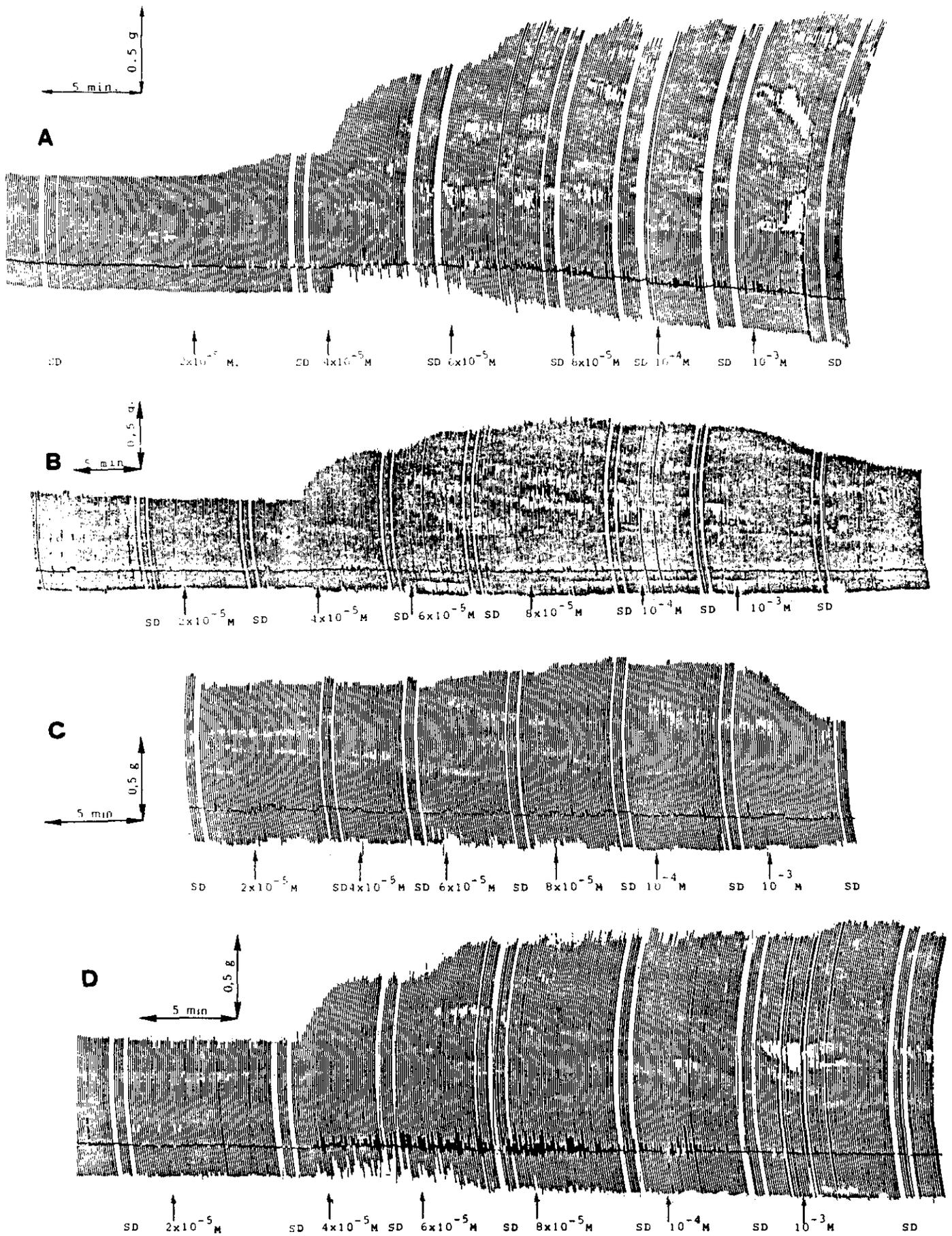


Fig. C-4.- Ejemplo de curva dosis-respuesta de ranitidina en la preparación frénico-diafragma de rata directa (SD) e indirectamente estimulada en solución Tyrode normal (A), Ca^{++} 0.9 mM (B), Ca^{++} 0.45 mM (C) y Ca^{++} 3.6 mM (D).

(0.6 mM de Ca⁺⁺ y 6 mM de Mg⁺⁺). En estas circunstancias ranitidina en el rango 20 μ M - 80 μ M carecía de acción contráctil, y con dosis mayores disminuía la contracción, que era máxima con 10⁻³ M, de 36.7 \pm 5.7 % del control (p<0.001) con estímulo indirecto y 46.2 \pm 6.3 % del control (p<0.001) con estímulo directo a los 10 min. de su adicción al líquido nutricio. La CI50 era de 75.0 \pm 0.1x10⁻⁵ M con estímulo indirecto y de 63.0 \pm 0.1x10⁻⁵ M con estímulo directo (tabla C-I). La altura contráctil basal también disminuía tanto al estímulo directo como indirecto (tabla C-II) por el déficit de calcio necesario para la contracción.

1.4) Acción contráctil de ranitidina con variaciones de Mg⁺⁺ en el líquido nutricio.

La acción contráctil de ranitidina disminuía con el incremento de la concentración extracelular de Mg⁺⁺. La curva dosis-respuesta de ranitidina (20 μ M - 1 mM) en solución Tyrode 0 mM de Mg⁺⁺ causaba un ligero desplazamiento a la derecha y abajo, con un efecto máximo con dosis 1 mM de 226.2 \pm 10.9% al estímulo indirecto y de 217.2 \pm 12.3 % al estímulo directo. Similar y mayor desplazamiento de la CDR de ranitidina se producía con Tyrode 6 mM de Mg⁺⁺ con un incremento contractil máximo con dosis 1 mM de 201.1 \pm 14.5 % del control (p<0.05) con estímulo indirecto y de 194.5 \pm 11.9 % del control con estímulo directo. Un ulterior desplazamiento de la CDR a la derecha y abajo se producía con 12 mM de Mg⁺⁺ (fig. C-5), alcanzando una altura

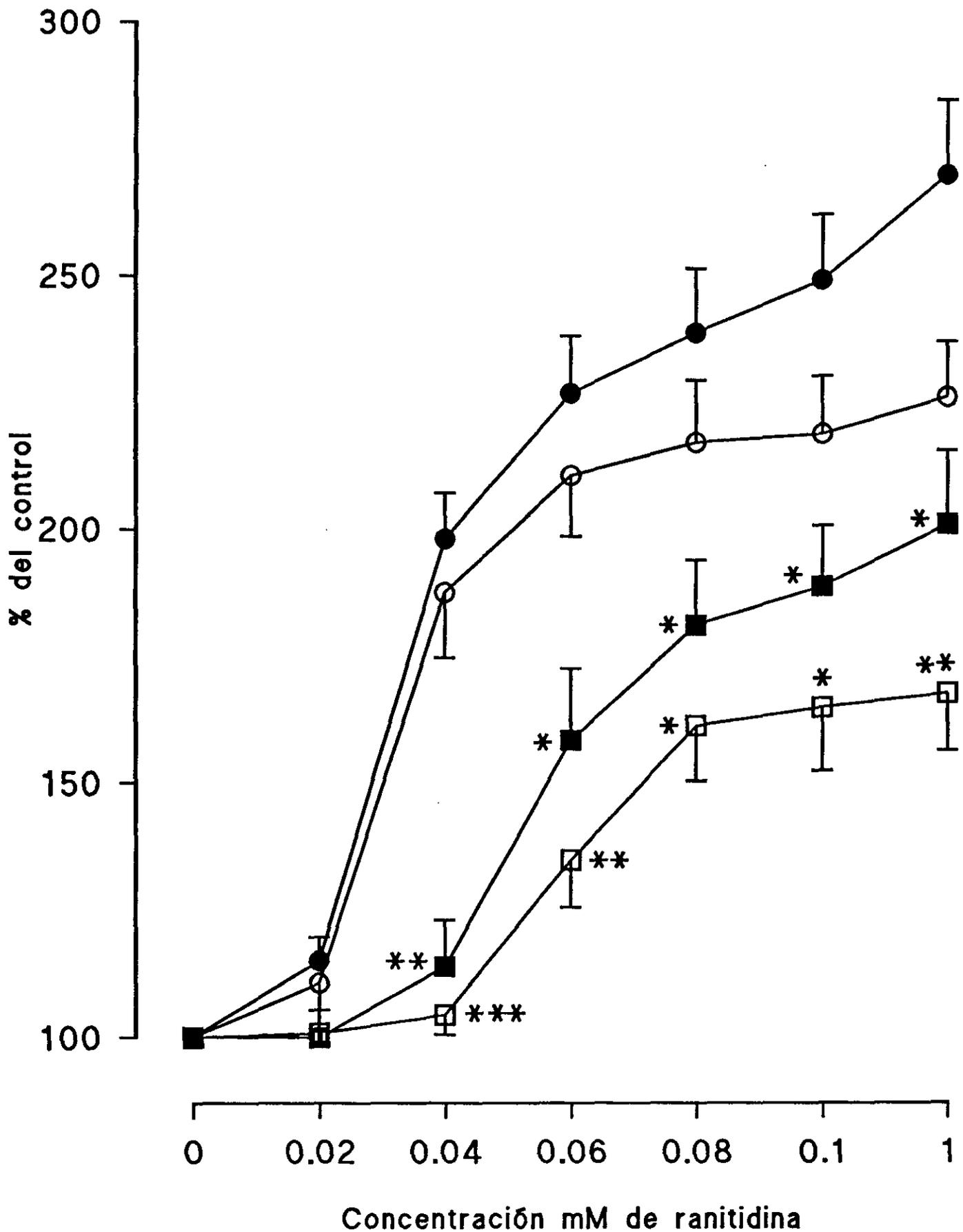


Fig. C-5.- Acción contráctil de ranitidina en Tyrode normal (●), Mg⁺⁺ 0 mM (○), Mg⁺⁺ 6 mM (■) y Mg⁺⁺ 12 mM (□) en la preparación frénico-diafragma de rata indirectamente estimulada. Cada punto era la media ± e.s.m. de 6 experimentos. Diferencias significativas del control *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

contráctil máxima también con 1 mM de ranitidina, que era de 167.8 ± 11.4 % del control ($p < 0.01$) al estímulo del nervio frénico y de 157.4 ± 11.7 % del control ($p < 0.01$) al estímulo del diafragma. El efecto máximo de cada dosis era obtenido después de 6.6 min., 5.8 min., y 5 min. respectivamente con Mg^{++} 0 mM, 6 mM y 12 mM. La CE_{50} y E_{max} eran de este orden 0 mM $Mg < 6$ mM $Mg < 12$ mM Mg con ambos tipos de estímulo (tabla C-I) e igual evolución tenía la altura contráctil control (tabla C-II).

2) EFECTO DE LOS FÁRMACOS CALCIO-ANTAGONISTAS SOBRE LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA EN HEMIDIAFRAGMAS DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADOS.-

2.1) Efecto de diltiazem sobre la acción contráctil de ranitidina en líquido nutricio Tyrode normal.-

En la preparación frénico-diafragma de rata indirectamente estimulada con solución Tyrode, la curva dosis respuesta de ranitidina $20 \mu\text{M}$ - 1 mM era desplazada hacia abajo y a la derecha por diltiazem de forma dosis-dependiente, cuando se añadía previamente al medio nutricio. La altura contráctil máxima de cada dosis de ranitidina era alcanzada en unos 3.3 min. Con 10^{-6} M de diltiazem había un menor incremento contráctil dosis-dependiente de ranitidina hasta alcanzar una altura contráctil máxima de 211.3 ± 17.0 % del control ($p < 0.05$) con dosis de ranitidina 1 mM ; Mayores dosis de diltiazem como 10^{-5} M también producían un menor incremento contráctil dosis dependiente de ranitidina y la altura máxima era de 167.3 ± 11.8 % del control ($P < 0.01$) con dosis de $80 \mu\text{M}$ de ranitidina, mientras que dosis superiores disminuían algo la contracción. Cuando se añadía previamente diltiazem 10^{-4} M al líquido nutricio la CDR de ranitidina se desplazaba a la izquierda con dosis $20 \mu\text{M}$ de ranitidina y después un gran desplazamiento hacia la derecha y abajo. El incremento contráctil máximo era con dosis $60 \mu\text{M}$ de ranitidina, de 142.5 ± 11.2 % del control ($p < 0.001$). Con ranitidina $20 \mu\text{M}$ había un rápido, precoz y máximo incremento contráctil de 134.4 ± 9.1 % del control. Dosis superiores de ranitidina eran

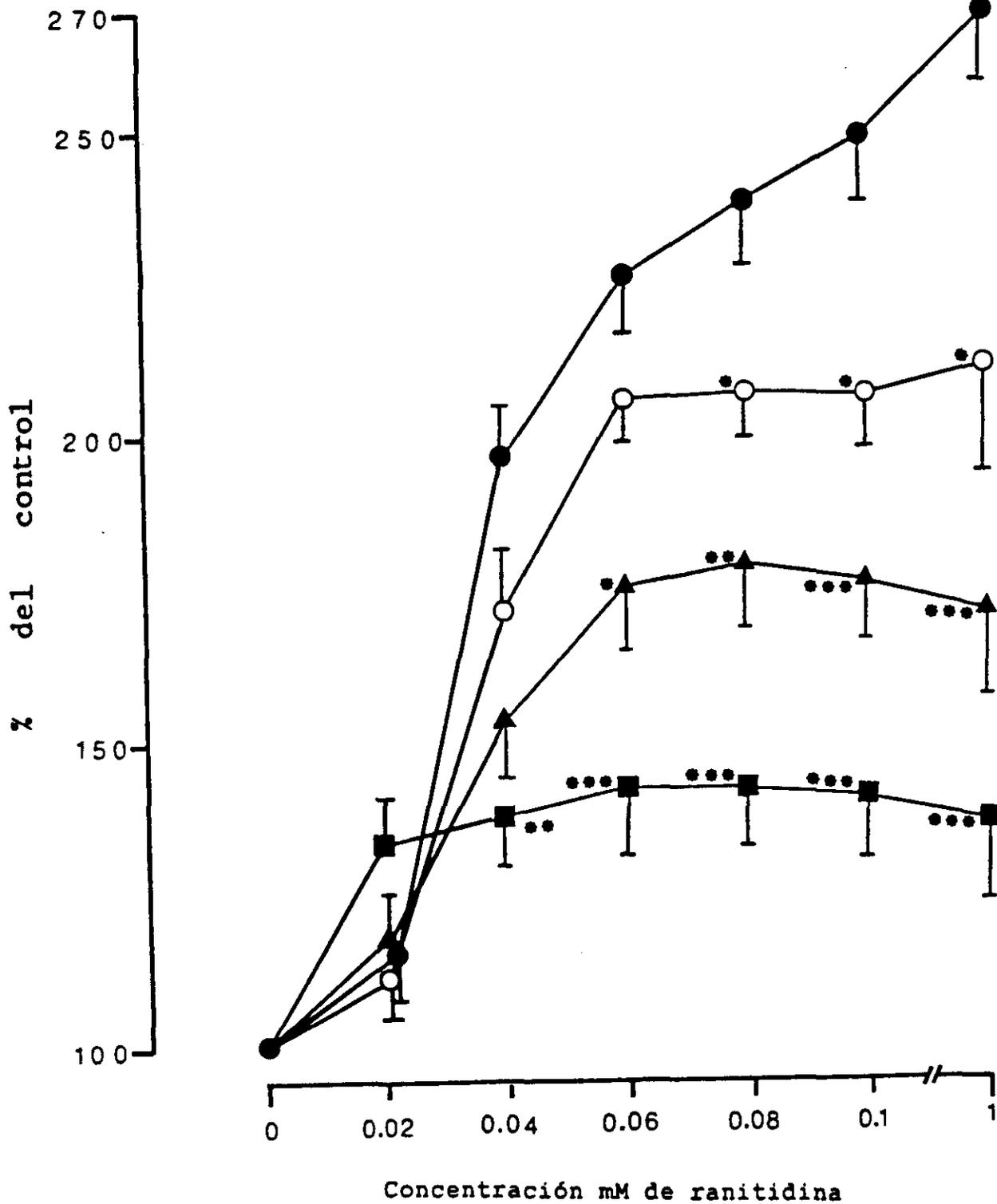


Fig. D-1.- Acción contráctil de ranitidina sola (●) en Tyrode normal y después de diltiazem 1 μ M (○), 10 μ M (▲) y 100 μ M (■) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Cada punto era la media de 6 experimentos \pm e.s.m. Diferencias significativas del control: * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

depresoras de la contracción. El incremento contractil máximo de cada dosis de ranitidina era a los 6.3 min., 5.4 min. y 4 min. respectivamente con diltiazem 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M. En la figura D-1 se resumen los efectos de la adicción de diltiazem previo a la CDR de ranitidina.

En las relaciones del TOF de la CDR de ranitidina ($20 \mu\text{M}$ - 1 mM) también se producían modificaciones cuando se adicionaba al baño nutritivo precedido de diltiazem. En la tabla D-I se muestran los índices del TOF de ranitidina sola y en la tabla D-II los mismos índices modificados por la adicción previa al líquido nutritivo de diltiazem 10^{-6} M. Con esta dosis había una disminución proporcional de la altura de los cuatro estímulos

Tabla D-I

Índices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina ($20 \mu\text{M}$ - 1 mM) en solución Tyrode en hemidiafragmas de rata. T1-T2-T3-T4 son valores del TOF sin fármacos y T'1-T'2-T'3-T'4 con fármacos.

Relación	Ranitidina					
	$20 \mu\text{M}$	$40 \mu\text{M}$	$60 \mu\text{M}$	$80 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$	1 mM
Control T4/T1=1.00						
T'1/T1	1.08	1.17	1.52	1.65	1.65	1.79
T'2/T1	1.08	1.10	1.34	1.42	1.52	1.52
T'3/T1	1.08	1.08	1.27	1.36	1.42	1.41
T'4/T1	1.08	1.08	1.25	1.33	1.44	1.39
T'2/T'1	1.00	0.94	0.88	0.86	0.92	0.84
T'3/T'2	1.00	0.97	0.94	0.95	0.96	0.93
T'4/T'1	1.00	0.91	0.82	0.80	0.87	0.77
T'4/T'3	1.00	0.99	0.98	0.98	0.98	0.98

acoplados, las relaciones T'/T estaban incrementadas comparativamente con ranitidina sola, excepto con dosis $20 \mu\text{M}$ y

1 mM que estaban disminuidas, mientras que las relaciones T'/T' eran de igual valor o disminuían ligeramente.

Tabla D-II

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μ M-1 mM) después de diltiazem 1 μ M con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Diltiazem			Ranitidina			
	1 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	1 mM
control T4/T1=1.00							
T'1/T1	0.96	1.03	1.83	2.20	1.86	1.96	1.80
T'2/T1	0.96	0.98	1.80	2.00	1.73	1.80	1.43
T'3/T1	0.96	0.98	1.70	1.80	1.63	1.63	1.33
T'4/T1	0.96	0.96	1.70	1.53	1.58	1.58	1.30
T'2/T'1	1.00	0.95	0.98	0.90	0.92	0.91	0.79
T'3/T'2	1.00	1.00	0.94	0.90	0.94	0.90	0.93
T'4/T'1	1.00	0.93	0.92	0.69	0.84	0.77	0.72
T'4/T'3	1.00	0.98	1.00	0.85	0.96	0.93	0.97

Símbolos como en tabla D-I.

Los trenes de cuatro impulsos acoplados durante 2 s y 2 Hz al músculo diafragma también se acompañaba de cambios con diltiazem 10^{-5} M previo a la CDR de ranitidina, según se muestra en la tabla D-III. La altura contráctil del TOF era inferior con relación a 10^{-6} de diltiazem-CDR de ranitidina. Las relaciones T'/T' estaban todas incrementadas, en cambio, las relaciones T'/T' tenían una pequeña disminución con dosis 20 μ M, 100 μ M y 1 mM y por el contrario, aumento con 40 μ M, 60 μ M y 80 μ M de ranitidina, comparadas con ranitidina sola.

Tabla D-III

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM -1 mM) después de diltiazem 10 μM con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Diltiazem			Ranitidina			
	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM
control							
T ₄ /T ₁ =1.00							
T' ₁ /T ₁	1.03	1.18	1.70	2.01	2.06	1.99	2.07
T' ₂ /T ₁	1.03	1.17	1.59	1.80	1.74	1.69	1.80
T' ₃ /T ₁	1.03	1.15	1.50	1.71	1.67	1.64	1.68
T' ₄ /T ₁	1.03	1.09	1.45	1.66	1.64	1.58	1.61
T' ₂ /T' ₁	1.00	0.98	0.93	0.89	0.84	0.85	0.86
T' ₃ /T' ₂	1.00	0.98	0.88	0.95	0.96	0.96	0.93
T' ₄ /T' ₁	1.00	0.92	0.85	0.82	0.79	0.79	0.77
T' ₄ /T' ₃	1.00	0.95	0.96	0.97	0.98	0.96	0.95

Símbolos como en tabla D-I.

Con diltiazem 10^{-4} M previo a la CDR de ranitidina causaba sobre el TOF en primer lugar un decremento de altura contráctil y en segundo lugar un menor gradiente contractil entre los cuatro estímulos acoplados (tabla D-IV), que se traducía comparados con ranitidina sola en: a) incremento del valor de las relaciones T'/T con dosis bajas de ranitidina (20 μM , 40 μM y 60 μM) mientras que había decremento con dosis mayores (80 μM , 100 μM y 1 mM) y b) incremento y aproximación al valor de la unidad entre las relaciones T'/T'.

Tabla D-IV

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μ M-1 mM) después de diltiazem 100 μ M con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Diltiazem		Ranitidina				
	100 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	1 mM
control							
T4/T1=1.00							
T'1/T1	1.15	1.34	1.35	1.37	1.40	1.39	1.34
T'2/T1	1.15	1.34	1.35	1.37	1.35	1.34	1.31
T'3/T1	1.14	1.34	1.35	1.37	1.36	1.29	1.30
T'4/T1	1.14	1.34	1.35	1.37	1.34	1.30	1.31
T'2/T'1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	0.96	0.98
T'3/T'2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	0.99
T'4/T'1	0.99	0.99	1.00	1.00	0.96	0.93	0.97
T'4/T'3	0.99	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00

Símbolos como en tabla D-I.

2.2) Efecto de verapamil sobre la acción contráctil de ranitidina en solución Tyrode normal.-

Cuando se añadía verapamil 1 μ M, 10 μ M ó 100 μ M en el líquido nutricio Tyrode normal antes de la CDR de ranitidina, había un desplazamiento de esta hacia la derecha y hacia abajo dosis-dependiente de verapamil según se muestra en la fig. D-2. El efecto máximo de cada dosis de ranitidina era alcanzado en unos 4-5 min. Con dosis de 10⁻⁶ M de verapamil había un incremento contráctil dosis-dependiente de la CDR de ranitidina alcanzando

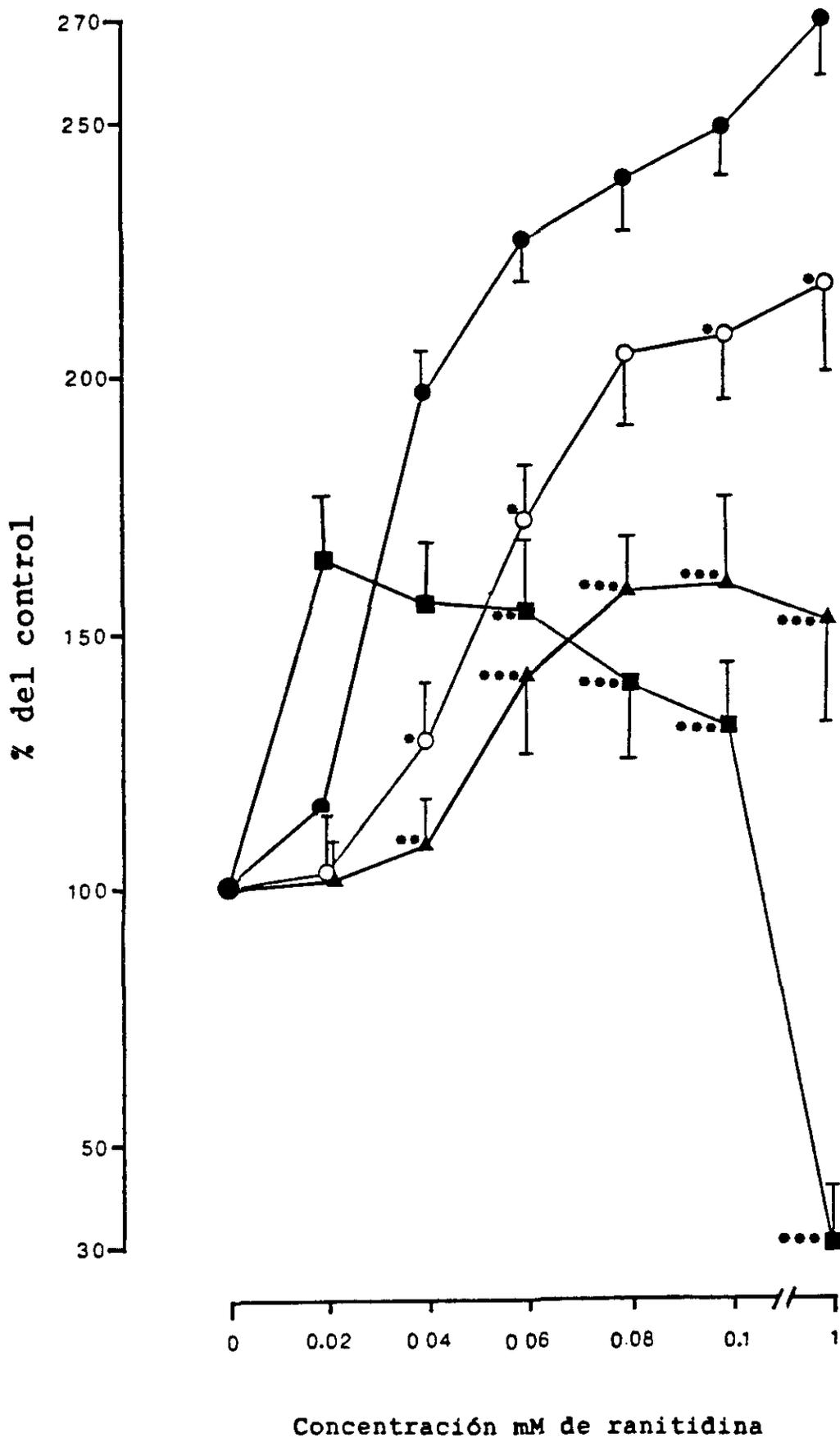


Fig. D-2.- Acción contráctil de ranitidina sola (●) en Tyrode normal y después de verapamil 1 μ M (○), 10 μ M (▲) y 100 μ M (■) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Cada punto era la media de 6 experimentos \pm e.s.m. Diferencias significativas del control: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

una altura máxima de 217.5 ± 17.1 % del control ($p < 0.05$) con ranitidina 1 mM. Con cada dosis se obtenía el efecto máximo en unos 5.2 min. Mayores dosis de verapamil como 10^{-5} M causaban mayor disminución de la respuesta contractil por ranitidina y el incremento contráctil máximo era con dosis 100 μ M de ranitidina era de 158.4 ± 18.2 % del control ($p < 0.01$), ya que con dosis 1 mM de ranitidina había una pequeña disminución de la altura contráctil. El efecto de cada dosis se obtenía a los 4 min aprox. Cuando se utilizaban dosis altas de verapamil como 10^{-4} M la respuesta contráctil del músculo diafragma a ranitidina (20 μ M-1 mM) era diferente; en primer lugar había un rápido y elevado incremento contráctil que era de 164.0 ± 12.9 % del control con dosis 20 μ M de ranitidina y en segundo lugar, dosis mayores causaban decremento contráctil que era máximo con 1 mM de ranitidina, de 30.4 ± 11.9 % ($P < 0.001$) del control a los 12 min. La contracción desaparecía a los 30 min. aprox. después de la adicción al líquido nutricional de 10^{-4} M de verapamil.

Los TOF de ranitidina sola eran modificados con la presencia previa de verapamil 1 μ M en el líquido nutricional. Había disminución de las relaciones T'/T con dosis de ranitidina 20 μ M y aumentaba con dosis acumulativas superiores, por otra parte, descendían o no variaban las relaciones T'/T' del TOF de verapamil 10^{-6} seguido de la CDR de ranitidina, según se muestra en la tabla D-V.

Tabla D-V

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM -1 mM) después de verapamil 1 μM con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Verapamil		Ranitidina					
	1 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM	
control								
T4/T1=1.00								
T'1/T1	1.02	1.02	1.29	1.75	2.04	2.04	2.04	
T'2/T1	1.02	1.02	1.15	1.50	1.84	1.85	1.69	
T'3/T1	1.02	1.02	1.12	1.34	1.74	1.73	1.51	
T'4/T1	1.02	1.02	1.02	1.30	1.71	1.72	1.45	
T'2/T'1	1.00	1.00	0.89	0.85	0.90	0.90	0.83	
T'3/T'2	1.00	1.00	0.99	0.89	0.93	0.93	0.89	
T'4/T'1	1.00	1.00	0.79	0.74	0.84	0.84	0.71	
T'4/T'3	1.00	1.00	0.91	0.96	0.99	0.99	0.96	

Símbolos como en tabla D-I.

El efecto de la administración al baño nutritivo de verapamil 10^{-5} M previo a la CDR de ranitidina también causaba disminución de altura contractil de los valores del TOF de forma dosis-dependiente. El decremento era mayor que con 10^{-6} de verapamil. Disminuían los valores de las relaciones T'/T (tabla D-VI) y las relaciones T'/T' del TOF de ranitidina 20 μM - 1 mM después de verapamil 10^{-5} M tenían descenso o no variaban en relación con ranitidina sola.

Tabla D-VI

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM -1 mM) después de verapamil 10 μM con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Verapamil		Ranitidina					
	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM	
control								
T4/T1=1.00								
T'1/T1	0.99	0.99	1.08	1.38	1.57	1.56	1.52	
T'2/T1	0.99	0.99	1.02	1.09	1.30	1.36	1.36	
T'3/T1	0.99	0.99	1.02	1.06	1.16	1.24	1.25	
T'4/T1	0.99	0.99	1.02	1.05	1.12	1.18	1.19	
T'2/T'1	1.00	1.00	0.94	0.79	0.83	0.87	0.89	
T'3/T'2	1.00	1.00	1.00	0.96	0.89	0.91	0.91	
T'4/T'1	1.00	1.00	0.93	0.76	0.71	0.76	0.78	
T'4/T'3	1.00	1.00	0.99	0.99	0.96	0.95	0.95	

Símbolos como en tabla D-I.

En las respuestas a los cuatro estímulos del tren de a cuatro de 2 Hz durante 2 s. producidos cuando se utilizaba verapamil 10^{-4} previo a ranitidina 20 μM - 1 mM en relación con ranitidina sola había disminución de la altura contráctil y menor gradiente, por ello las relaciones T'/T' eran próximas a la unidad (tabla D-VII) y había un descenso muy significativo en las relaciones T'/T con dosis de ranitidina 80 μM , 100 μM y 1 mM, teniendo un comportamiento similar a diltiazem con igual dosis.

Tabla D-VII

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μ M-1 mM) después de verapamil 100 μ M con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Verapamil		Ranitidina				
	100 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	1 mM
control							
T4/T1=1.00							
T'1/T1	1.55	1.57	1.53	1.42	1.38	1.32	0.16
T'2/T1	1.58	1.60	1.53	1.39	1.30	1.13	0.00
T'3/T1	1.61	1.63	1.48	1.36	1.22	0.86	0.00
T'4/T1	1.63	1.62	1.52	1.37	1.26	0.82	0.00
T'2/T'1	1.02	1.02	1.00	0.98	0.94	0.85	0.00
T'3/T'2	1.01	1.01	0.96	0.97	0.93	0.75	0.00
T'4/T'1	1.05	1.03	0.99	0.96	0.91	0.62	0.00
T'4/T'3	1.01	0.99	1.02	1.00	1.03	0.95	0.00

Símbolos como en tabla D-I.

3) EFECTO DE CAPTOPRIL SOBRE LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA EN EL MÚSCULO DIAFRAGMA DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADO.-

3.1) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) en la preparación frénico-diafragma de rata con solución Tyrode normal.

Cuando se estudiaba la acción de ranitidina en el rango 20 μ M- 1 mM en preparaciones frénico-diafragma de rata aplicando estímulos indirectos para obtener contracción simple, TOF y tétanos había un incremento contráctil dosis-dependiente, según se muestra en la fig. E-1. La máxima altura contráctil era con dosis 1 mM de 179.8 ± 15.4 % del control ($p < 0.01$). La contracción máxima de cada dosis se alcanzaba en alrededor de 3.3 min. Con 40 μ M de ranitidina había dificultad de relajación después de cada contracción durante 10 min. en 3 exptos. ($n=6$) y la fasciculación comenzaba con 40 μ M, era máxima entre 40 μ M y 60 μ M y se anulaba con 1 mM. En la tabla E-I se resumen los valores de la contracción, tétanos, altura contráctil postetánica -en relación al valor control y sin fármacos- expresado porcentualmente. Es de resaltar que en el protocolo de estudio de la curva dosis-respuesta de ranitidina que no incluía el tétanos el incremento contráctil máximo de cada dosis era mayor.

Aunque el tétanos presentaba una pequeña disminución dosis-dependiente, era muy significativa ya que el tétanos tenía pocas variaciones con cada dosis, alcanzando una altura contráctil de 77.2 ± 6.1 % del control ($P < 0.001$) con ranitidina 1 mM.

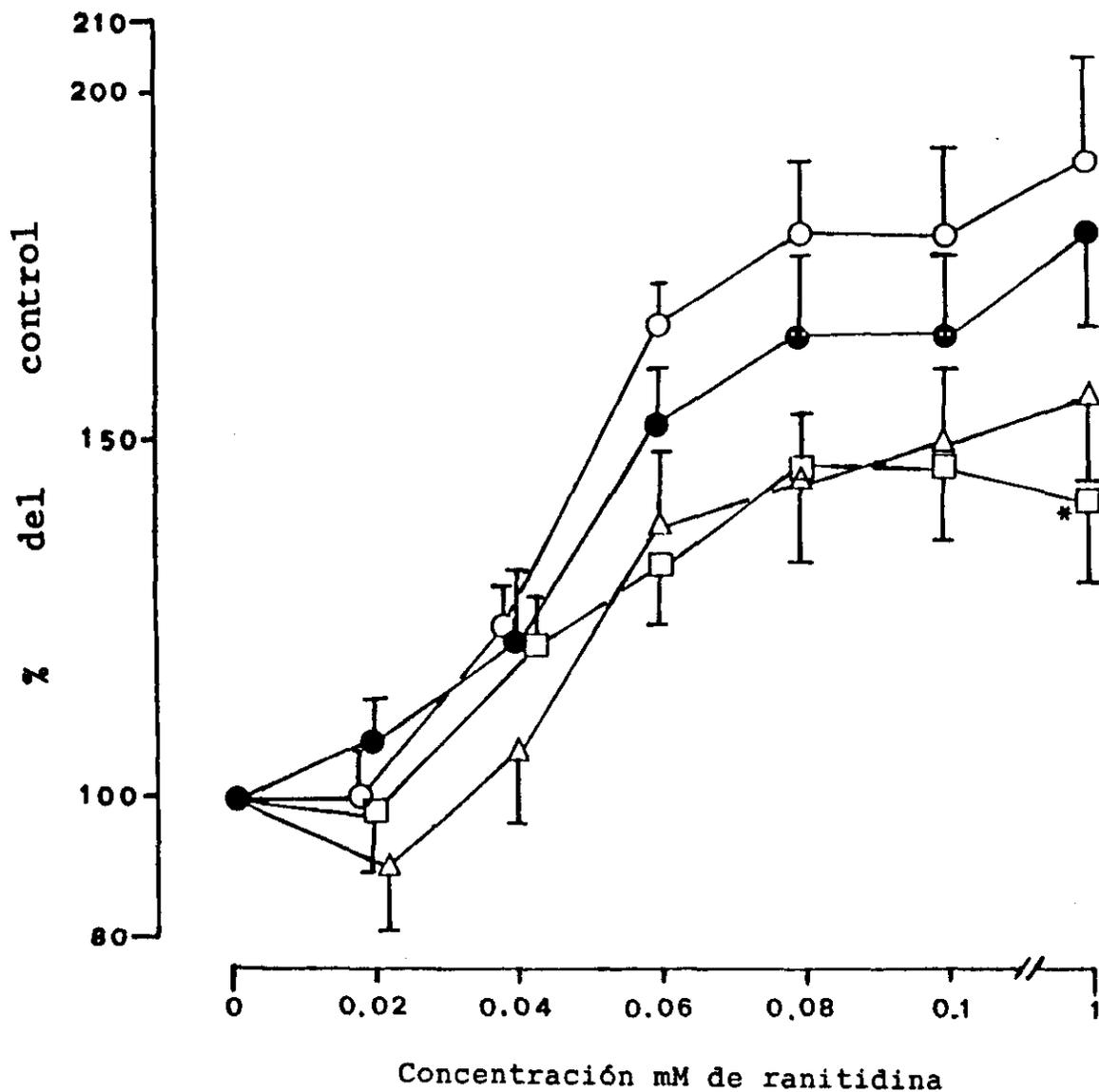


Fig. E-1.- Acción contráctil de ranitidina sola (●) en Tyrode normal y después de captopril 10^{-6} M (○), 10^{-5} M (△) y 10^{-4} M (□) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Cada punto era la media de 6 experimentos \pm e.s.m. Diferencias significativas del control: * $p < 0.05$.

La potenciación posttetánica (PTT) tenía una pequeña disminución dosis-dependientes (tabla E-I). La PTT máxima sin fármaco era de 165.2 ± 9.5 % del control, que disminuía con ranitidina $20 \mu\text{M}$ a 128.1 ± 9.3 % del control ($P < 0.001$) y el máximo de depresión era de 112.4 ± 3.9 % del control ($P < 0.001$) con 1 mM de ranitidina. El porcentaje de potenciación posttetánica tenía también un decremento dosis dependiente cuyo mínimo era del -59.9 ± 6.3 % del control ($P < 0.001$) con dosis de ranitidina de 1 mM .

Tabla E-I

Acción de ranitidina ($20 \mu\text{M}$ - 1 mM) sobre la contracción indirecta (0.16 Hz y 0.2 ms), tétanos (50 Hz durante 5 s.), contracción post-tetánica (PTT) y porcentaje de potenciación de la contracción post-tetánica (% PTP) en la preparación frénico-diafragma de rata con solución Tyrode normal .

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	165.2 ± 9.5	65.2 ± 6.8
Ran 20 μM	108.3 ± 5.5	95.7 ± 4.3	128.1 ± 9.3	$18.2 \pm 4.5^{***}$
Ran 40 μM	$121.8 \pm 10.3^*$	$90.3 \pm 2.7^{**}$	$124.4 \pm 4.6^{***}$	$2.3 \pm 1.4^{***}$
Ran 60 μM	$152.6 \pm 8.7^{***}$	$87.8 \pm 2.4^{***}$	$119.2 \pm 7.7^{***}$	$-28.0 \pm 3.9^{***}$
Ran 80 μM	$165.4 \pm 12.1^{***}$	$86.9 \pm 3.1^{***}$	$115.9 \pm 6.50^{***}$	$-42.7 \pm 4.6^{***}$
Ran 100 μM	$165.3 \pm 11.9^{***}$	$85.6 \pm 4.4^{***}$	$113.5 \pm 7.40^{***}$	$-45.7 \pm 5.9^{***}$
Ran 1 mM	$179.8 \pm 15.4^{***}$	$77.2 \pm 6.1^{***}$	$112.4 \pm 3.9^{***}$	$-59.9 \pm 6.3^{***}$

Los datos muestran la media \pm e.s.m. de $n=6$ experimentos. Significación estadística en relación al control: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$.

La mayor altura de los valores del TOF era con $100 \mu\text{M}$ de ranitidina y el mayor gradiente contráctil era con la relación $T'4/T'1$ con ranitidina 1 mM (tabla E-II). El gradiente del TOF crecía algo de forma dosis-dependiente.

Tabla E-II

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μ M-1 mM) en solución Tyrode en hemidiafragmas de rata. T1-T2-T3-T4 son valores del TOF sin fármaco y T'1-T'2-T'3-T'4 con fármaco.

Relación	Ranitidina					
	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	1 mM
Control T4/T1=1.00						
T'1/T1	1.08	1.17	1.52	1.65	1.65	1.79
T'2/T1	1.08	1.10	1.34	1.42	1.52	1.52
T'3/T1	1.08	1.08	1.27	1.36	1.42	1.41
T'4/T1	1.08	1.08	1.25	1.33	1.44	1.39
T'2/T'1	1.00	0.94	0.88	0.86	0.92	0.84
T'3/T'2	1.00	0.97	0.94	0.95	0.96	0.93
T'4/T'1	1.00	0.91	0.82	0.80	0.87	0.77
T'4/T'3	1.00	0.99	0.98	0.98	0.98	0.98

3.2) Acción de ranitidina (20 μ M-1 mM) después de captopril 1 μ M.

Captopril a dosis 1 μ M causaba sobre la curva dosis respuesta de ranitidina un incremento contráctil dosis-dependiente (fig. E-1) cuyo máximo era con dosis de ranitidina 1 mM de 190.0 ± 15.1 % del control (tabla E-III), mayor que con ranitidina sola. Es decir, en esta preparación captopril 1 μ M potenciaba la acción contráctil de ranitidina.

El tétanos tenía un decremento contráctil dosis dependiente que alcanzaba una altura de 82.7 ± 8.6 % del control con ranitidina 1 mM (tabla E-III), mientras que con ranitidina sola era de 77.2 ± 6.1 % del control. La potenciación posttética tenía también

un decremento dosis-dependiente, pero el incremento más significativo en relación con ranitidina sola era 148.6 ± 9.7 % del control, ($P < 0.01$) con dosis $20 \mu\text{M}$ de ranitidina. El porcentaje de potenciación posttética (% PTP) tenía un decremento similar a ranitidina sola, pero con un incremento significativo con dosis de ranitidina $20 \mu\text{M}$ (tabla E-III).

Tabla E-III

Acción de ranitidina después de captopril $1 \mu\text{M}$ sobre la contracción indirecta (0.16 Hz y 0.2 ms.), tétanos (50 Hz durante 5 s.), contracción post-tetánica (PTT) y potenciación posttética (PTP) en preparaciones de hemidiafragma de rata indirectamente estimuladas con líquido nutricio Tyrode normal.

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	171.1 ± 12.4	71.1 ± 7.9
Cap $1 \mu\text{M}$	95.7 ± 10.2	97.4 ± 2.8	152.0 ± 11.7	58.8 ± 7.1
Ran $20 \mu\text{M}$	100.0 ± 7.4	96.2 ± 3.5	$148.6 \pm 9.79^{**}$	$48.6 \pm 6.4^{***}$
Ran $40 \mu\text{M}$	124.2 ± 6.8	94.0 ± 3.8	$140.5 \pm 14.3^*$	$13.1 \pm 4.2^{**}$
Ran $60 \mu\text{M}$	166.2 ± 7.4	91.7 ± 3.9	127.7 ± 8.9	-30.1 ± 6.1
Ran $80 \mu\text{M}$	178.5 ± 11.2	88.9 ± 4.7	119.1 ± 5.7	-49.8 ± 5.7
Ran $100 \mu\text{M}$	178.6 ± 12.3	81.2 ± 2.7	117.1 ± 7.5	-52.4 ± 7.9
Ran 1 mM	190.0 ± 15.1	82.7 ± 8.6	107.8 ± 4.9	$-76.2 \pm 9.3^{**}$

Los datos muestran la media \pm e.s.m. de $n=6$ experimentos. Valores estadísticamente significativos comparados con ranitidina sin captopril (tabla E-I): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$.

La altura contráctil T'/T de los TOF con ranitidina después de captopril $1 \mu\text{M}$ estaban incrementados comparativamente con ranitidina sola (tabla E-IV), mientras que los valores T'/T del TOF con ranitidina después de captopril $1 \mu\text{M}$ eran similares a los de ranitidina sola.

Tabla E-IV

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM -1 mM) después de captopril 1 μM con solución Tyrode normal en hemidiafragmas de rata.

Relación	Captopril		Ranitidina				
	1 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM
control							
T4/T1=1.00							
T'1/T1	1.00	0.99	1.22	1.68	1.84	1.78	1.85
T'2/T1	1.00	0.99	1.15	1.46	1.70	1.61	1.57
T'3/T1	1.00	0.99	1.13	1.41	1.60	1.55	1.46
T'4/T1	1.00	0.99	1.11	1.38	1.56	1.51	1.43
T'2/T'1	1.00	1.00	0.94	0.87	0.92	0.90	0.84
T'3/T'2	1.00	1.00	0.98	0.96	0.93	0.96	0.92
T'4/T'1	1.00	1.00	0.88	0.82	0.85	0.85	0.77
T'4/T'3	1.00	1.00	0.98	0.97	0.98	0.97	0.98

Símbolos como en tabla E-II.

3.3) Acción de ranitidina (20 μM - 1 mM) después de captopril 10 μM .

La curva dosis respuesta de ranitidina (20 μM - 1 mM) se desplazaba hacia la derecha y abajo cuando captopril 10 μM era añadido al líquido nutricio previamente (fig E-1). La amplitud contráctil máxima era con ranitidina 1 mM de 156.4 ± 12.5 % del control (Tabla E-V).

El tétanos de ranitidina después de captopril 10 μM tenía una escasa disminución dosis-dependiente similar a la de ranitidina sola (tabla E-V). El efecto de añadir previamente captopril 10 μM al líquido nutricio también causaba un pequeño incremento en la PTT de la CDR de ranitidina, que era mas significativo con 20 μM de ranitidina (163.4 ± 7.2 % del

control, $P < 0.001$) en relación con ranitidina sola.

El % de la PTP aumentaba de forma muy significativa con ranitidina después de captopril $10 \mu\text{M}$ en relación con ranitidina sola (tabla E-V).

TABLA E-V

Acción de ranitidina (Ran) ($20 \mu\text{M}$ - 1mM) después de captopril (Cap) $10 \mu\text{M}$ en la preparación hemidiafragma de rata.

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	164.0 ± 5.1	64.0 ± 5.9
Cap $10 \mu\text{M}$	95.5 ± 9.2	97.6 ± 4.9	156.5 ± 5.5	63.8 ± 5.3
Ran $20 \mu\text{M}$	92.1 ± 8.4	98.0 ± 9.0	$163.4 \pm 7.2^{***}$	$77.4 \pm 8.7^{***}$
Ran $40 \mu\text{M}$	106.7 ± 9.3	95.3 ± 11.8	$138.9 \pm 8.1^{**}$	$30.1 \pm 4.7^{***}$
Ran $60 \mu\text{M}$	138.5 ± 11.5	93.3 ± 12.4	$128.5 \pm 4.9^*$	$-7.7 \pm 2.3^{***}$
Ran $80 \mu\text{M}$	146.3 ± 11.6	93.0 ± 12.9	126.6 ± 6.4	$-15.5 \pm 3.8^{***}$
Ran $100 \mu\text{M}$	149.7 ± 12.1	91.8 ± 6.6	122.2 ± 5.7	$-22.5 \pm 4.6^{***}$
Ran 1mM	156.4 ± 12.5	78.0 ± 9.2	111.2 ± 4.3	$-40.6 \pm 5.2^{***}$

Significación estadística y símbolos como en tabla E-III.

TABLA E-VI

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina ($20 \mu\text{M}$ - 1mM) después de captopril $10 \mu\text{M}$ en solución Tyrode en hemidiafragmas de rata.

Relación	Captopril		Ranitidina				
	$10 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$	$40 \mu\text{M}$	$60 \mu\text{M}$	$80 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$	1mM
Control							
T ₄ /T ₁	1.00						
T' ₁ /T ₁	0.93	0.88	1.05	1.38	1.43	1.45	1.52
T' ₂ /T ₁	0.93	0.88	0.95	1.25	1.32	1.32	1.31
T' ₃ /T ₁	0.93	0.88	0.94	1.21	1.27	1.26	1.25
T' ₄ /T ₁	0.93	0.88	0.93	1.19	1.25	1.24	1.22
T' ₂ /T' ₁	1.00	1.00	0.90	0.90	0.92	0.90	0.89
T' ₃ /T' ₂	1.00	1.00	0.98	0.96	0.96	0.95	0.95
T' ₄ /T' ₁	1.00	1.00	0.88	0.86	0.87	0.85	0.80
T' ₄ /T' ₃	1.00	1.00	0.99	0.98	0.98	0.98	0.97

Símbolos como en tabla E-II.

Los valores de las relaciones T'/T del TOF tenían un decremento con dosis altas de ranitidina después de captopril 10 μ M en relación con ranitidina sola (tabla E-VI). Las variaciones del TOF con fármacos (T'/T) tenían una altura muy similar y por tanto variaciones próximas a la unidad.

3.4) Acción de ranitidina (20 μ M - 1 mM) después de captopril 100 μ M en solución Tyrode normal.

En preparaciones pretratadas con 100 μ M de captopril ranitidina también tenía un incremento contráctil dosis-dependiente pero disminuía en relación con ranitidina sola, con un desplazamiento de la CDR de ranitidina hacia abajo y hacia la derecha (fig. E-1), alcanzando una altura contráctil de 142.8 ± 11.3 % del control ($P < 0.05$) con dosis 1 mM de ranitidina (tabla E-VII).

El tétanos de 50 Hz durante 5 s. tenía un escaso decremento dosis dependiente, aunque menor en relación con ranitidina sola, excepto con 1 mM de ranitidina que disminuía a 66.1 ± 6.7 % del control con ranitidina 1 mM después de captopril 100 μ M (tabla E-VII). La acción de captopril 100 μ M previo a la CDR de ranitidina sobre la PTT era disminución de forma dosis dependiente, pero se producía un incremento que era mas significativo con ranitidina a dosis bajas (20 μ M - 80 μ M) en comparación con ranitidina sola (tabla E-VII). El % de la PTP tenía también un incremento significativo comparativamente con

ranitidina sola (tabla E-VII) y había disminución dosis-dependiente.

Tabla E-VII

Acción de ranitidina después de captopril 100 μ M con solución Tyrode en la preparación hemidiafragma de rata.

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	184.0 \pm 5.3	84.0 \pm 9.1
Cap 100 μ M	97.4 \pm 8.9	101.6 \pm 4.6	168.5 \pm 4.8	72.9 \pm 6.8
Ran 20 μ M	97.8 \pm 7.3	96.6 \pm 5.8	168.1 \pm 6.9***	71.8 \pm 7.5***
Ran 40 μ M	121.0 \pm 8.2	94.2 \pm 3.9	147.8 \pm 5.4**	22.1 \pm 4.6***
Ran 60 μ M	132.7 \pm 7.5	93.3 \pm 7.6	130.7 \pm 7.3**	-1.5 \pm 3.7***
Ran 80 μ M	147.8 \pm 8.4	90.9 \pm 7.5	128.0 \pm 5.8**	-15.4 \pm 5.2***
Ran 100 μ M	147.0 \pm 10.9	90.0 \pm 3.8	103.9 \pm 6.1*	-41.4 \pm 8.3
Ran 1 mM	142.8 \pm 11.3*	66.1 \pm 6.7*	106.4 \pm 5.9	-34.2 \pm 4.2***

Significación estadística y símbolos como en tabla E-III.

Captopril 100 μ M causaba un decremento del valor de los cocientes T'/T del TOF de ranitidina y había incremento de los valores del TOF T'2/T'1. La mayor relación del TOF era con dosis 100 μ M de ranitidina y la menor relación era con 1 mM de ranitidina ambas después de 100 μ M de captopril 100 μ M (tabla E-VIII). En conjunto captopril 100 μ M tenía escasa acción sobre las variaciones del TOF con ranitidina, es decir había escasa diferencia entre los relaciones del TOF de ranitidina con y sin captopril 100 μ M.

Tabla E-VIII

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μ M-1 mM) después de captopril 100 μ M en solución Tyrode en hemidiafragmas de rata.

Relación	Captopril		Ranitidina				
	100 μ M	20 μ M	40 μ M	60 μ M	80 μ M	100 μ M	1 mM
Control							
T4/T1=1.00							
T'1/T1	0.95	0.95	1.15	1.35	1.40	1.42	1.35
T'2/T1	0.93	0.93	1.08	1.27	1.32	1.30	1.21
T'3/T1	0.93	0.93	1.06	1.23	1.26	1.25	1.17
T'4/T1	0.93	0.93	1.04	1.22	1.26	1.24	1.16
T'2/T'1	0.98	0.98	0.94	0.94	0.94	0.91	0.89
T'3/T'2	0.99	0.99	0.97	0.90	0.95	0.96	0.96
T'4/T'1	0.97	0.97	0.90	0.90	0.89	0.87	0.85
T'4/T'3	1.00	1.00	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98

Símbolos como en tabla E-II.

3.5) Efecto de captopril 10 μ M en la acción contráctil de ranitidina en medio nutricio Tyrode con 5.4 mM de K+.

Aunque captopril 10^{-6} M solo no causaba disminución de la altura contráctil control, en cambio, causaba un gran desplazamiento de la CDR de ranitidina hacia abajo (fig. E-2), alcanzando una altura contráctil con ranitidina 1 mM del 63.6 ± 9.3 % del control ($p < 0.001$) (tabla E-IX).

El tétanos tenía menor decremento en relación con ranitidina sola en solución Tyrode normal (tabla E-IX). Con captopril 10 μ M en medio nutricio con doble de potasio también había una disminución dosis-dependiente de la altura contráctil de la PTT de ranitidina, si bien había un incremento significativo excepto con ranitidina 1 mM (tabla E-IX) comparativamente con ranitidina

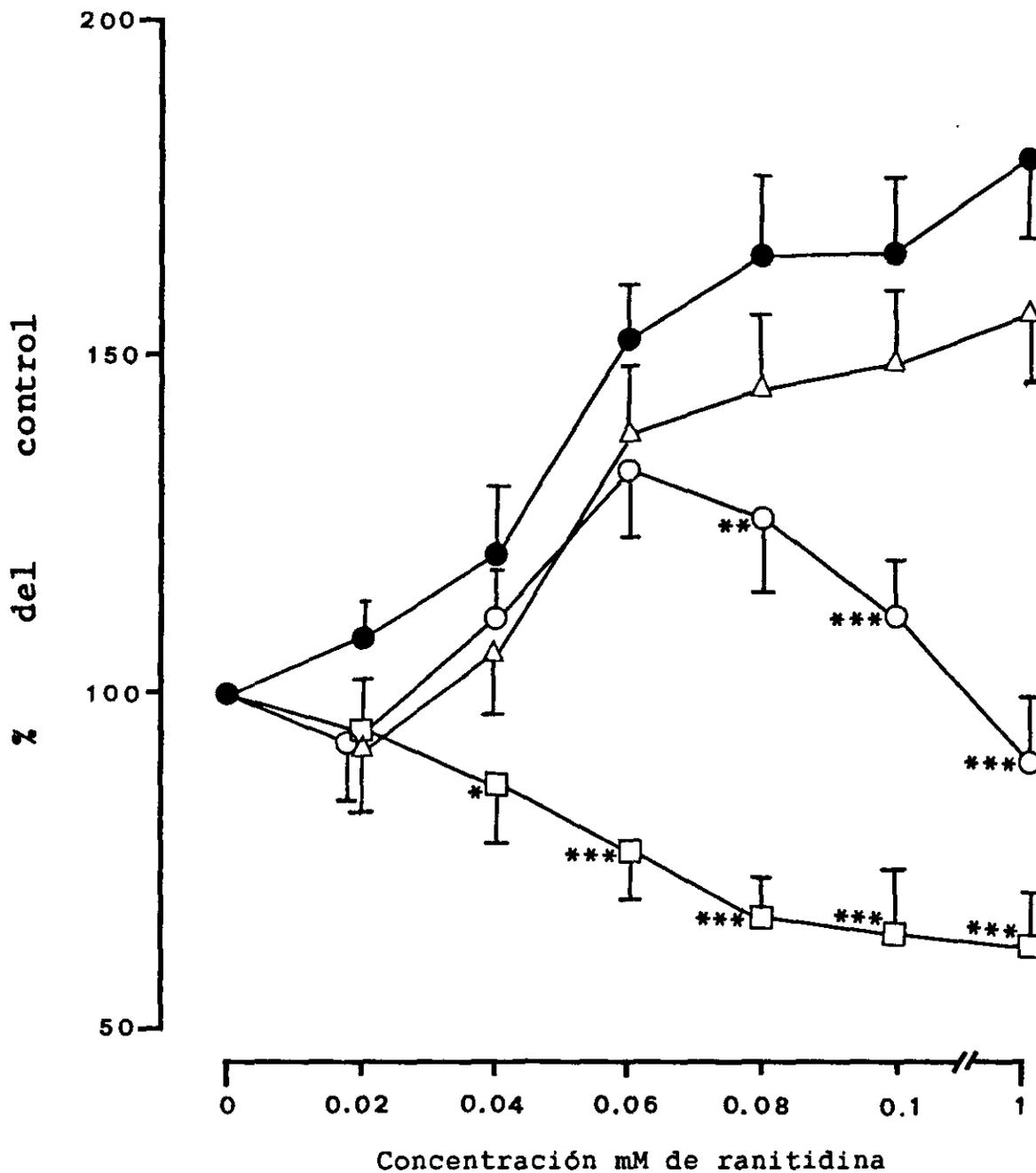


Fig. E-2.- Acción contráctil de ranitidina en Tyrode normal (●) y después de captopril 10^{-5} M (Δ), captopril con K^+ 5.4 mM (□) y con 0.90 mM de Ca^{++} (○) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Cada punto era la media de 6 experimentos \pm e.s.m. Diferencias significativas del control: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

sola en solución Tyrode normal.

El % de PTP tenía un incremento dosis dependiente y también era significativo el incremento en relación con ranitidina sola en Tyrode normal, es decir había menor disminución del % de la PTP con ranitidina después de captopril 10 μ M en medio hiperpotásico.

Tabla E-IX

Acción de ranitidina después de captopril 10 μ M con solución Tyrode 5.4 mM de K⁺ en la preparación frénico-diafragma de rata.

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	185.3±16.6	85.3±7.9
Cap 10 μ M	100.0±6.8	95.1±5.5	160.8±12.6	60.8±5.6
Ran 20 μ M	93.9±7.3	97.2±7.2	154.0±7.4***	64.0±7.1***
Ran 40 μ M	87.2±9.4*	92.5±7.7	136.2±8.4*	56.1±4.9***
Ran 60 μ M	76.3±6.5***	90.8±7.9	132.5±6.8**	73.6±6.1***
Ran 80 μ M	67.8±7.8***	88.1±8.0	131.0±6.6**	93.2±6.8***
Ran 100 μ M	65.4±11.2***	97.4±3.9	127.7±4.0**	95.2±8.2***
Ran 1 mM	63.6±9.3***	84.8±6.0	115.8±3.2	82.0±8.7***

Significación estadística y símbolos como en tabla E-III.

Las alturas del TOF de ranitidina después de captopril 10 μ M en medio con potasio 5.4 mM eran menores que los del TOF control y por ello los cocientes TOF con fármacos/TOF control (T'/T) eran inferiores a la unidad (tabla E-X). Las relaciones del TOF con fármacos (T'/T') tenían un valor próximo a la unidad, sobre todo las relaciones del T'2/T'1, T'3/T'2 y T'4/T'3 por el efecto despolarizante del exceso de potasio en el medio nutritivo. En relación con ranitidina sola en solución Tyrode normal los

cocientes T'/T' aumentaban y los T'/T disminuían.

Tabla E-X

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM - 1 mM) después de captopril 10 μM en solución Tyrode 5.4 mM de K⁺ en hemidiafragmas de rata.

Relación	Captopril			Ranitidina			
	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM
control T4/T1=1.00							
T'1/T1	0.94	0.90	0.85	0.70	0.57	0.61	0.61
T'2/T1	0.97	0.92	0.84	0.66	0.54	0.57	0.59
T'3/T1	0.97	0.92	0.83	0.64	0.53	0.56	0.56
T'4/T1	0.97	0.92	0.83	0.64	0.53	0.56	0.56
T'2/T'1	1.02	1.02	0.97	0.93	0.95	0.93	0.95
T'3/T'2	1.00	1.00	0.99	0.97	0.97	0.98	1.00
T'4/T'1	1.03	1.02	0.97	0.90	0.92	0.91	0.95
T'4/T'3	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.99	0.99

Símbolos como en tabla E-II.

3.6) Efecto de la disminución de calcio en el medio nutricio sobre la acción contractil de ranitidina después de captopril 10 μM .-

Quando se disminuía en el medio nutricio la concentración de calcio a la mitad (0.90 mM de Ca⁺⁺) y añadiendo previamente captopril 10 μM a la CDR de ranitidina, la máxima altura contráctil era alcanzada con 60 μM de ranitidina, que era de 134.9 ± 10.7 % del control (tabla E-XI). El efecto máximo de cada dosis se alcanzaba en unos 5.4 min. También había una significativa disminución contráctil de ranitidina con dosis >60 μM y la CDR tenía un ascenso hasta 60 μM y después descenso hasta 1 mM alcanzando con esta última dosis una altura contractil de 89.9

± 10.4 % del control (P<0.001) en relación con ranitidina en solución Tyrode normal.

Mientras que el tétanos tenía una altura contráctil muy similar con cada dosis, comparado con ranitidina sola el incremento era solo significativo con dosis de ranitidina 1 mM (95.8 ± 8.7 % del control, P<0.01). Tanto la PTT como el % de la PTP estaban incrementadas significativamente (tabla E-XI) tanto en comparación con captopril 10 µM - CDR de ranitidina como con la CDR de ranitidina sola, ambas en solución Tyrode normal.

Tabla E-XI

Acciones de ranitidina después de captopril 10 µM con solución Tyrode 0.90 mM de Ca⁺⁺ en la preparación hemidiafragma de rata.

	Contracción	Tétanos	PTT	PTP (%)
control	100.0	100.0	193.2±10.6	93.2±10.3
Cap 10 µM	96.8±7.9	103.5±13.3	204.3±12.9	111.0±12.7
Ran 20 µM	92.7±8.6	101.6±10.6	195.6±9.6***	111.0±10.6***
Ran 40 µM	111.4±7.9	100.4±12.1	163.7±6.9***	46.9±6.7***
Ran 60 µM	134.9±10.7	98.5±10.8	163.7±8.0***	21.9±5.3***
Ran 80 µM	127.3±11.5**	95.8±8.1	161.9±8.6***	27.1±5.1***
Ran 100 µM	112.8±7.8***	96.4±8.7	151.4±6.4***	34.2±4.9***
Ran 1 mM	89.9±10.4***	95.8±8.7**	152.6±7.2***	69.7±7.3***

Significación estadística y símbolos como en tabla E-III.

En medio hipocálcico (0.9 mM) las acciones de captopril 10 µM previo a la CDR de ranitidina sobre las relaciones T'/T del TOF era de disminución. Con 20 µM de ranitidina después de captopril 10 µM estas relaciones eran inferiores a la unidad (tabla E-XII). Dosis superiores de ranitidina causaban aumento de los valores del TOF, aunque descendidos en relación a

captopril 10 μM - CDR de ranitidina en solución Tyrode normal y aún mayor disminución con relación a ranitidina sola en solución Tyrode normal. Los valores T'/T' del TOF de ranitidina después de captopril 10 μM tenían valor próximo a la unidad por tener poca variación en su altura contráctil.

Tabla E-XII

Indices del tren de a cuatro (TOF) de ranitidina (20 μM -1 mM) después de captopril 10 μM con solución Tyrode 0.90 mM de Ca^{++} en hemidiafragmas de rata.

Relación	Captopril		Ranitidina				
	10 μM	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM	1 mM
control							
T4/T1=1.00							
T'1/T1	0.95	0.94	1.12	1.34	1.25	1.14	0.92
T'2/T1	0.97	0.95	1.10	1.31	1.21	1.11	0.85
T'3/T1	0.97	0.95	1.05	1.27	1.18	1.08	0.79
T'4/T1	0.97	0.95	1.04	1.26	1.16	1.06	0.78
T'2/T'1	1.02	1.01	0.96	0.97	0.97	0.97	0.92
T'3/T'2	1.00	1.00	0.97	0.97	0.97	0.96	0.93
T'4/T'1	1.01	1.01	0.92	0.94	0.93	0.93	0.85
T'4/T'3	0.99	1.00	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98

Símbolos como en tabla E-II.

4. INTERACCIÓN DE CAPTOPRIL CON EL ANTICOLINESTERÁSICO NEOSTIGMINA EN HEMIDIAFRAGMAS DE RATA INDIRECTAMENTE ESTIMULADOS.-

4.1) Curva dosis-respuesta de neostigmina (0.1 μ M - 10 μ M) en solución Tyrode normal.

Bajas dosis de neostigmina como 0.01 μ M no tenían efecto en la contracción y el TOF, en cambio dosis mayores y próximas a 0.1 μ M tenían un incremento contráctil máximo; con esta dosis el comienzo del efecto era después de una latencia de aproximadamente de 3.3 min, alcanzando el máximo de la amplitud contráctil de 276.0 ± 23.6 del control ($p < 0.001$) en 9 min. Mayor dosis de neostigmina, 1 μ M tenía una acción dual, primero un breve incremento contráctil adicional de 8.2 % del control en un minuto, seguido de un decremento similar que después era menor y gradual, más prolongado que se hacía estable a los 8 min., alcanzando una altura de 232.6 ± 19.1 % del control ($p < 0.01$). Mayor concentración adicional de neostigmina, 10 μ M no solo no incrementaba la amplitud contráctil, sino que incluso descendía con rapidez los primeros 10 min aprox. y después se hacía lentamente, alcanzando una altura contráctil a los 30 min. de 146.3 ± 11.2 % del control (fig. F-1). Se producían contracciones espontáneas de poca amplitud pero cuya frecuencia era paralelo al incremento contráctil causado por neostigmina; estas comenzaban 7 min después de neostigmina 0.1 μ M, era menores con 1 μ M y desaparecían con 10 μ M.

Aunque las relaciones del TOF tenían un decremento

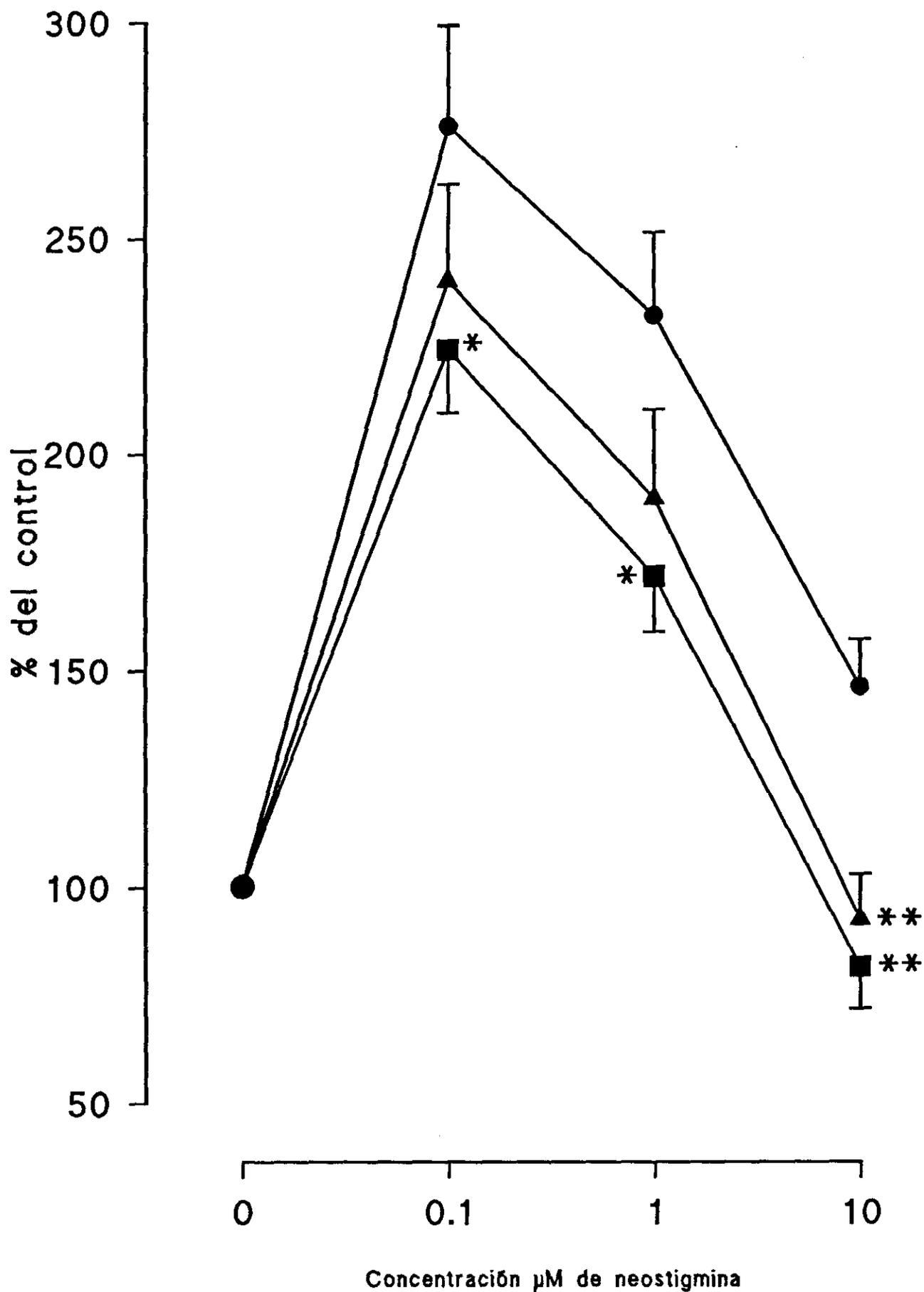


Fig. F-1.-Acción contráctil de neostigmina sola (●) y después de captopril 10 μM (▲) y 100 μM (■) sobre preparaciones hemidiafragma de rata indirectamente estimuladas en solución Tyrode. En barras verticales se muestran la media \pm s.e.m. de n=6 preparaciones. Significación: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

proporcional al incremento de la dosis, con neostigmina 0.1 μ M el máximo incremento era con la relación T'1/T1 de 2.65 y la menor relación T'4/T'1 de 0.87, que disminuían respectivamente a 2.03 y 0.48 con dosis de neostigmina de 1 μ M. Con 10 μ M de neostigmina había tendencia a disminuir e igualarse progresivamente la altura de los cuatro latidos del TOF de forma tiempo-dependiente (tabla F-I) alcanzando también respectivamente los valores de 0.93 y 0.71, por el incremento despolarizante que tiene en placa motora el exceso de neostigmina (Bowman, 1980a).

TABLA F-I

Indices del TOF por neostigmina en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode normal.

Cociente	neostigmina		
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
Control T4/T1=1.00			
T'1/T1	2.65	2.03	0.93
T'2/T1	2.37	1.17	0.78
T'3/T1	2.33	1.02	0.71
T'4/T1	2.31	0.99	0.67
T'2/T'1	0.89	0.57	0.83
T'3/T'2	0.98	0.87	0.90
T'4/T'1	0.87	0.48	0.71
T'4/t'3	0.99	0.96	0.83

T1-T2-T3-T4 eran alturas del TOF sin fármacos y T'1-T'2-T'3-T'4 con fármacos. Los datos eran la media de n=6 experimentos.

4.2) Acción de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) después de captopril 10 μ M en solución Tyrode normal.

Captopril 10 μ M solo tenía un pequeño efecto de disminución de la contracción, alcanzando una altura contráctil de 95.0 ± 12.3 % del control. La adicción posterior de neostigmina 0.1 μ M, después de 3.3 min de latencia causaba un incremento contráctil máximo a los 10 min. de 240.4 ± 22.3 % del control (fig. F-1). El máximo contráctil permanecía estable unos minutos y después tenía una lenta disminución de la contracción si no se adicionaban al baño más dosis de neostigmina. En cambio, 1 μ M de neostigmina después de captopril 10 μ M causaba una disminución de la contracción a 190.0 ± 20.4 % del control y en unos 8.2 min. se estabilizaba, mientras que 10 μ M de neostigmina después de captopril 10 μ M disminuía la amplitud contráctil con rapidez los primeros 8 min., alcanzando una amplitud contráctil a los 30 min. de 92.7 ± 10.4 % del control ($p < 0.01$) que después se hacía también estable o con muy lenta disminución (fig. F-1).

El efecto de la adicción previa de captopril 10 μ M sobre las relaciones del TOF de neostigmina 1 μ M y 10 μ M era de incremento, mientras que con 0.1 μ M había un pequeño incremento o no variaban en relación con neostigmina sola (tabla F-II).

TABLA F-II

Indices del TOF por neostigmina 0.1 μM , 1 μM y 10 μM después de captopril 10 μM en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en solución Tyrode normal.

Cociente	captopril		neostigmina	
	10 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
Control T4/T1=1.00				
T'1/T1	0.93	2.71	2.28	1.23
T'2/T1	0.93	2.42	1.74	1.12
T'3/T1	0.93	2.30	1.60	1.05
T'4/T1	0.93	2.25	1.53	1.02
T'2/T'1	1.00	0.89	0.76	0.90
T'3/T'2	1.00	0.95	0.91	0.94
T'4/T'1	1.00	0.83	0.67	0.82
T'4/T'3	1.00	0.97	0.95	0.96

Los datos eran la media de n=6 experimentos. Símbolos como en tabla F-I.

4.3) Acción de neostigmina (0.1 μM -1 μM y 10 μM) después de captopril 100 μM .

Aunque la contracción era afectada ligeramente por captopril 100 μM , con una disminución que alcanzaba al 92.1±11.0 % del control, en cambio, causaba una disminución de la acción contráctil de neostigmina sola (fig. F-1). Así, neostigmina 0.1 μM después de captopril tenía un comienzo de acción transcurridos 3.7 min. de latencia, alcanzaba a los 18 min. el máximo incremento contráctil disminuía a 224.4±14.8 % del control (p<0.05, fig. F-1); 1 μM de neostigmina causaba un pequeño y breve incremento de la amplitud contráctil durante 1 min., seguido de disminución, que era a los 11.3 min. de 172.0±12.8 %

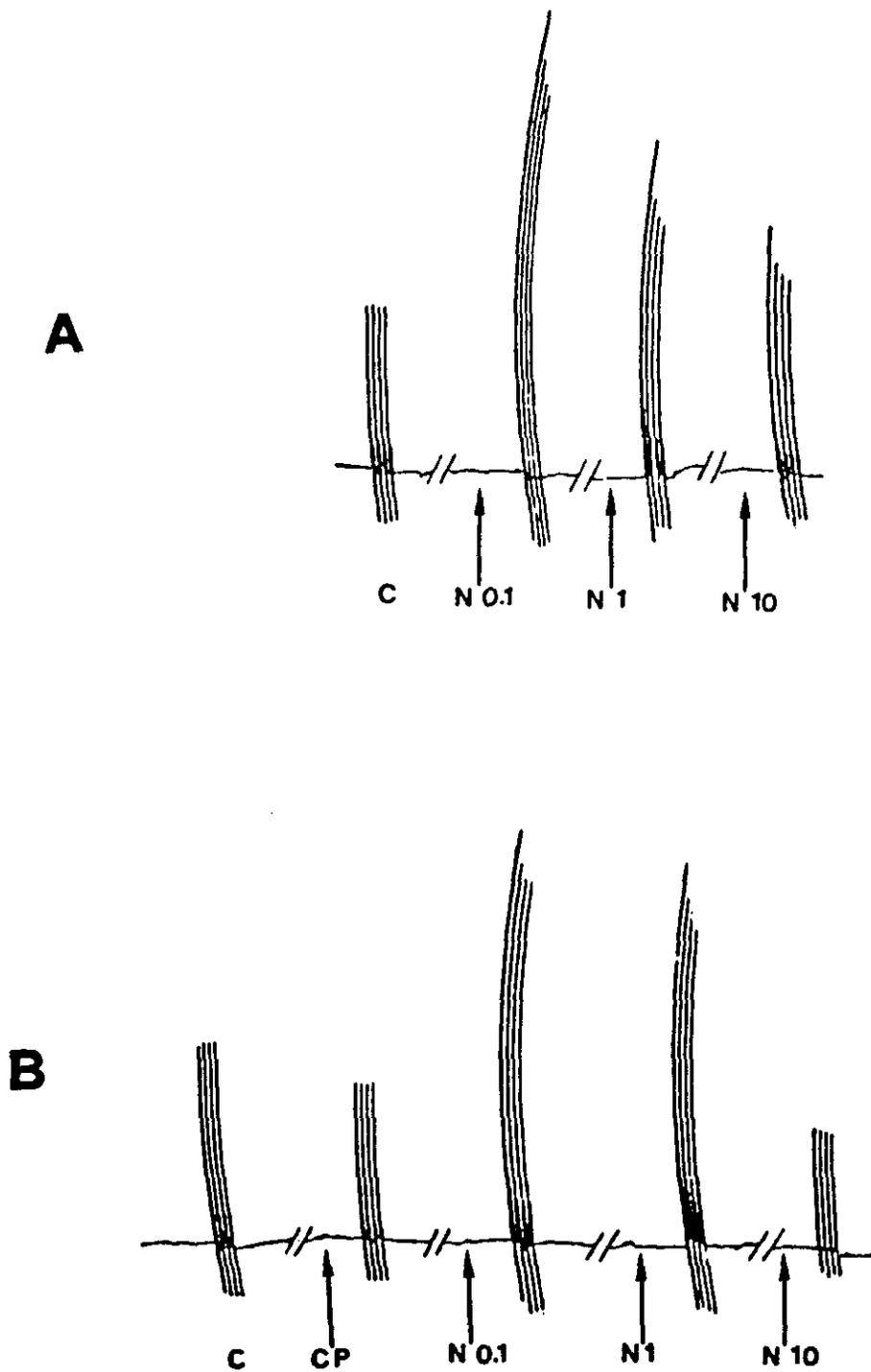


Fig. F-2.- Acción sobre el TOF de neostigmina (N) sola (A) $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ y neostigmina después de captopril (CP) $100 \mu\text{M}$ (B) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode normal.

del control ($p < 0.05$) y después se estabilizaba. La dosis adicional de $10 \mu\text{M}$ de neostigmina tenía inicialmente una rápida disminución de la contracción que después era más lenta y a los 30 min. alcanzaba una altura contráctil de $81.6 \pm 9.6 \%$ ($p < 0.01$) de la amplitud control.

Comparativamente con neostigmina sola, el efecto de la adicción previa de captopril $100 \mu\text{M}$ causaba una mayor disminución en los cocientes T'/T del TOF por neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ en relación con el TOF sin fármacos y en cambio mayor aumento con neostigmina $1 \mu\text{M}$, excepto la relación $T'1/T1$ que disminuía. Las alturas contráctiles del TOF por neostigmina después de captopril $100 \mu\text{M}$ tenían escaso gradiente y por ello los valores se aproximaban a la unidad (fig. F-2). La mayor relación del TOF era $T'1/T1$ de 1.94 con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ y la menor ratio $T'4/T1$ de 0.69 con $10 \mu\text{M}$ de neostigmina (tabla F-III)

TABLA F-III

Indices del TOF de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ después de captopril $100 \mu\text{M}$ en hemidiafragmas de rata en medio nutricio Tyrode.

Cociente	captopril		neostigmina	
	100 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
Control $T4/T1=1.0$				
$T'1/T1$	0.88	1.94	1.69	0.78
$T'2/T1$	0.88	1.77	1.54	0.73
$T'3/T1$	0.88	1.74	1.43	0.71
$T'4/T1$	0.88	1.70	1.37	0.69
$T'2/T'1$	1.00	0.90	0.90	0.94
$T'3/T'2$	1.00	0.98	0.93	0.96
$T'4/T'1$	1.00	0.87	0.80	0.88
$T'4/T'3$	1.00	0.97	0.95	0.97

Los datos eran la media de $n=6$ experimentos. Símbolos como en tabla F-II.

4.4) Acción de neostigmina (0.1 μ M, 1 μ M y 10 μ M) después de captopril 10 μ M en solución Tyrode hipocálcico [Ca⁺⁺], 0.90 mM.

La altura contractil era escasamente afectada por captopril 10 μ M en medio con calcio disminuido a 0.90 mM, ya que era de 97.1 \pm 14.2 % del control. Por otro lado, neostigmina 0.1 μ M después de captopril 10 μ M tenía una latencia de 3 min., aumentaba la amplitud contráctil hasta alcanzar un máximo a los 18 min. de 215.0 \pm 14.8 % del control ($p < 0.01$); 1 μ M de neostigmina tenía un incremento contráctil adicional de 16.1 % del control en 2.7 min., seguido de disminución contráctil más rápida durante 17 min., y después de 8.6 min siguientes era estable, alcanzando una altura de 136.2 \pm 12.7 % de la amplitud control ($p < 0.001$). Con 10 μ M de neostigmina rápidamente disminuía la contracción en los primeros 9 min., alcanzando una altura contráctil de 36.2 \pm 8.6 % del control ($p < 0.001$) después de 30 min. de añadido al baño (fig. F-3), que era seguida de lenta disminución y en un experimento la contracción desaparecía en 45 min.

Todas las relaciones T'/T' se acercaban a la unidad (tabla F-IV) con dosis 0.1 μ M y 1 μ M de neostigmina y eran de valor unidad con 10 μ M de neostigmina, ya que el gradiente y la amplitud de los cuatro estímulos del TOF por neostigmina 0.1 μ M

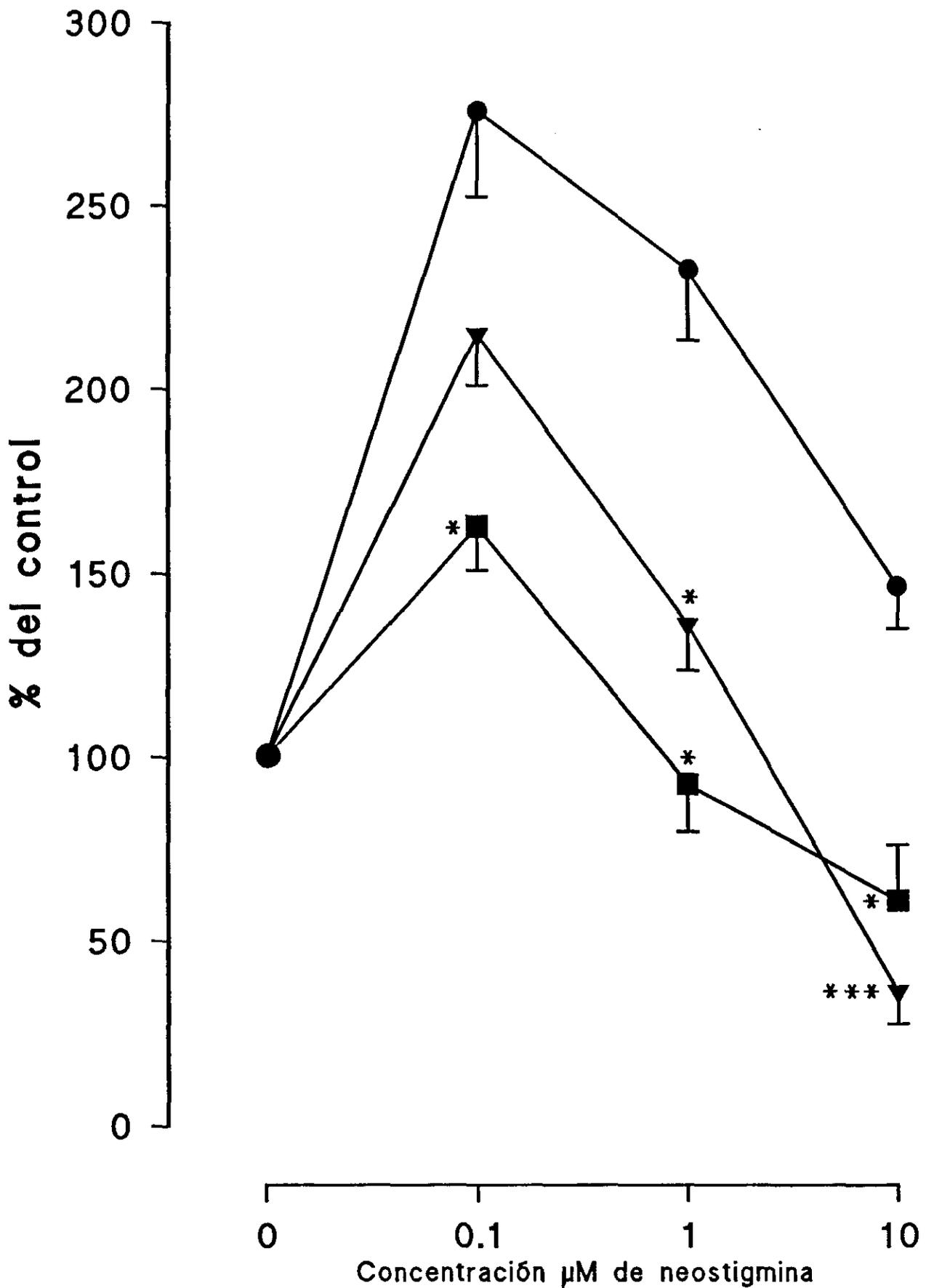


Fig. F-3.- Acción contráctil de neostigmina en solución Tyrode normal (●) y después de captopril $10 \mu\text{M}$ en solución Tyrode hipocálcico, 0.9 mM (▼) e hiperpotásico, 5.4 mM (■) sobre preparaciones hemidiafragma de rata indirectamente estimulados. En barras verticales se muestran la media \pm s.e.m. de $n=6$ preparaciones. Significación: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

y 1 μM estaban poco modificados (fig. F-4). Asimismo, con relación a neostigmina sola en Tyrode normal la mayor disminución era los cocientes T'/T con neostigmina 0.1 μM y sobre todo 10 μM .

TABLA F-IV

Indices del TOF de neostigmina 0.1 μM , 1 μM y 10 μM después de captopril 10 μM en hemidiafragmas de rata con solución Tyrode hipocálcica (0.9 mM de Ca^{++}).

Cociente	captopril		neostigmina	
	10 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
Control T4/T1=1.00				
T'1/T1	0.92	1.91	1.57	0.31
T'2/T1	0.92	1.85	1.51	0.31
T'3/T1	0.92	1.82	1.46	0.31
T'4/T1	0.92	1.80	1.43	0.31
T'2/T'1	1.00	0.99	0.96	1.00
T'3/T'2	1.00	0.98	0.96	1.00
T'4/T'1	1.00	0.94	0.91	1.00
T'4/T'3	1.00	0.99	0.97	1.00

Los datos eran la media de n=6 experimentos. Símbolos como en tabla F-II.

4.5) Acción de neostigmina (0.1 μM - 10 μM) después de captopril 10 μM en solución Tyrode hiperpotásica [K^+ lo 5.4 mM.

En medio hiperpotásico, captopril 10 μM tenía un ligero incremento contráctil, de 106.3 ± 14.4 % del control. Neostigmina después de captopril tenía menor incremento contráctil en relación con neostigmina sola en solución Tyrode normal. El comienzo del efecto comparativamente con neostigmina sola tenía

una latencia que se incrementaba significativamente ($p < 0.05$) con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ después de captopril $10 \mu\text{M}$ en Tyrode $[\text{K}^+]_o$ 5.4 mM , de $3.3 \pm 0.18 \text{ min.}$ en solución Tyrode normal a $5.2 \pm 0.23 \text{ min.}$ La máxima altura contráctil ($162.7 \pm 11.8 \%$ de la amplitud control, $p < 0.001$) era alcanzado después de 16.2 min. Con $1 \mu\text{M}$ de neostigmina rápidamente disminuía la contracción durante 3.3 min. , y después de 7.5 min. , alcanzaba una altura mantenida de $92.6 \pm 12.9 \%$ ($p < 0.001$) del control (fig. F-3). Neostigmina $10 \mu\text{M}$ tenía disminución contráctil adicional, con rapidez durante 2.5 min. , y lentamente durante 18 min. , haciéndose posteriormente estable o con muy pequeña disminución de la contracción en algunos experimentos; a los 30 min. la altura contráctil alcanzada era de $61.0 \pm 15.1 \%$ del control ($p < 0.01$).

TABLA F-V

Indices del TOF de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ después de captopril $10 \mu\text{M}$ en hemidiafragmas de rata en solución hipotónica $[\text{K}^+]_o$ $5.4 \mu\text{M}$.

Cociente	captopril		neostigmina	
	$10 \mu\text{M}$	$0.1 \mu\text{M}$	$1 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$
Control $T_4/T_1 = 1.0$				
T'_1/T_1	1.05	1.62	0.88	0.66
T'_2/T_1	1.07	1.51	0.79	0.64
T'_3/T_1	1.07	1.45	0.75	0.62
T'_4/T_1	1.07	1.42	0.74	0.62
T'_2/T'_1	1.01	0.92	0.90	0.96
T'_3/T'_2	1.00	0.96	0.94	0.97
T'_4/T'_1	1.01	0.87	0.84	0.94
T'_4/T'_3	1.00	0.97	0.98	0.99

Los datos eran la media de $n=6$ experimentos. Símbolos como en tabla F-II.

La altura y gradiente del TOF eran menores en medio

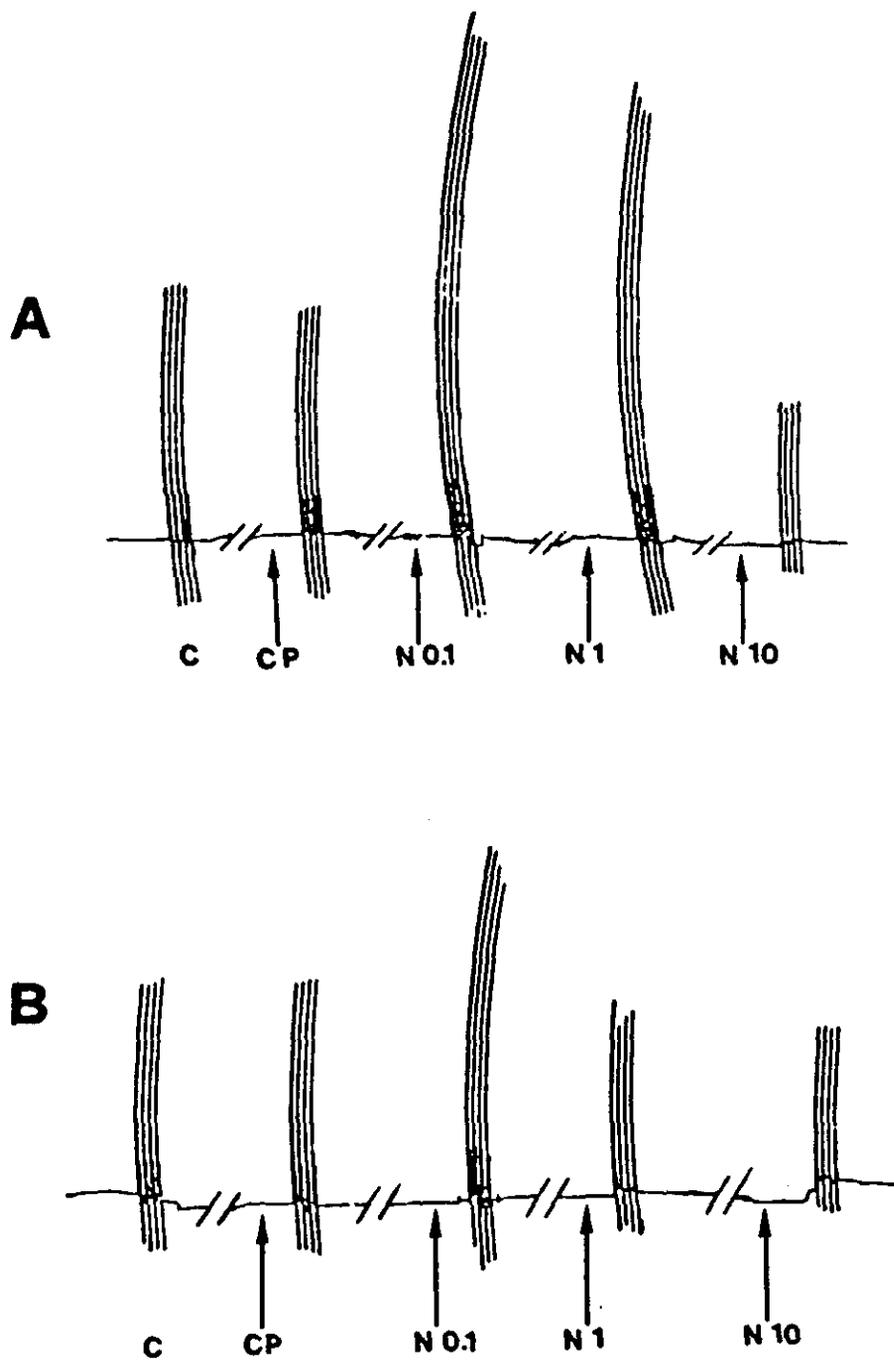


Fig. F-4.- Acción sobre el TOF de neostigmina (N) 0.1 μ M, 1 μ M y 10 μ M después de captopril (CP) 10 μ M en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode hipocálcico (A) e hiperpotásico (B).

hiperpotásico (fig. F-4). Con relación al TOF con neostigmina sola en medio de Tyrode normal, disminuía el valor de los cocientes T'/T del TOF con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ después de captopril $10 \mu\text{M}$. En cambio, las relaciones T'/T' eran de valor próximo a la unidad y estaban incrementadas con neostigmina (tabla F-V), por el estado de despolarización causado por el aumento de potasio en el medio nutricional. No obstante, la evolución del tren de a cuatro (TOF) en medio hiperpotásico en relación con neostigmina sola en solución Tyrode normal, tenía un incremento mayor con la relación $T'1/T1$ de 1.62 con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ después de captopril $10 \mu\text{M}$ y el decremento mayor era con las ratios $T'3/T1$ y $T'4/T1$ de 0.62 con neostigmina $10 \mu\text{M}$.

5) ACCIÓN CONTRÁCTIL COMPARATIVA DE RANITIDINA Y NEOSTIGMINA
EN HEMIDIAPRAGMAS DE RATA AISLADOS.

5.1) Acción de ranitidina y neostigmina en hemidiafragmas
de rata aislados en solución Tyrode normal directa e
indirectamente estimulados.-

A) Curva dosis respuesta de neostigmina (0.1 μ M - 10 μ M).

Con dosis de neostigmina 0.01 μ M e inferiores no había incremento contráctil, mientras que con 0.1 μ M había un incremento contráctil máximo que era alcanzado en unos 9 min., de 265.3 \pm 19.8 % del control (p<0.001) estimulando el nervio frénico y de 247.7 \pm 22.1 % del control (p<0.001) con estímulo directo, tras un periodo de latencia de 186.7 \pm 14.7 segundos. Dosis superiores disminuían el efecto contráctil. Así, con neostigmina 1 μ M en 8 min. se alcanzaba una altura contráctil máxima respectivamente de 218.4 \pm 15.8 % de la amplitud control (p<0.01) con estímulo indirecto y de 212.0 \pm 17.9 % del control (p<0.01) con estímulo directo y con neostigmina 10 μ M causaba a los 30 min. un decremento contráctil adicional, que era respectivamente de 92.3 \pm 9.5 % del control y 90.2 \pm 9.2 % de la amplitud control con estímulo indirecto y directo.

En la evolución de las relaciones del TOF (tabla G-IV) había una altura máxima de T'1 con dosis 0.1 μ M de neostigmina (tabla G-II) que disminuía de forma tiempo y dosis-dependiente. La

relación $T'4/T'1$ era de 0.70 con dosis $0.1 \mu\text{M}$, de 0.53 con dosis $1 \mu\text{M}$ de neostigmina y con dosis $10 \mu\text{M}$, inicialmente era de 0.78 y se aproximaba al valor de la unidad, de forma tiempo dependiente por el efecto desensibilizante del exceso de neostigmina (Bowman, 1980).

B) Acción de ranitidina después de neostigmina.

En hemidiafragmas aislados de rata estimulando el nervio frénico neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ en dosis única producía un incremento contráctil máximo de $258.6 \pm 23.7 \%$ del control ($p < 0.001$) en 9 min. y la adición posterior de ranitidina $100 \mu\text{M}$ al baño de órganos, deprimía lentamente este valor un 25.5% en aproximadamente 11 min. (tabla G-I), hasta alcanzar una altura contráctil de $232.8 \pm 27.9 \%$ del control ($P < 0.01$).

El tren de a cuatro (TOF) presentaba con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ una relación $T'4/T'1$ de 0.83 y ranitidina $100 \mu\text{M}$ después no lo modificaba, relación $T'4/T'1$ 0.84 (tabla G-IV). Ranitidina también disminuía ligeramente la altura del TOF causada por neostigmina (fig. G-1 y tabla G-II). El valor del tétanos de 50 Hz durante 5 seg. disminuía hasta alcanzar una altura contráctil de $94.4 \pm 8.8 \%$ del control con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ y ranitidina $100 \mu\text{M}$ después producía una respuesta tetánica prácticamente anulada (fig. G-2), con una altura contráctil de $8.7 \pm 3.5 \%$ del control ($p < 0.001$).

C) Acción de neostigmina después de ranitidina.

Cuando se invertía el orden de adición al medio nutricional de ranitidina y neostigmina, los efectos contráctiles eran diferentes. Con ranitidina 100 μM el incremento contráctil máximo era en 4 min. de 165.3 ± 15.3 % del control ($p < 0.01$) y neostigmina 0.1 μM después producía una altura contráctil mayor, de 181.0 ± 17.5 % del control ($p < 0.01$) en cerca de 26 min. (tabla G-I).

T A B L A G-I

Acción de neostigmina 0.1 μM y de ranitidina 100 μM sobre la tensión contráctil en el hemidiafragma de rata, con estímulo indirecto en solución Tyrode normal $[\text{K}^+]_o$ 2.7 mM e hiperpotásico $[\text{K}^+]_o$ 8.1 mM.

Altura contráctil	Tyrode normal	Tyrode hiperpotásico
control	100.0	100.0
Ranitidina sola	$165.3 \pm 15.3^{**}$	122.7 ± 15.7
Neostigmina después de ranitidina	$181.0 \pm 17.5^{**}$	104.9 ± 13.8
Neostigmina sola.	$258.3 \pm 23.7^{**}$	119.3 ± 10.9
Ranitidina después de neostigmina	$232.8 \pm 27.9^{**}$	94.1 ± 13.3

Todos los datos eran la media \pm e.s.m. de $n = 6$ exptos.
Significación: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Con ranitidina 100 μM la relación $T'4/T'1$ era de 0.79, la más baja de todos los TOF de Tyrode normal (fig.G-1) y la adición

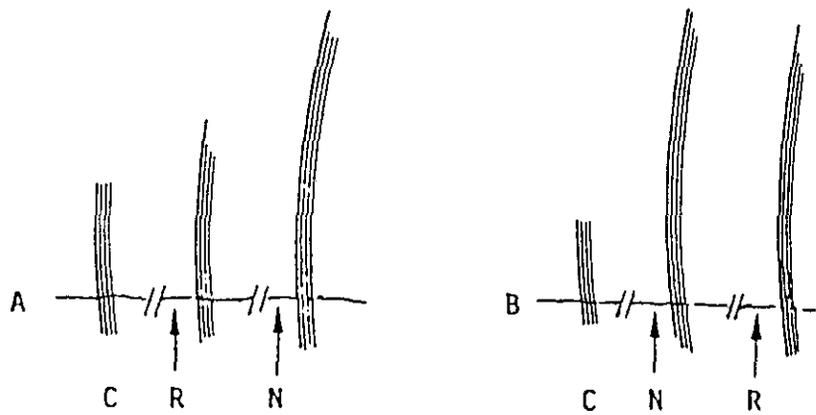


Fig. G-1.-Registros del TOF control (C), ranitidina (R) 100 μ M y neostigmina (N) 0.1 μ M en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con Tyrode normal, segun el orden de adiccion al medio nutritivo.

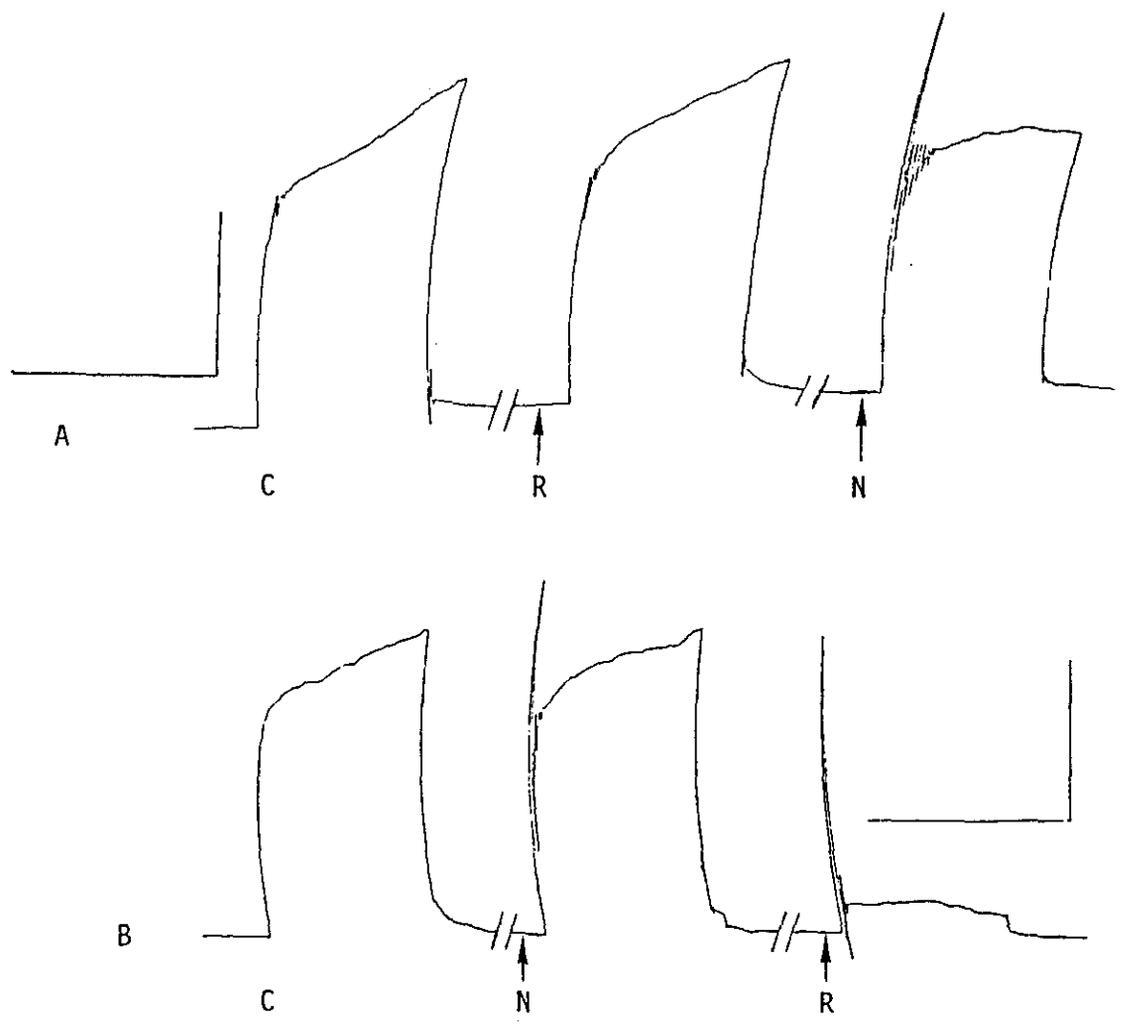


Fig. G-2.-Evolucion del tetanus segun el orden de adiccion al medio con Tyrode normal de ranitidina (R) 100 μ M y neostigmina (N) 0.1 μ M en relacion al control (C), en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Calibracion 6 s. y 2 g.

posterior de neostigmina 0.1 μM lo incrementaba a 0.84 (tabla G-IV). La altura contráctil del TOF con ranitidina 100 μM era cerca del 50% menor que con neostigmina 0.1 μM y la adicción de neostigmina después de ranitidina incrementaba el valor del TOF de ranitidina sola (tabla G-II). El tétanos con ranitidina 100 μM tenía una altura de 108.5 ± 6.0 % del control, mientras que neostigmina 0.1 μM después disminuía este valor hasta 87.8 ± 6.2 % del control (fig. G-2).

D) Acción contráctil comparativa de ranitidina y neostigmina.

Ranitidina en dosis única (100 μM) causaba un incremento contráctil instantáneo, que era máximo en unos 4 min., de 165.3 ± 15.3 % del control ($p < 0.01$) y 162.5 ± 16.9 % del control ($p < 0.01$) respectivamente con estímulo indirecto y directo. Ranitidina a dosis < 10 μM no causaba incremento de la contracción. Paralelamente neostigmina a dosis < 0.01 μM no incrementaba la contracción en el hemidiafragma de rata, pero a concentración 0.1 μM tras una latencia de 3.2 min. causaba un incremento contráctil máximo en unos 9 min., de 258.3 ± 23.7 % del control ($p < 0.01$) y 247.7 ± 22.1 % de la amplitud control ($p < 0.01$) respectivamente con estímulo indirecto y directo. Dosis de neostigmina > 0.1 μM causaban disminución de la contracción. Se intentó obtener menor efecto con menores dosis, siendo imposible por: a) la larga latencia; b) respuesta similar al todo o nada, es decir con dosis por debajo de 0.1 μM había unas veces si y

otras no respuesta máxima y c) desglosando 0.01 μM ó 0.1 μM en subdosis acumulativas no fué posible obtener curva dosis respuesta. Ranitidina a dosis altas como 1 mM no alcanzaba el incremento contráctil máximo de neostigmina, aunque la morfología de los efectos era superponible. Por otro lado, cuando la duración de los estímulos en vez de 0.2 ms (todo este trabajo) era 2 ms., en la CDR de ranitidina había también efectos depresores a dosis altas de 1 mM.

TABLA G-II

Altura contráctil del TOF (T1, T2, T3 y T4) por neostigmina (Neos.) y ranitidina (Ran.) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode normal. Todos los valores representan el % de la media y el error estándar de la media ($\bar{x} \pm \text{e.s.m.}$) de n=6 exptos.

Altura contráctil	T1	T2	T3	T4
Control T4=100	100.0	100.0	100.0	100.0
Neos. 0.1 μM	267.0 \pm 17.4**	239.8 \pm 16.9**	228.5 \pm 16.6**	223.2 \pm 9.5**
Ran. 100 μM después de neos. 0.1 μM	254.7 \pm 17.7**	230.3 \pm 14.4**	219.0 \pm 16.1**	215.4 \pm 10.8**
Ran. 100 μM	146.2 \pm 8.9**	128.2 \pm 6.7*	120.6 \pm 8.5	116.5 \pm 5.3
Neos. 0.1 μM después de ran. 100 μM	151.8 \pm 6.8**	133.4 \pm 4.7*	129.6 \pm 6.5*	128.5 \pm 5.4*

Todos los datos eran la media \pm e.s.m. de n= 6 exptos.
Significación: * p<0.05; ** p<0.01

5.2) Acción de ranitidina y neostigmina en hemidiafragmas de rata aislados en solución Tyrode hiperpotásico (8.1 mM).-

A) Acción de ranitidina después de neostigmina.

El incremento de $[K^+]_o$ de 2.7 mM a 8.1 mM en la solución Tyrode, causaba un ligero aumento de la contracción al estímulo indirecto. Neostigmina 0.1 μ M tenía un periodo de latencia, de unos 3.3 min., seguido de un incremento contráctil rápido, de 119.3 ± 10.9 % del control, en 2.5 min. y después había una disminución suave y prolongada, que era a los 10 min. de una altura contráctil de 106.4 ± 3.4 % del control. Ranitidina 100 μ M después de neostigmina 0.1 μ M producía una pequeña y lenta disminución de la altura contráctil, que era aproximadamente a los 14 min. de 94.1 ± 13.3 % del control (tabla G-I).

La evolución del TOF (fig. G-3) presentaba típicamente una disminución de T'2 mayor que T'3 tanto en presencia de neostigmina 0.1 μ M sola como de ranitidina 100 μ M después de neostigmina 0.1 μ M y las relaciones respectivas de T'3/T'2 en vez de ser menor de la unidad como en Tyrode normal era mayor. El menor valor contráctil de ambos fármacos se producía con T'2 de ranitidina 100 μ M después de neostigmina 0.1 μ M y el mayor valor era de T'1 de neostigmina 0.1 μ M sola. Los valores del TOF tenían escasa variación en presencia de uno o ambos fármacos en este orden de adición (tabla G-III). Así con neostigmina 0.1 μ M la relación T'3/T'2 era 1.10, mayor que con la adición posterior de ranitidina 100 μ M (con relación de 1.01), que diferían de las

relaciones similares del TOF en Tyrode normal, siempre inferiores a la unidad (tabla G-IV). El tétanos de 50 Hz durante 5 segundos

TABLA G-III

Altura contráctil del TOF (T1, T2, T3 y T4) por neostigmina y ranitidina en hemidiafragma de rata con solución Tyrode hiperpotásica [K⁺]_o 8.1 mM.

Altura contráctil	T1	T2	T3	T4
Control T4=100 %	100.0	100.0	100.0	100.0
Neos. 0.1 μ M	91.0 \pm 8.5	80.3 \pm 12.1	88.9 \pm 10.0	88.9 \pm 10.0
Ran. 100 μ M después de Neos. 0.1 μ M	80.3 \pm 8.5	77.1 \pm 11.0	78.5 \pm 10.3	77.8 \pm 11.2
Ran. 100 μ M	109.8 \pm 19.3	113.1 \pm 21.6	111.8 \pm 21.3	110.1 \pm 21.2
Neos. 0.1 μ M después de Ran. 100 μ M	101.3 \pm 23.6	97.0 \pm 24.5	101.6 \pm 24.2	102.2 \pm 24.5

Todos los valores representan el % de la media y el error estándar de la media (x \pm e.s.m.) de n=6 exptos.

decrecía con neostigmina 0.1 μ M, alcanzando una altura contractil de 73.0 \pm 6.4 % del control (p<0.05) y prácticamente se anulaba con la adición posterior al baño nutricio de ranitidina 100 μ M, con una altura contráctil de 3.0 \pm 0.2 % del control (p<0.001) (fig. G-4).

B) Acción de neostigmina después de ranitidina en solución Tyrode hiperpotásica, [K⁺]_o 8.1 mM.

Ranitidina 100 μ M en la preparación frénico-diafragma indirectamente estimulada tenía un incremento contráctil

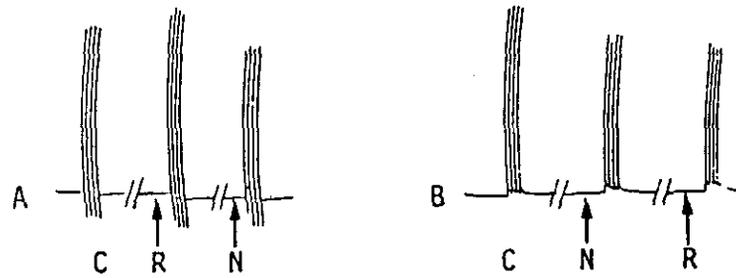


Fig. G-3.-Registros típicos del TOF en diafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode hiperpotásico [K+]o 8.1 mM, adicionando en A neostigmina (N) 0.1 μ M y después ranitidina (R) 100 μ M y en B en orden inverso.

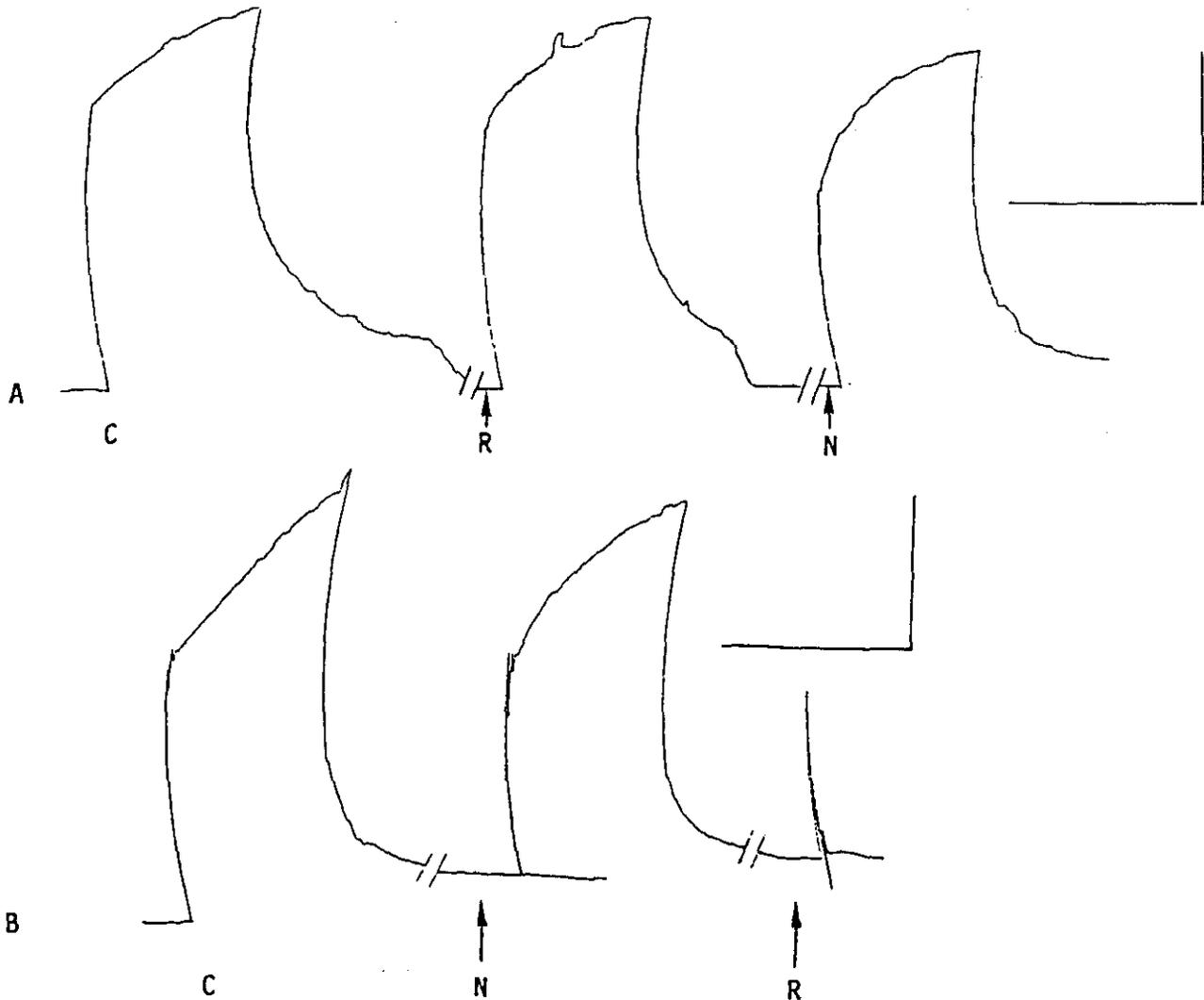


Fig. G-4.-Evolución del tétanos control (C) en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados con solución Tyrode con K+ 8.1 mM, según el orden de adición al medio de ranitidina (R) 100 μ M y neostigmina 0.1 μ M. Calibración 6 s. y 2 g.

bifásico, que era en cerca de 1 min. de 122.7 ± 15.7 % del control, con descenso posterior, alcanzando una altura la contracción de 108.7 ± 6.3 % del control en unos 10 min. Con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ después de ranitidina había también un pequeño descenso contráctil adicional, que era a los 15 min. de 104.9 ± 13.8 % del control (tabla G-I) .

Si se compara la acción contráctil de ranitidina y neostigmina en medio hiperpotásico (Tabla G-I), se deduce que ambos fármacos la tienen muy amortiguada, si bien ranitidina tenía un incremento contráctil mayor que neostigmina.

TABLA G-IV

Indices del tren de a cuatro (TOF) en solución Tyrode normal e hiperpotásica $[\text{K}^+]_o$ 8.1 mM, en presencia de neostigmina (N) $0.1 \mu\text{M}$ y/o ranitidina (R) $100 \mu\text{M}$. RN ranitidina después de neostigmina. NR neostigmina después de ranitidina. T1, T2, T3 y T4 son valores del TOF sin fármacos y T'1, T'2, T'3 y T'4 en presencia de fármacos.

Relación	Tyrode normal				Tyrode hiperpotásico			
	N	RN	R	NR	N	RN	R	NR
T4/T1 control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T'1/T1	2.67	2.54	1.46	1.51	0.91	0.80	1.09	1.01
T'2/T1	2.39	2.30	1.28	1.33	0.80	0.77	1.13	0.97
T'3/T1	2.28	2.19	1.20	1.29	0.88	0.78	1.11	1.08
T'4/T1	2.23	2.15	1.16	1.28	0.88	0.77	1.10	1.02
T'2/T'1	0.89	0.90	0.87	0.87	0.88	0.96	1.03	0.95
T'3/T'2	0.95	0.95	0.94	0.97	1.10	1.01	0.98	1.04
T'4/T'1	0.83	0.84	0.79	0.84	0.97	0.96	1.00	1.00
T'4/T'3	0.97	0.98	0.96	0.99	1.00	0.99	0.98	1.00

Nótese que en medio hiperpotásico las relaciones del TOF se acercan a la unidad.

Ranitidina $100 \mu\text{M}$ sola, a diferencia de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$

sola, producía en las relaciones del TOF un incremento contráctil máximo en T'2 (fig. G-3) y el decremento máximo era también de T'2 en presencia de neostigmina 0.1 μ M después de ranitidina 100 μ M (tabla G-III). Las relaciones del TOF eran mayores o iguales a la unidad, excepto T'3/T'2 y T'4/T'3 de ranitidina sola, así como T'2/T'1 y T'2/T1 de neostigmina después de ranitidina (tabla G-IV). El valor del tétanos no variaba o lo hacía tenuamente, tanto en presencia de ranitidina 100 μ M como en presencia de la adición posterior de neostigmina 0.1 μ M, que era respectivamente de 101.6 ± 7.3 % del control y 90.5 ± 5.6 % del control (fig. G-4).

6. ACCIÓN CONTRACTIL ANTICURARE COMPARATIVA DE RANITIDINA Y NEOSTIGMINA FRENTE A ATRACURIO.

6.A) Hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en solución Tyrode normal.-

6.A.1) Acción de atracurio solo.-

Después de 15 min atracurio 8 μ M disminuía la contracción por estímulo indirecto a 62.1 ± 6.6 % de la amplitud control ($P < 0.05$) $n=6$, (tabla H-I). Como se muestra en fig. H-1, atracurio a esta concentración disminuía la contracción significativamente (tabla H-II) de forma dosis y tiempo-dependiente.

TABLA H-I

Altura contráctil máxima y tétanos de ranitidina (R) 100 μ M, neostigmina (N) 0.1 μ M según el orden de administración al baño, después de atracurio (A) 8 μ M a los 15 min., en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados, en solución Tyrode normal.

Altura	contracción		tétanos	
	g. tensión	%	g. tensión	%
Control	1.96 ± 0.22	100.0	3.94 ± 0.19	100.0
A	1.22 ± 0.24	$62.1 \pm 6.6^*$	$0.00 \pm 0.00^{***}$	$0.0 \pm 0.0^{***}$
AR	1.47 ± 0.34	72.9 ± 9.6	$0.12 \pm 0.04^{***}$	$3.0 \pm 0.7^{***}$
ARN	1.53 ± 0.30	75.0 ± 8.9	$0.38 \pm 0.11^{***}$	$9.6 \pm 1.7^{***}$
AN	1.73 ± 0.33	88.3 ± 9.5	$0.17 \pm 0.02^{***}$	$4.3 \pm 0.4^{***}$
ANR	2.49 ± 0.38	127.2 ± 11.4	$0.27 \pm 0.04^{***}$	$6.8 \pm 0.6^{***}$

A=atracurio solo; AR=ranitidina después de atracurio; ARN= Atracurio seguido de ranitidina y después neostigmina; AN= neostigmina después de atracurio; ANR atracurio seguido de neostigmina y después ranitidina. Los datos eran la mediate.s.m. de $n=6$ exptos. Significación: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $p < 0.001$.

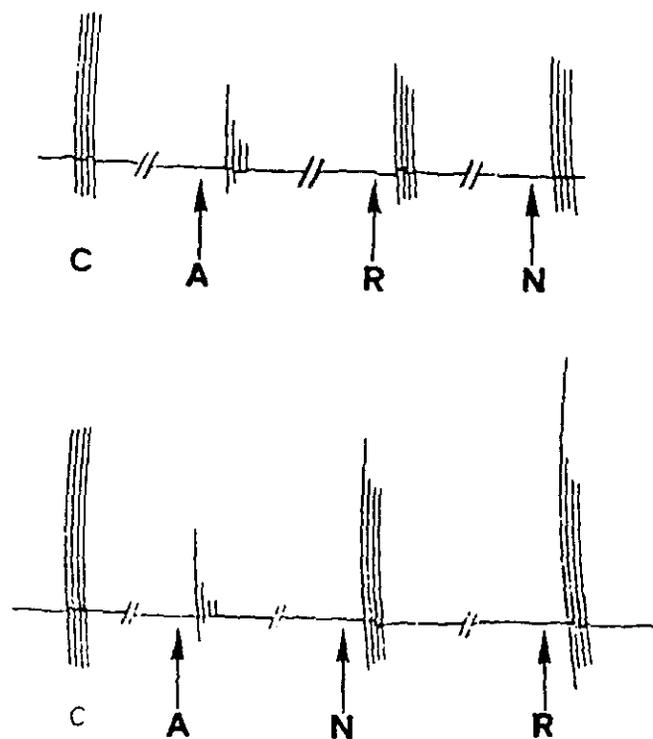


Fig. H-1.-Registros del TOF de atracurio $8 \mu\text{M}$ (A), seguido de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ (N) y ranitidina $100 \mu\text{M}$ (R), según el orden de adición al líquido nutritivo Tyrode normal, en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados.

Las relaciones del TOF eran de tendencia a disminuir (fig. H-1) también de forma dosis y tiempo-dependiente. Asimismo, después de 15 min. de la adicción de atracurio al baño la "ratio" T'4/T1 de 0.18 era la mas sensible a la curarización y la menos sensible era T'4/T'3 de 0.98 (tabla H-III).

TABLA H-II

Altura contráctil del tren de a cuatro (TOF) de atracurio 8 μ M a los 15 min, seguido de ranitidina 100 μ M, y neostigmina 0.1 μ M en el hemidiafragma de rata con estimulo indirecto en solución Tyrode normal.

Altura contráctil	T1	T2	T3	T4
Control T4=100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
A	55.9±6.8*	29.0±3.1***	20.4±3.5***	18.3±3.6***
AR	75.5±9.7	63.9±8.3*	55.9±6.9*	52.5±9.0**
ARN	76.7±9.2	68.5±4.7*	63.6±3.5*	61.4±4.4*
AN	87.9±11.5	75.2±12.5	70.7±12.4	69.4±11.5
ANR	121.3±16.7	84.1±14.9	75.2±12.9	72.9±9.6

Símbolos como en tabla H-I. Los datos eran la media \pm e.s.m. de n=6 exptos. Significación: *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.001.

La estimulación indirecta a 50 Hz durante 5 seg. causaba anulaci3n del t3tanos, muy significativa (P<0.001), (tabla H-I) y en su lugar hab3a una contracci3n fugaz, mostrada en figs. H-2

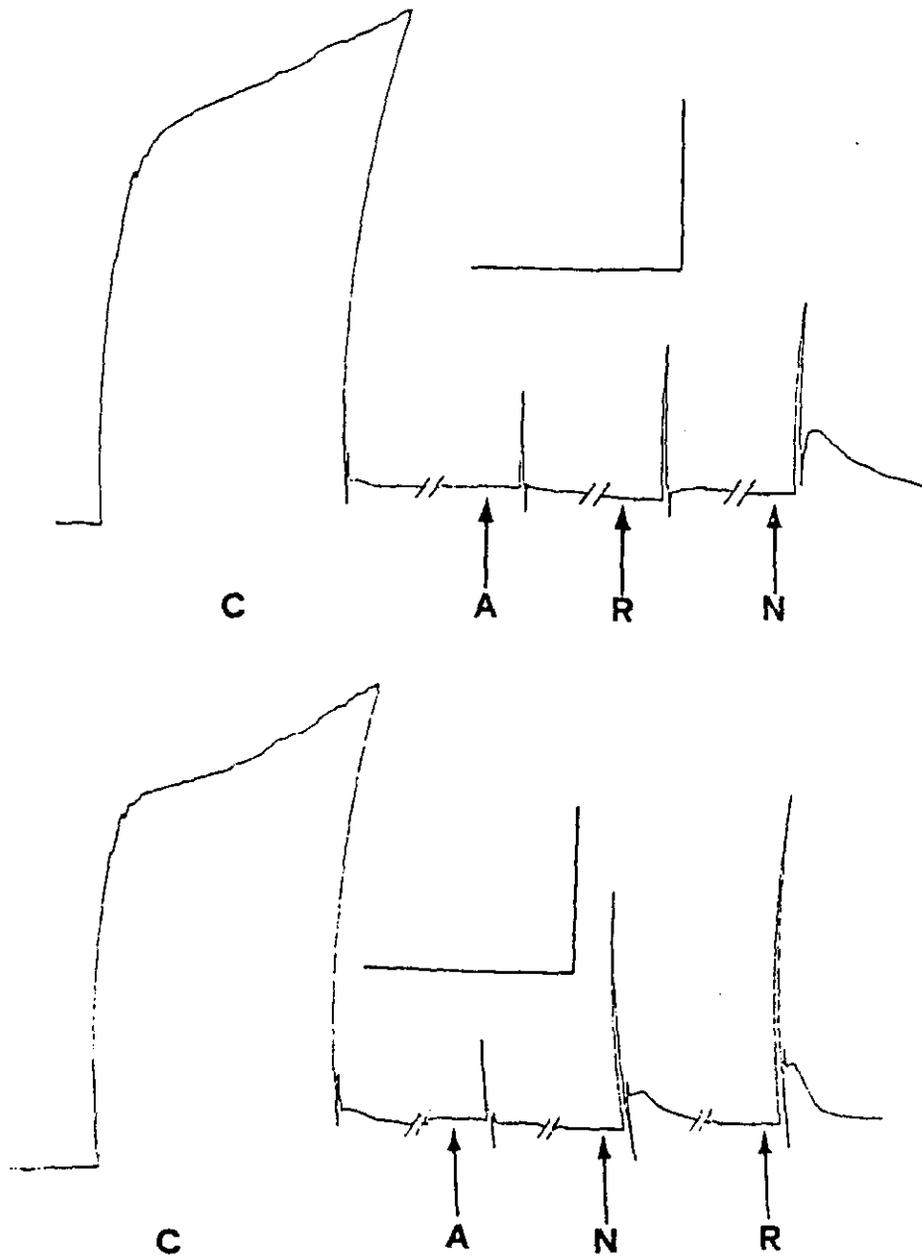


Fig. H-2.-Evolución del tétanos de atracurio $8 \mu\text{M}$ (A), seguido de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ (N) y ranitidina $100 \mu\text{M}$ (R), según el orden de adicción al líquido nutricio Tyrode normal en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Calibración 6 s. y 2 g.

6.A.2) Acción anticurare de ranitidina después de neostigmina.-

Atracurio después de 15 minutos de su adición al medio nutricional causaba una disminución de altura contráctil de 62.1 ± 6.6 % del control ($p < 0.05$). Neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ después de atracurio causaba un progresivo incremento de la contracción hasta 88.3 ± 9.5 % de la amplitud control en 11.6 min. aprox. que era seguido de un incremento contráctil adicional hasta 127.2 ± 11.4 % del control con la adición posterior al líquido nutricional de ranitidina $100 \mu\text{M}$. El incremento contráctil por ranitidina era también instantáneo tras su adición al baño y el máximo efecto se presentaba en 4 min.

Tabla H-III

Indices comparativos del tren de acuatro (TOF) de atracurio (A) $8 \mu\text{M}$ solo a los 15 min., seguido de ranitidina $100 \mu\text{M}$, y neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ en el hemidiafragma de rata con estímulo indirecto en solución Tyrode normal.

Relación	A	AN	ANR	AR	ARN
T4/T1 control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T'1/T1	0.56	0.88	1.21	0.75	0.77
T'2/T1	0.29	0.75	0.84	0.64	0.68
T'3/T1	0.20	0.71	0.75	0.56	0.64
T'4/T1	0.18	0.69	0.73	0.52	0.61
T'2/T'1	0.51	0.85	0.69	0.84	0.89
T'3/T'2	0.70	0.94	0.89	0.87	0.92
T'4/T'1	0.32	0.78	0.60	0.69	0.80
T'4/T'3	0.89	0.98	0.96	0.93	0.96

Símbolos como en tabla H-I.

Neostigmina y ranitidina incrementaban la altura de las contracciones del TOF (fig. H-1 y tabla H-II). Con neostigmina 0.1 μM la relación $T'4/T'1$ era 0.78, en contraste con la adición posterior de ranitidina 100 μM que la disminuía a 0.60 (tabla H-III). Un ejemplo de las respuestas del TOF en presencia de atracurio seguido de neostigmina y después ranitidina se muestran en fig. H-1. Con este orden la acción anticurárica era de gran potenciación, mostrado en la mayor altura del TOF y en su gradiente contráctil.

La anulación del tétanos por atracurio 8 μM se incrementaba poco por neostigmina 0.1 μM e igualmente con ranitidina después de neostigmina (fig H-2 y tabla H-I).

6.A.3) Acción anticurárica de neostigmina después de ranitidina.-

Neostigmina después de ranitidina no tenían una significativa potenciación contráctil anticurárica. Así, atracurio 8 μM a los 15 min. disminuía la contracción a 58.2 ± 7.1 % del control ($p < 0.05$) y ranitidina 100 μM lo incrementaba a 72.9 ± 9.6 % del control en unos 4 min. Neostigmina 0.1 μM después de ranitidina 100 μM causaba en alrededor de unos 7 min. un pequeño incremento contráctil adicional hasta 75.0 ± 8.9 % del control (tabla H-I).

El incremento de los estímulos del TOF (fig. H-3) era en este orden $T'4 > T'3 > T'2 > T'1$ (tabla II); la menor relación era $T'4/T'1$ de 0.69 con ranitidina 100 μM después de atracurio y con

neostigmina 0.1 μ M después de ranitidina se incrementaba a 0.80 (tabla H-III).

El tétanos deprimido por atracurio tenía un pequeño incremento tanto por ranitidina sola como con neostigmina después de ranitidina (fig. H-2 y tabla H-I)

6.B) Hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en solución Tyrode hiperpotásica, (K⁺ 8.1 mM).-

6.B.1) Acción de atracurio solo.

Después de 15 min. de la adicción al líquido nutricio de atracurio 8 μ M, la contracción por estímulo indirecto disminuía a 79.3 \pm 5.4 % del control de forma tiempo dependiente.

Las relaciones del TOF también disminuían de forma tiempo-dependiente con atracurio, siendo la más sensible a la curarización T'₄/T₁ de 0.45 y la menos sensible T'₄/T'₃ de 0.99 (tabla H-III).

La estimulación repetitiva a 50 Hz durante 5 seg. causaba una una significativa (p<0.001) anulación del tétanos (tabla H-I) y en su lugar aparecía una contracción fugaz (figs H-4).

6.B.2) Acción anticurare de ranitidina después de neostigmina.

Neostigmina 0.1 μ M adicionada al baño nutricio después del

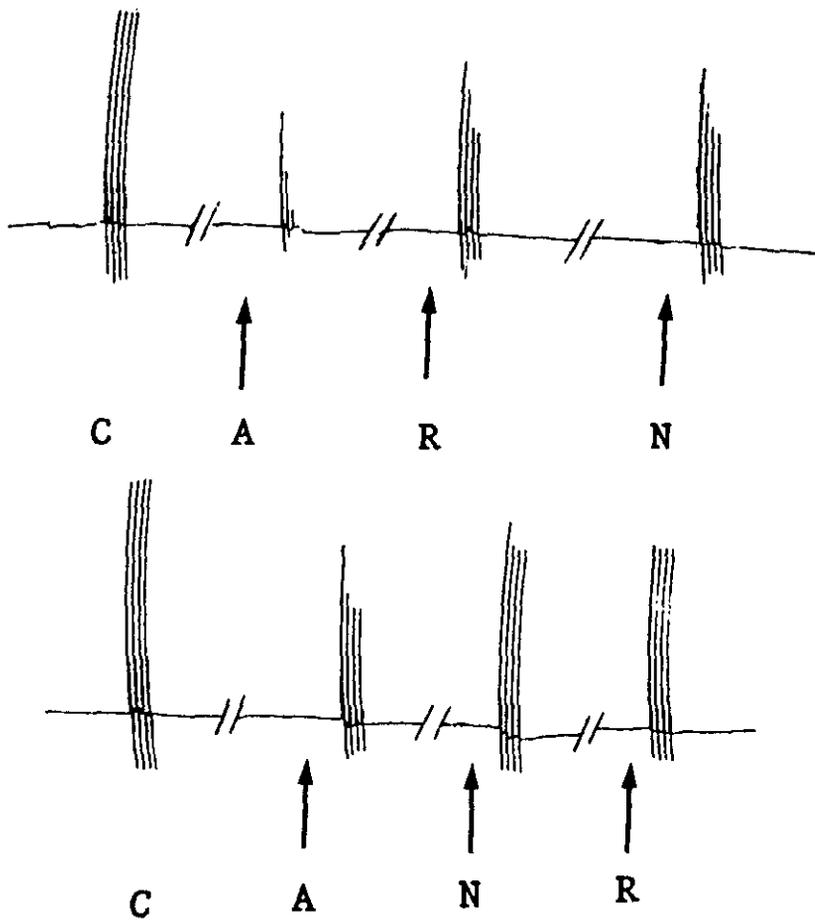


Fig. H-3.-Registros del TOF de atracurio $8 \mu\text{M}$ (A), seguido de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ (N) y ranitidina $100 \mu\text{M}$ (R), según el orden de adicción al líquido nutritivo Tyrode con K^+ 8.1 mM , en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados.

efecto de atracurio 8 μM inmediatamente incrementaba la contracción hasta un máximo de 96.7 ± 7.2 % del control en aprox. 12 min. Ranitidina 100 μM después de neostigmina disminuía la altura contráctil a 89.1 ± 9.7 % del control (tabla H-I) después de 4 min.

TABLA H-IV

Altura contráctil máxima y tétanos de ranitidina (R) 100 μM , y neostigmina (N) 0.1 μM después de atracurio (A) 8 μM , según el orden de administración al baño, en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados, en solución Tyrode hiperpotásica.

Altura contráctil	contracción		tétanos	
	g. tensión	%	g. tensión	%
Control	1.84 ± 0.11	100.0	4.10 ± 0.09	100.0
A	$1.46 \pm 0.10^*$	$79.3 \pm 5.4^*$	$0.00 \pm 0.00^{***}$	$0.0 \pm 0.0^{***}$
AR	1.80 ± 0.14	98.3 ± 8.6	$0.00 \pm 0.00^{***}$	$0.0 \pm 0.0^{***}$
ARN	1.81 ± 0.17	98.2 ± 9.0	$0.00 \pm 0.00^{***}$	$0.0 \pm 0.0^{***}$
AN	1.78 ± 0.18	96.7 ± 9.7	$0.35 \pm 0.11^{***}$	$8.5 \pm 1.7^{***}$
ANR	1.64 ± 0.25	89.1 ± 3.8	$0.58 \pm 0.15^{***}$	$14.1 \pm 2.3^{***}$

Símbolos como en tabla H-I. Todos los datos eran la mediate.s.m. de n=6 exptos. Significación: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tanto neostigmina como ranitidina incrementaban todas las relaciones del TOF, que eran con T'4/T'1 respectivamente de 0.91 y 0.92 (tabla H-III). Un ejemplo de las respuestas mecánicas del TOF en presencia de neostigmina y después ranitidina en su acción anticurárica se muestran en fig. H-3.

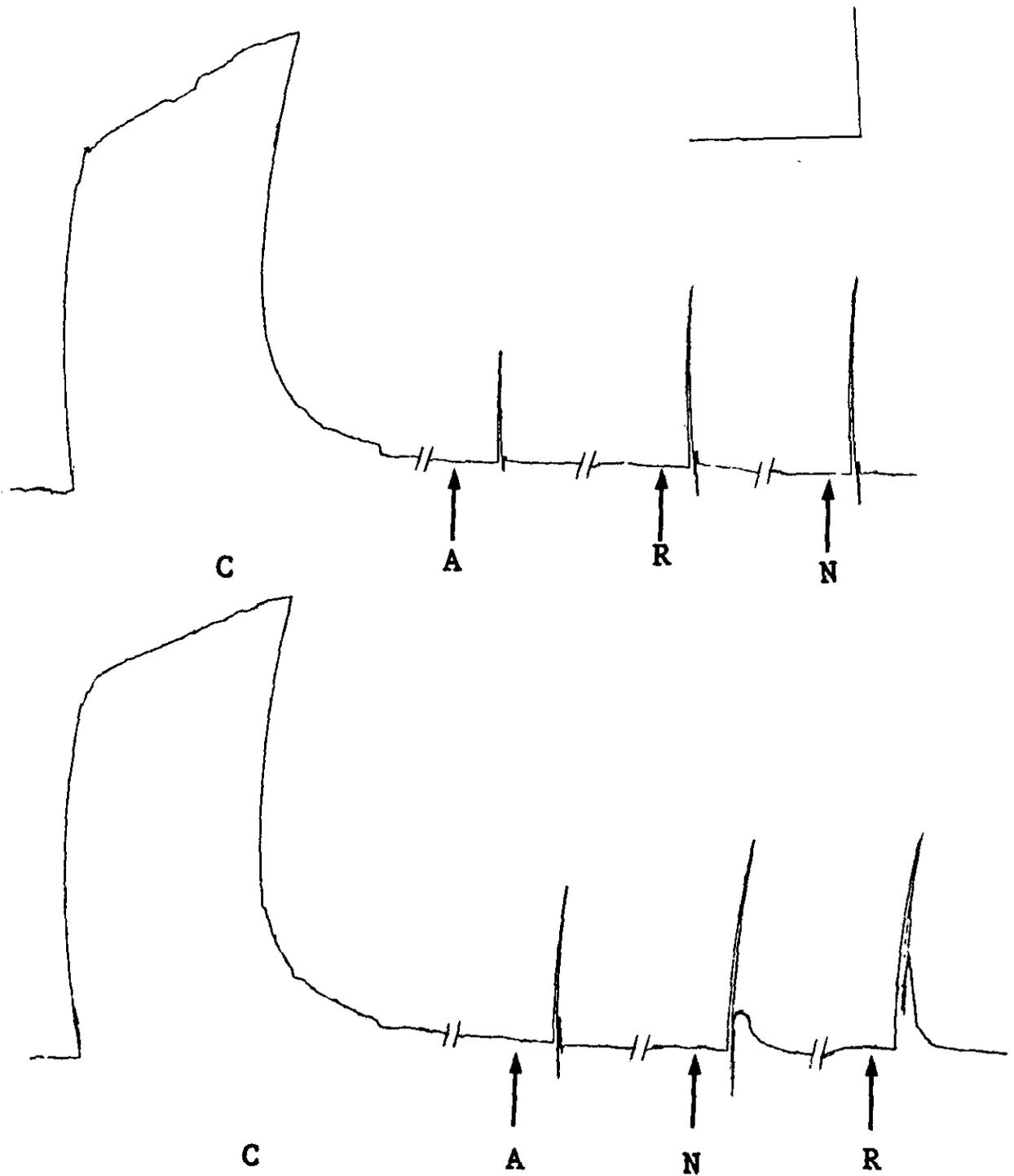


Fig. H-4.-Evolución del tétanos de atracurio $8 \mu\text{M}$ (A), seguido de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ (N) y ranitidina $100 \mu\text{M}$ (R), según el orden de adicción al líquido nutritivo Tyrode con K^+ 8.1 mM , en hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados. Calibración 6 s. y 2 g.

TABLA H-V

Altura contráctil del tren de a cuatro (TOF) de atracurio 8 μ M a los 15 min, seguido de ranitidina 100 μ M, y neostigmina 0.1 μ M en el hemidiafragma de rata con estímulo indirecto en solución Tyrode hiperpotásica.

Altura contráctil	T1	T2	T3	T4
Control T4=100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
A	78.5 \pm 7.3*	54.9 \pm 5.4***	46.0 \pm 5.4***	45.8 \pm 5.4***
AR	71.8 \pm 7.2**	52.2 \pm 7.2***	43.2 \pm 6.1***	40.8 \pm 5.1***
ARN	71.1 \pm 6.1**	54.9 \pm 5.8***	47.0 \pm 5.1***	44.3 \pm 4.4***
AN	92.4 \pm 7.5	86.9 \pm 7.0	84.2 \pm 6.8	84.2 \pm 6.8
ANR	84.0 \pm 10.7	79.8 \pm 9.1	77.7 \pm 8.1	78.0 \pm 8.6

Símbolos como en tabla H-I. Todos los datos eran la mediate.s.m. de n=6 exptos. Significación: *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.001.

El tétanos anulado por atracurio, se recuperaba y era incrementado por neostigmina y aún más por la adicción posterior de ranitidina hasta alcanzar un 14.1 \pm 2.3 % del control, altura no alcanzada en solución Tyrode normal (Tabla H-IV).

6.B.3) Acción anticurare de neostigmina después de ranitidina.-

En la depresión contráctil por atracurio en solución Tyrode hiperpotásica, no se producía potenciación anticurárica por neostigmina y ranitidina en la contracción por estímulo indirecto al nervio frénico (tabla H-I), así la altura contráctil de

atracurio a los 15 min era de 79.3 ± 5.4 % del control y el incremento contráctil con ranitidina era de 98.3 ± 8.6 % del

Tabla H-VI

Indices comparativos del tren de a cuatro (TOF) de atracurio (A) $8 \mu\text{M}$ solo a los 15 min., seguido de ranitidina $100 \mu\text{M}$, y neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ en el hemidiafragma de rata con estímulo indirecto en solución Tyrode hiperpotásica.

Relación	A	AN	ANR	AR	ARN
T4/T1 control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
T'1/T1	0.78	0.92	0.84	0.71	0.71
T'2/T1	0.54	0.86	0.79	0.52	0.54
T'3/T1	0.46	0.84	0.77	0.43	0.47
T'4/T1	0.45	0.84	0.78	0.40	0.44
T'2/T'1	0.69	0.94	0.95	0.79	0.77
T'3/T'2	0.83	0.96	0.97	0.82	0.85
T'4/T'1	0.58	0.91	0.92	0.56	0.62
T'4/T'3	0.99	1.00	1.00	0.94	0.94

Símbolos como en tabla H-I.

control a los 4.5 min. aprox. y con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ después de ranitidina la altura contráctil era de 98.2 ± 9.0 % del control, prácticamente inalterada.

Aunque la relación T'4/T'1 del TOF es la que mejor indica reversión de la curarización y pasaba de 0.56 con ranitidina sola a 0.64 con neostigmina después de ranitidina, indicando mayor reversión (tabla H-III). El tétanos anulado por atracurio evolucionaba con recuperación de 3.0 ± 0.7 % de altura contráctil con ranitidina y 9.6 ± 1.7 % del control con neostigmina después de ranitidina (tabla H-I).

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSION.-

En la interacción de las variaciones iónicas con la acción contráctil de ranitidina en placa motora de rata se observaba que el incremento del $[K^+]_o$ de 2.7 mM a 5.4 mM disminuía el Emax de ranitidina y no había incremento contráctil en preparaciones despolarizadas por 8.1 mM de $[K^+]_o$. En estas circunstancias se incrementa la frecuencia del m.e.p.p. y se despolariza el potencial de membrana del músculo (Asai and col., 1.982). De esta manera ranitidina ejercía un pequeño efecto de incremento contráctil, acorde con el nuevo estado de despolarización-repolarización muscular. No está claro cómo se produce el proceso de acoplamiento excitación-contracción y el menor acortamiento de las proteínas contráctiles en la contracción causada por ranitidina aumentando $[K^+]_o$. La liberación de Ca^{++} del SR del músculo estriado se inactiva por despolarización de la membrana por K^+ o fijación de voltaje (Bowman, 1.980) al igual que en músculo cardíaco (Beeler and Reuter, 1.970).

Disminuyendo a la mitad y a un cuarto la $[Ca^{++}]_o$ del medio nutricio normal, el incremento contráctil máximo de ranitidina se deprimía proporcionalmente. También el Emax de ranitidina se deprimía aumentando al doble la concentración de $[Ca^{++}]$. Esta acción Ca^{++} -dependiente sugiere que se aumenta la entrada de Ca^{++} dentro del músculo y/o nervio, ya que llevan un curso paralelo el decremento de $[Ca^{++}]_o$ y la disminución de la fuerza contráctil de ranitidina por los estímulos directo e indirecto. Por ello cabe que ranitidina tenga un efecto mixto, a nivel de músculo y a nivel de nervio, incrementando Ca^{++} libre y

favoreciendo tanto el proceso contráctil muscular como la liberación de acetilcolina. Los inhibidores de canales de Ca^{++} También inhibían el efecto contráctil de ranitidina tanto con estímulo directo como con estímulo indirecto, por posible movilización del Ca^{++} en placa motora producido por ranitidina que favorecería su efecto contráctil]. Por otra parte, otros antihistamínicos H_2 como cimetidina y metiamida incrementan el influx de Ca^{++} en músculo cardíaco (Sawamura and col. 1.985) como resultado del incremento de AMP-c intracelular. Aunque la liberación de Ca^{++} del SR puede ser inducida también por compuestos con grupo reactivo SH (Martonosi, 1.984), se desconoce si este es el caso de ranitidina, que también lo posee.

El incremento contráctil de ranitidina se deprimía conforme se aumentaba $[Mg^{++}]_o$ de 0 mM a 6 mM y a 12mM. En el diafragma de rata, in vitro, el contenido cuantál de epp's era incrementado elevando $[Ca^{++}]_o$ y disminuido aumentando $[Mg^{++}]_o$ (Hubbard and col. 1968). No está claro la ausencia de contracción de ranitidina a dosis bajas seguida de disminución contráctil a dosis mayores de $10^{-4}M$ cuando se inhibía la neurotransmisión a nivel presináptico con alto $[Mg^{++}]_o$ y bajo $[Ca^{++}]_o$.

Por ello, el efecto contráctil de ranitidina en placa motora puede ser multifactorial. Este fármaco inhibe pseudocolinesterasa y más potentemente acetilcolinesterasa (Hansen and Bertl, 1983), de ahí que un efecto similar a prostigmina podría justificar algunos efectos que vemos en este trabajo. No obstante, ranitidina en nuestra preparación actúa instantáneamente, mientras que neostigmina presenta siempre una latencia. El efecto nicotínico estimulante en placa motora de ranitidina ha sido

explicado en base a la analogía estructural que presenta con el compuesto metilfurfuretonio, de efectos colinérgicos (Re and col., 1983). A su vez, estos compuestos tienen en común el grupo dimetilaminometil-furano-metil, estructuralmente similar a acetilcolina, que posibilitarían el que ranitidina se uniera a los mismos sitios: receptor nicotínico y enzima colinesterasa, teniendo en cuenta también que el nitrógeno terciario de ranitidina se puede cuaternizar a pH fisiológico. No obstante, ranitidina no sólo no sustituye a Ach como agonista nicotínico en el hemidiafragma de rata cuando se inhibe a nivel presináptico la liberación de Ach con el medio bajo en Ca^{++} y alto en Mg^{++} , sino que incluso deprime la contracción. Es por tanto posible el que sea preponderante la inhibición de colinesterasa.

Estos hechos entran en conflicto con otros resultados opuestos aparentemente, ya que ranitidina en la preparación músculo sartorio-nervio ciático de rana disminuye la frecuencia del contenido cuantal y amplitud de m.e.p.p. y e.p.p. (Re and Rossini, 1.984) debido a un bloqueo pre y postsináptico causado por este fármaco. Esta observación es debida a que los efectos colinérgicos de ranitidina no son ubicuos (Re and col 1.983), presentando incluso efectos anticolinérgicos, dependiendo del tejido y especie. En resumen, ranitidina tiene un efecto contráctil en músculo estriado, pero se precisan otros estudios para conocer su mecanismo de acción y el grado de interacción con otros efectos hipotéticos o ya conocidos como son: el aumento de Ca^{++} libre por disminución del Ca^{++} -bound, aumento de la liberación de acetilcolina, efecto agonista nicotínico muscular directo e inhibición de colinesterasa.

El principal efecto de los fármacos calcio-antagonistas en placa motora es la depresión contráctil por mecanismos pre y postsinácticos (Publicoiber and Duncan, 1979). En placa motora se han identificado receptores para estos fármacos (Reynolds and col., 1983; Fosset and col., 1983). Verapamil causa efectos neuromusculares, principalmente bloqueo contráctil en la rana (Kraynack and col., 1983), aunque en otras preparaciones como hemidiafragma de rata, carece de efecto para algunos autores (Bikhazi and col., 1982), debido a la falta de acción contráctil manifiesta a bajas dosis. En esta tesis se ensayó verapamil para conocer cómo modificaba la respuesta del antihistaminico H₂ ranitidina. Se observó una significativa disminución contráctil del efecto máximo de ranitidina por verapamil de tipo no competitivo y dosis dependiente como sigue: con 10⁻⁶ M de verapamil era cerca del 20 %; con 10⁻⁵ cerca del 40 % y con 10⁻⁴ aproximadamente el 90 %. Estos valores demuestran una interacción importante en placa motora de rata. También con dosis 10⁻⁴ M de verapamil había un efecto facilitador contráctil de ranitidina, ya que aumentaba muy precozmente la altura de las contracciones iniciales de ranitidina, de tal manera que si se hiciese una valoración con los controles latido a latido, los primeros 20-30 latidos por dosis 20 μ M de ranitidina tenían un significativo incremento cuando se añadía previamente verapamil al liquido nutricao. No tiene explicación fácil este notorio efecto facilitador contráctil, salvo una acción de tipo aminopiridina o calcio-ionóforo en músculo. Verapamil solo, no tenía un acción contráctil manifiesta en esta preparación, de ahí que muchos autores publican que carece de efectos a este nivel.

En nuestros resultados diltiazem tenía un efecto depresor contráctil más regular y menos potente que verapamil en su interacción con ranitidina, sobre todo a dosis altas. La depresión contractil por diltiazem era en este orden: $10^{-4} \text{ M} > 10^{-5} \text{ M} > 10^{-6} \text{ M}$ con una disminución contractil respectivamente de 48 %, 38 % y 22 % del control. Hay muchas publicaciones sobre el efecto de potenciación del bloqueo neuromuscular por calcio-antagonistas como verapamil y diltiazem por otros fármacos. El hecho de que verapamil tenga mayor efecto depresor neuromuscular que diltiazem puede ser debido a otros efectos de ambos como la acción anestésica local (Hay and Wadsworth, 1982) pero con un mayor efecto de este tipo con verapamil. Es también importante el efecto de incremento contráctil progresivo de los cuatro estímulos del TOF por verapamil 10^{-4} M solo, causando relaciones $T'/T' > 1$, igual que acontece con las aminopiridinas. La curva dosis-respuesta de ranitidina después de verapamil o diltiazem siempre causaba un decremento progresivo de las alturas del TOF. Con verapamil 10^{-4} M también la altura de los cuatro latidos del TOF disminuían proporcionalmente con dosis acumulativas de ranitidina hasta desaparecer el TOF con dosis 1 mM de ranitidina. Diltiazem también causaba disminución de los cuatro estímulos acoplados del TOF pero no había el efecto depresor tan intenso como con 10^{-4} M de verapamil a igual dosis. De nuestros resultados se deduce que verapamil tiene efecto depresor neuromuscular mayor que diltiazem en su interacción con ranitidina, acorde con lo encontrado por otros autores (Del Pozo and Baeyens, 1986). En común solo tienen el efecto depresor neuromuscular dosis-dependiente. En su mecanismo de acción es

posible que intervengan otros factores como la acción anestésica local además de la acción calcio-antagonista (Edeson and col., 1985), todavía mal conocidas, pero muy diferenciados según el tejido, especie animal y fármaco con el que interaccionan. Como ejemplo en el trabajo de Del Pozo and Baeyens (1986) el bloqueo neuromuscular inducido por neomicina era más potenciado por verapamil que diltiazem, mientras que el bloqueo neuromuscular por estreptomicina solo era potenciado por verapamil y no por diltiazem.

Los efectos de captopril en placa motora han sido escasamente publicados, debido a que carece de efectos contráctiles manifiestos. Captopril, al igual que enalapril, no afecta las contracciones del músculo gastrocnemio de rata, estimulando el nervio ciático (Matsumo and col. 1986). Se ha demostrado que captopril interfiere con la transmisión adrenérgica, vía acciones ambas uniones pre- y posynuncionales (Antonaccio and Kerwin, 1981; Chiva and col., 1982; Saruta, 1982), que no se ha asociado con un efecto angiotensin-dependiente, considerando la posibilidad del paso de Angiotensina I a Angiotensina II por enzima convertidor de angiotensina local.

Los efectos de angiotensina II en músculo son de incremento contráctil y con poca literatura (Wali, 1986), por lo que hoy día no es posible relacionar el efecto depresor que nosotros vemos de captopril, como un efecto antagonista del enzima convertidor de angiotensina a nivel de placa motora. No obstante, el efecto de captopril puede estar en relación con cierto efecto calcio-antagonista, ya que al actuar en solución con bajo calcio

el efecto depresor se incrementa y con más calcio el efecto depresor se atenúa. Angiotensina II, al igual que otros péptidos pueden modificar la transmisión neuromuscular (Wali, 1.985). También es escasa la literatura sobre efectos de los neuropéptidos en la placa motora (Steinacker, 1.977; Akasu and col. 1.983; Wali, 1.985). Así las endorfinas están presentes en la vecindad de la unión neuromuscular, pueden modificar la transmisión neuromuscular, inhibiendo acetilcolinesterasa (Haynes and Smith, 1.982). Captopril interacciona con morfina posiblemente por un efecto inhibitorio del enzima degradante de encefalinas (Oktay and col. 1.981) y disfunción neurológica se ha visto en pacientes asociando cimetidina y captopril (Atkinsons and col. 1.980). Angitensina II incrementa la contracción en el músculo diafragma de rata, efecto que no es inhibido por saralasin en administración previa. En cambio, la disminución de calcio en el baño nutricional, causa disminución del efecto contráctil de angiotensina indicando que el efecto de angiotensina es calcio-dependiente (Wali, 1986). Por otro lado, en músculo uterino de rata, tanto verapamil como la disminución de calcio del baño nutricional disminuye el efecto estimulante de angiotensina II (Freer, 1975). En nuestros resultados captopril tenía poco efecto sobre la acción contráctil de ranitidina en la contracción por estímulo indirecto, pero cuando el músculo se despolarizaba por potasio el efecto contráctil de ranitidina era significativamente disminuido. Por otro lado, la disminución de calcio en el líquido nutricional también causaba una depresión contráctil importante de ranitidina. Es conocido el hecho de que la liberación de Ca^{++} del SR del músculo estriado se inactiva por

despolarización de la membrana por K^+ o fijación de voltaje (Bowman, 1.980) y cuanto menor es el calcio activo para la contracción, menor es esta. Las variaciones del TOF por captopril en relación con ranitidina sola eran pequeñas pero con tendencia a una menor gradiente de altura contractil con mayores dosis de captopril. El tétanos tenía poca variación pero interfería con la altura contráctil máxima de ranitidina, era menor en los casos que se aplicaba tétanos que en los que se obviaba. En la potenciación posttetánica (PTT) había también escasa variación pero con dosis 10^{-4} M de captopril había una disminución significativa de esta con dosis de ranitidina $100 \mu M$ y 1 mM , hipotéticamente las reservas de Ach disponible para la contracción disminuyen al final más que en otros protocolos con menor dosis de captopril, ya que inicialmente había mayor incremento de la PTT.

Comparando la acción contráctil de neostigmina sola con neostigmina después de captopril y modificando en el medio los iones Ca^{++} y K^+ , se puede concluir que: a) Captopril disminuía de forma dosis-dependiente el incremento contráctil de neostigmina. b) Captopril solo $100 \mu M$ disminuía la contracción 7.7% del control y menos, de 4.1% del control con dosis $10 \mu M$. c) La disminución de la concentración de $[Ca^{++}]_o$ a 0.90 mM tenía un efecto adicional con captopril en la disminución del efecto contráctil de neostigmina. d) El incremento de la concentración externa de $[K^+]_o$ a 5.4 mM tenía un efecto de mayor decremento contráctil adicional de captopril $10 \mu M$, que con la disminución de $[Ca^{++}]_o$ a 0.90 mM con dosis de neostigmina $0.1 \mu M$ y $1 \mu M$,

mientras que con 10 μM el decremento contráctil era menor. e) En los índices del TOF con neostigmina sola la menor ratio era con T'4/T'1 (mayor gradiente) con dosis 1 μM , mientras que con 10 μM esta ratio era mayor (menor gradiente). f) Con neostigmina 1 μM y 10 μM después de captopril 10 μM en Tyrode normal las ratios T'4/T'1 tenían menor depresión en relación con neostigmina sola. g) La depresión del TOF era mínima en la ratio T'4/T'1 con dosis de neostigmina 0.1 μM , 1 μM y 10 μM después de captopril 10 μM tanto en un medio hipocálcico $[\text{Ca}^{++}]_o$ 0.90 mM como hiperpotásico $[\text{K}^+]_o$ 5.4 mM. h) La latencia de neostigmina sola 0.1 μM en relación con neostigmina 0.1 μM después de captopril 10 μM en medio hiperpotásico $[\text{K}^+]_o$ 5.4 mM era incrementada significativamente.

La falta de incremento contráctil inmediata por neostigmina 0.1 μM sola en el hemidiafragma de rata hipotéticamente puede estar en relación con una fase previa de interacción neostigmina-enzima acetilcolinesterasa, a los que sigue acúmulo local de Ach, en placa motora (Katz and Miledi, 1973). El TOF típico de despolarización T'4/T'1 debería ser con neostigmina 0.1 μM de valor próximo a la unidad y en cambio tenía valores inferiores, similares al TOF por ocupación de receptores nicotínicos en placa motora. En efecto, neostigmina tiene una acción directa en placa motora (Ricker and Wescoe, 1946). Por tanto con dosis bajas de neostigmina como 0.1 μM serían compatibles ambos efectos, directo e indirecto por aumento de Ach. Dosis más altas de neostigmina como 1 μM causaban disminución contráctil por estímulo indirecto y el TOF T'4/T'1 era máximamente disminuido, simulando una ocupación también

máxima de receptores en placa motora (AChRs). En cambio, dosis superiores de neostigmina como 10 μ M causaban una tendencia de los cuatro latidos del TOF a alcanzar la misma altura, que era conseguido al cabo de unas dos horas, de forma similar al TOF del bloqueo neuromuscular despolarizante y esto último sería compatible con la disminución de la contracción al estímulo simple que en estas circunstancias se producía en la preparación frénico-diafragma de rata. Aunque el efecto de captopril no disminuía significativamente la contracción por estímulo simple en placa motora, en cambio, sí lo hacía la altura contráctil máxima de neostigmina (0.1 μ M - 10 μ M), que era disminuida por captopril de forma dosis dependiente. Angiotensina II en bajas concentraciones incrementa la liberación de noradrenalina (Zimmerman and Gisslen, 1968) y si las aminas simpaticomiméticas mejoran la contracción muscular (Bowman, 1980a), captopril que suprime la liberación de noradrenalina por una vía angiotensin-independiente (De Graeff and col., 1985), hipotéticamente disminuiría la contracción indirectamente a través de catecolaminas. Por otro lado, angiotensina II puede facilitar la neurotransmisión ganglionar simpática en el conejo (Wallis and col. 1978; Walí, 1983), terminaciones adrenérgicas (Paiva and col., 1976; Starke, 1977) y colinérgicas (Brown and col., 1980; Walí, 1983). El neuropéptido angiotensina II incrementa la liberación de Ach del nervio presináptico, causando despolarización a nivel de membrana postsináptica (Walí, 1986). Asimismo, este efecto de liberación de Ach no era bloqueado por saralasin, un antagonista de angiotensina II (Walí, 1986), por lo que hoy día no es posible relacionar el efecto depresor que

nosotros vemos de captopril, como un efecto antagonista del enzima convertidor de angiotensina a nivel de placa motora. Aunque es escasa la literatura sobre efectos de los neuropéptidos en la placa motora, se ha postulado que pueden interferir la transmisión sináptica modificando la liberación del neurotransmisor, inhibición de acetilcolinesterasa y la concentración intracelular de calcio libre (Walí, 1985).

En nuestro trabajo la disminución de la concentración de calcio externa potenciaba el efecto depresor contráctil de captopril sobre neostigmina, efecto calcio-dependiente. Igualmente, la disminución de calcio en el baño nutritivo, causa disminución del efecto contráctil de angiotensina II (Walí, 1986). Por otro lado, en músculo uterino de rata, tanto verapamil como la disminución de calcio del baño nutritivo disminuyen el efecto estimulante de angiotensina II (Freer, 1975). Aunque algunos de los canales de calcio yustaglomerulares parecen responder a angiotensina II (Eisen and col., 1987), en el músculo no hay literatura con efecto similar.

Cuando se aumentaba la concentración de potasio en el medio nutritivo el efecto de captopril 10 μM no sólo no disminuía la altura contráctil sino que la incrementaba, no obstante deprimía el incremento contráctil de neostigmina 0.1 μM , 1 μM y 10 μM y por el contrario, alargaba la latencia contráctil de neostigmina 0.1 μM . A lo arriba expresado de las acciones de captopril se unirían las acciones neuromusculares del incremento de potasio en el medio. En preparaciones pretratadas con captopril, el incremento extracelular de potasio causaba una disminución del incremento contráctil de neostigmina. El exceso de potasio causa

mayor despolarización (Bowman, 1980) y mayor liberación de acetilcolina (Van der Kloot, 1978). Por otro lado, neostigmina también incrementa los niveles de Ach en la hendidura sináptica (Katz and Miledi, 1973) y cuando se acumula exceso de Ach causa un efecto feed-back negativo con inhibición de su liberación (Wilson, 1982), así como disminución de los receptores nicotínicos activos en placa motora -AChRs- (Gwilt and Wray, 1986; Chang and col., 1973). Las fasciculaciones por neostigmina tendrían su origen en la elevada concentración de Ach en la vecindad de los colinoceptores axónicos causando pequeñas contracciones espontáneas al actuar sobre las unidades motoras (Bowman, 1980a). Con neostigmina 10 μ M había ausencia de fasciculación por incremento de Ach así como el efecto directo aditivo del exceso de neostigmina en placa motora causando bloqueo por despolarización. Es conocido en clínica el efecto de recurarización por dosis altas de neostigmina (Payne and Hughes, 1981), ya que la dosis de neostigmina es crítica, en exceso puede causar bloqueo neuromuscular inducido por exceso de Ach (Payne and col., 1980). También la depresión del TOF era mínimo en nuestros resultados como consecuencia del bloqueo neuromuscular despolarizante que aparece en estas circunstancias (Bowman, 1980b). En conclusión, dada la escasa literatura que hoy día se ha dedicado a estas facetas, cabe esperar que ulteriores estudios aclararan si los efectos neuromusculares de captopril eran por acción no sólo sobre el ECA, sino también en sitios receptores de angiotensina II, incremento de kininas, así como la posible interacción con acetilcolina, catecolaminas, canales iónicos y la movilización de calcio en placa motora.

Aunque en nuestros resultados del estudio de la acción contráctil comparativa en la preparación frénico-diafragma de rata de ranitidina y neostigmina en dosis óptimas, neostigmina era mil veces más activa que ranitidina ($0.1 \mu\text{M}$ frente a $100 \mu\text{M}$), sus efectos eran 1.5 veces más potentes en Tyrode normal, mientras que en Tyrode hiperpotásico era un poco más potente ranitidina. En la contracción por estímulo indirecto neostigmina potenciaba a ranitidina administrada previamente, pero no había el incremento normal de neostigmina, es decir ranitidina impedía el incremento contráctil máximo de neostigmina y el incremento producido era menor, hipotéticamente es posible un incremento excesivo de la despolarización por el efecto aditivo de ambos fármacos o bien se unen a receptores comunes, de tal forma que la mayor selectividad de neostigmina no puede ser desarrollada en estas circunstancias y explicaría también en parte el que tampoco haya potenciación de ranitidina administrada después de neostigmina.

La inhibición de colinesterasa verdadera se considera el efecto principal de neostigmina y ranitidina que puede explicar los efectos en placa motora. Por un lado, neostigmina inhibe Achasa por un mecanismo competitivo, actuando directamente sobre el enzima, con una constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (K_{i_1}) de $0.9 \mu\text{mol/l.}$, mientras que ranitidina actúa de forma descompetitiva -otro modelo además del competitivo y no competitivo- con una constante de disociación del complejo enzima-substrato-inhibidor (K_{i_2}) de $1.56 \mu\text{mol/l.}$ (Lee and col., 1985). No obstante, para otros autores ranitidina también actúa conforme al modelo competitivo (Hansen and Bertl, 1983a, 1983b),

no competitivo (Galli and col., 1984), habiéndose encontrado actividad anticolinesterasa in vitro tan potente ranitidina como neostigmina (Lee and col., 1985,), por lo que no es de extrañar su diferente potencia, mecanismo de acción y efectos neuromusculares. No obstante, el aparente efecto final de incremento de Ach en placa motora se unen otras acciones menos conocidas. por un lado neostigmina tiene efectos directos (Ricker and Wescoe, 1946) que explicarían los efectos diferenciales. Los fármacos anticolinesterásicos prolongan la acción de Ach por inhibir su hidrólisis, con acumulo en la hendidura sináptica (Katz and Miledi, 1973). Por otro lado, en placa motora se producen cambios funcionales como respuesta a un incremento excesivo de los niveles de acetilcolina en la synapsis (Gwilt and Wray, 1986). La elevación crónica de los niveles de acetilcolina en placa motora puede disminuir la sensibilidad de los receptores a la misma (Gwilt and Wray, 1986), así como una disminución de receptores activos a α -bungarotoxina (Chang and col., 1973). Es uno de los cambios electrofisiológicos de los receptores para equilibrar efectos en exceso o defecto de los neurotransmisores en las sinapsis: desensibilización e hipersesibilidad. Es decir, en un exceso crónico de acetilcolina puede causar una adaptativa reducción en la carga pasada por un único canal junto con una reducción en el número de AchRs en placa motora; estando la frecuencia de apertura de canales reducida (Gwilt and Wray, 1986). Por el contrario, en la denervación hay un déficit crónico de acetilcolina, incrementándose los receptores (Axelson and Theslef, 1959; Miledi, 1960) así como el tiempo de apertura de los canales (Wray, 1980), que origina un aumento del flujo de

iones a través de tales canales, produciendo un incremento de la despolarización producida por la apertura de un canal simple (Katz and Miledi, 1972). Todos estos cambios son modulativos, ya que tienden a amortiguar y adaptarse al incremento o disminución de acetilcolina.

Los inhibidores de Achasa también tienen los siguientes efectos: prolongan la corriente de placa motora (end plate current, epc), e interfieren el complejo del canal receptor de Ach (Pascuzzo and col., 1984), la apertura del canal iónico receptor de Ach (Kuba and col., 1974), cinética del canal de placa motora que produce desensibilización (Pascuzzo and col., 1984) y la conductancia del canal activo (Akaike and col., 1984).

Ranitidina también inhibe colinesterasa en el mismo rango de concentración (10^{-5} M- 10^{-4} M) que potencia las respuestas contráctiles en la preparación ileo-mientérica de cobayo (Galli and col., 1984). Por otro lado Lee and col., (1983) señalan el bloqueo neuromuscular de ranitidina en la preparación frénico-diafragma de rata que no puede ser antagonizado por neostigmina, lo cual señala el grado de confusión que se ha llegado y los deficientes conocimientos farmacológicos en esta investigación, como es revertir un bloqueo neuromuscular de un inhibidor de Achasa por otro.

Las sacudidas musculares espontáneas entre estímulos eléctricos que se producían con neostigmina $0.1 \mu\text{M}$, hipotéticamente pueden estar en relación con aumento de la excitabilidad muscular debido también al incremento de concentración de acetilcolina en placa motora capaz de estimular a la vez al nervio y al músculo, así como suficientes receptores

nicotínicos, produciendo potenciales de acción propagados, que se traducían en nuestros resultados en contracciones asíncronas de altura irregular y menor que las contracciones normales por estímulo eléctrico.

La relación T₄/T₁ del TOF ha sido considerada más sensible que el estímulo simple a 0,1 Hz y menos sensible que el tétanos de 100 Hz durante 5s como indicador de curarización (Waud and Waud, 1972), si bien para Alí and col. (1981) el TOF muestra la misma información clínica de la recuperación del bloqueo competitivo que el obtenido por tétanos a frecuencia fisiológica (50 Hz durante 5s), por ello, la recuperación de la contracción por estímulo simple como criterio para la función neuromuscular normal puede ser engañosa. Las relaciones del TOF más sensibles al efecto de los fármacos anticolinesterásicos eran T'₃/T₁ y T'₄/T₁ también tanto en Tyrode normal como hiperpotásico. En este último se producía el valor de la unidad con la relación T'₄/T'₃, mientras que en Tyrode normal se sobrepasaba el valor 1.0 con la relación T'₁/T'₁ como efectos diferenciales.

Ulteriores estudios se precisan para saber si neostigmina y ranitidina ocupan receptores comunes o próximos.

El tétanos en nuestros resultados no se anula o disminuye significativamente por neostigmina o ranitidina solas, pero en administración conjunta el tétanos se anula si se pone neostigmina seguido de ranitidina pero no al revés. En tales circunstancias hay un exceso de Ach en placa motora que puede tener efecto desensibilizante (Pascuzzo and col., 1984) tras alcanzar un efecto contráctil máxima de neostigmina sola y no al revés, impedido por ranitidina que precedía a neostigmina.

La anulación de la contracción tetánica durante la estimulación a altas frecuencias se considera en general debido a un bloqueo que induce despolarización del músculo esquelético por acumulo excesivo de acetilcolina en la hendidura sináptica (Bowman and Rand, 1980). También se ha propuesto que la anulación del tétanos por anticolinesterásicos se debe a desensibilización del receptor postsináptico (Akasu and Karezmar, 1980), así como un efecto de feedback negativo, con inhibición de la liberación de acetilcolina, causada por acumulo de la misma (Wilson, 1982). Es decir, el efecto de los fármacos anticolinesterásicos sobre las contracciones tetánicas es depresor debido a que la acetilcolina transmisora se acumula hasta el extremo de producir bloqueo despolarizante tanto en la fibra nerviosa como en la placa motora postunión. Neostigmina interaccionaría en el complejo canal iónico-receptor nicotínico de placa motora, produciendo una alteración en el estado del mismo y bloqueo de receptores de acetilcolina (Fickers, 1985), quizás en relación con cierta similitud estructural con acetilcolina, que permitiría la unión a sitios comunes de esta: receptor nicotínico y enzima colinesterasa. También neostigmina tiene efectos presinápticos que son poco conocidos. Comparativamente edrofonio es más efectivo que neostigmina, mientras que piridostigmina lo es menos en la disminución de receptores presinápticos (Donati and col. 1983).

Los agentes anticolinesterásicos aumentan la respuesta al estímulo simple, causando por el contrario una rápida anulación del tétanos (inhibición Wedensky), por estímulos a altas frecuencias (Morrison, 1977, Hedfron and Hobbinger, 1979, Clark

and Hobbinger, 1983, Clark and col. 1983; 1984). El incremento de la contracción al estímulo indirecto se considera debido al "encendido" del músculo después de impulsos simples por una prolongación de los potenciales de placa y/o del repetitivo encendido del nervio (Clark and col., 1984). No obstante, el incremento del tétanos de neostigmina después de atracurio sería por oposición funcional.

Durante la anulación del tétanos por neostigmina en el hemidiafragma de ratón no se producen potenciales de acción, los potenciales de membrana se reducen de -80 a -50 y el músculo no puede conducir directamente el potencial de acción a través de la zona central de la placa motora, debido a inactivación de los canales de sodio (Chang and col., 1986), siendo la anulación del tétanos por disminución del neurotransmisor liberado. Es decir, Chang y col. consideran que la depresión de tétanos por neostigmina es inducido por inactivación de canales de sodio alrededor de la placa motora y que la depresión sostenida es debido a una disminución de la liberación del neurotransmisor. Ambos efectos son como consecuencia del acumulo de acetilcolina.

En las terminaciones nerviosas despolarizadas eléctricamente, exceso de K⁺ o anoxia, se aumenta la liberación de acetilcolina. Estos potenciales de acción superpuestos a nivel basal de despolarización son menores que normalmente, ya que el potencial de membrana esta desplazado, acercándose al potencial de equilibrio de sodio; los potenciales de acción disminuidos desencadenan una menor liberación de acetilcolina y también se inactiva la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, si bien hay una fase con aumento de la conductancia con

desplazamiento transmembrana de iones que aumentan la liberación y las contracciones control son mayores que en un medio normal (Bowman, 1980). Por ello las contracciones y el tétanos estaban disminuidos en presencia de neostigmina $0.1 \mu\text{M}$ en solución Tyrode hiperpotásico en relación con Tyrode normal.

En Tyrode hiperpotásico había un pequeño incremento contráctil por estímulo indirecto tanto de ranitidina como de neostigmina solas, pero la adicción al líquido nutricio de ambos causaba un pequeño decremento contráctil. A la despolarización del músculo por potasio hipotéticamente se uniría la del incremento de Ach local que causaría desensibilización del receptor de Ach en placa motora. El tétanos tenía un comportamiento similar al que se producía en Tyrode normal. En cambio, el TOF tenía un aumento de T'2 con ranitidina sola y al revés, neostigmina sola causaba un decremento de T'2, sin explicación plausible. Sí queda como constancia de efecto típico diferencial de dos fármacos con efectos contráctiles musculares que inhiben colinesterasa con mecanismos similares, pero en medio hiperpotásico y en el T'2 son contrapuestos. Ciertamente hay resultados en los que ranitidina desplaza a la derecha la curva dosis-respuesta (CDR) de Ach en el músculo de sapo (Cheah and col., 1985) y en el trabajo de Gwee and Cheah (1986) también se revisa la acción bloqueante neuromuscular de ranitidina. Ya se señaló en esta tesis los efectos colinérgicos y anticolinérgicos de ranitidina en relación con la especie, órgano y dosis ensayada. Por lo que no es de extrañar que tales resultados aparentemente dispares sean congruentes.

Los efectos del bloqueo neuromuscular por atracurio en hemidiafragma de rata era revertido por dosis óptimas de neostigmina y ranitidina, si bien el efecto anticurare era mayor con neostigmina sola. Cuando se asociaba neostigmina y ranitidina no había potenciación si en primer lugar se ponía ranitidina, en cambio cuando lo era neostigmina la potenciación posterior era significativa. Naturalmente que cuando se bloquean los receptores de Ach en placa motora se produce mayor sensibilidad a la misma y el incremento contráctil se facilitaba mayormente por neostigmina, considerando el incremento de Ach local como el principal mecanismo de la acción anticurárica. Por el contrario, el aparente freno o bloqueo parcial al acción contráctil de neostigmina por ranitidina previa, cabe plantearse si se produce activación parcial de Achasa por la competición entre ranitidina menos selectiva y neostigmina más selectiva por el enzima. De ranitidina también se han descrito acciones de tipo bloqueante neuromuscular (Gwee and Cheah, 1986) y Cheah and col. (1985) encuentran que con dosis altas de ranitidina la CDR de Ach se desplaza a la derecha, por lo que aún que dan mecanismos oscuros no descifrados, pero que podrían explicar los diferentes efectos según el tiempo de administración. Un ejemplo más de la cronofarmacología y cómo el orden de administración de algunos fármacos puede beneficiar o perjudicar en ciertas ocasiones.

La potencia anticurare está en relación con la concentración plasmática y la inhibición de colinesterasa (Cronnelly and Morris, 1982). También presentan interacciones en su efecto antagonista del bloqueo neuromuscular con otros fármacos, pH, e iones potasio, calcio y magnesio (Feldman, 1963; Miller and

Roderick, 1978). Neostigmina a dosis altas en clínica, puede no solo carecer de efecto anticurare sino aumentar el bloqueo neuromuscular en algunos casos, particularmente cuando se asocian otros fármacos como polimixina B (Van Nahuis and col., 1976). Es decir, que neostigmina tiene de forma similar a ranitidina una dosis terapéutica anticurárica óptima y crítica, dosis inferiores son ineficaces y las superiores pueden causar bloqueo inducido por exceso de Ach (Payne and col., 1980). Ha habido algunos casos de recurarización en Anestesia, después del antagonismo aparentemente adecuado, que se pueden atribuir a sobredosis de neostigmina (Payne and Hughes, 1981). Al aumentar la dosis de neostigmina se incrementa la despolarización del músculo y poco a poco se produce un bloqueo por despolarización. En este proceso puede influir no solo la inhibición de colinesterasa sino también cierta acción de neostigmina sobre el complejo canal iónico-receptor nicotínico de placa motora, produciendo una alteración en el estado del mismo y bloqueo de receptores de acetilcolina, hipotéticamente en relación con la similitud estructural con acetilcolina que permitiría la unión a sitios comunes de esta: receptor nicotínico y enzima colinesterasa. En este trabajo se confirman también estos efectos depresores neuromusculares en la curva dosis respuesta de neostigmina, con dosis mayores que sobrepasan el efecto máximo.

Es posible que neostigmina y ranitidina ocupen receptores próximos o comunes o mecanismos de acción similares (inhibición de colinesterasa, etc.) que podían explicar la similitud de sus efectos anticuráricos.

Por otro lado, ranitidina tiene no solo actividad anticurare

(Re and col., 1983) sino también actividad bloqueante neuromuscular (Re and col., 1983; Lee and col., 1985), de mecanismo no bien conocido (Gwee and Cheah, 1986).

En el TOF la relación $T'4/T'1$ era la mas sensible como indicador de curarización, acorde con lo encontrado por otros autores (Waud and Waud, 1972). También un menor gradiente y mayor altura del TOF causado por la acción anticurárica de neostigmina sola y aun mayor índice de recuperación del bloqueo neuromuscular con ranitidina después de neostigmina. Aunque el TOF presentaba una precoz recuperación tras administrar neostigmina o ranitidina, el tétanos tenía una más lenta recuperación por lo que es más indicativo de la ocupación residual de receptores de Ach, aunque para Ali and col., (1981) ambos parámetros TOF y tétanos tienen una información equiparable.

La relación $T4/T1$ del TOF ha sido considerada más sensible que el estímulo simple a 0,1 Hz y menos sensible que el tétanos de 100 Hz durante 5s como indicador de curarización (Waud and Waud, 1972), si bien para Ali and col. (1981) el TOF muestra la misma información clínica de la recuperación del bloqueo competitivo que el obtenido por tétanos a frecuencia fisiológica (50 Hz durante 5s), por ello, la recuperación de la contracción por estímulo simple como criterio para la función neuromuscular normal puede ser engañosa. En nuestros resultados la relación $T'4/T1$ era la más sensible a la curarización y la menos sensible la relación $T'4/T'3$, tanto en Tyrode normal como hiperpotásico. También las relaciones del TOF mas sensibles al efecto de los fármacos anticolinesterásicos eran $T'3/T1$ y $T'4/T1$ también tanto

en Tyrode normal como hiperpotásico. En este último se producía el valor de la unidad con la relación $T'4/T'3$, mientras que en Tyrode normal se sobrepasaba el valor 1.0 con la relación $T'1/T'1$ como efectos diferenciales.

Si los anticolinesterásicos anulan el tétanos y los bloqueantes neuromusculares competitivos también ¿cómo se puede explicar que con neostigmina después de atracurio se incremente la altura del tétanos?. Hipotéticamente por oposición funcional, por despolarización, sensibilización de receptores a Ach o supresión del feed-back negativo.

En Tyrode hiperpotásico había menor efecto depresor neuromuscular por atracurio que en Tyrode normal ya que el incremento de la liberación del neurotransmisor por cloruro potásico hipertónico es dependiente del influx de Ca^{++} en el nervio terminal a través de los canales dependientes del voltaje (Van der Kloot, 1978), por esa razón en clínica se ha propuesto la administración de potasio para revertir el bloqueo neuromuscular competitivo (Wily and Churchill-Davisson, 1968). por su acción anticurare (Wilson and Wright, 1936), no obstante, hoy día no tiene justificación, ya que los riesgos de hiperpotasemia se obvian con los anticolinesterásicos.

La acción anticurare de ranitidina y neostigmina solas o asociadas era poco eficaz en medio hiperpotásico. En estas circunstancias es posible que el estado de despolarización se une al que causa ranitidina y/o neostigmina por incremento de Ach local con una desensibilización del receptor de Ach. In vitro nosotros vimos cómo la despolarización del músculo por succinilcolina, el efecto posterior de ranitidina era de

incremento de la misma con una disminución contráctil adicional (Iglesia, 1986).

Nuestra conclusión es que así como en la sensibilidad al bloqueo neuromuscular competitivo es mayor en la hipopotasemia en la hiperpotasemia es menor según se aprecia en el estímulo indirecto y el TOF. Este último muestra una evolución paralela a la del Tyrode normal si bien el efecto despolarizante del exceso de potasio en el medio se une al de los agentes anticolinesterásicos que hemos utilizado por lo cual los valores de T'3 y T'4 se igualan y así tienden también T'1 y T'2. El tétanos evolucionaba también de forma similar al del Tyrode normal, con mayor altura de las contracciones iniciales.

En resumen, la depresión del TOF y del estímulo indirecto por atracurio se debería a la ocupación de receptores en placa motora. La anulación del tétanos por bloqueo neuromuscular competitivo sería debido al taponamiento de canales iónicos del paso de Na⁺ y K⁺ en la membrana, ya que α -bungarotoxina deprime pero no anula el tétanos, y en estas circunstancias los anticolinesterásicos son incapaces de la apertura de canales al aumentar los niveles de acetilcolina en placa motora (Bowman, 1980).

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.-

I) DE LA INTERACCIÓN DE RANITIDINA CON LAS VARIACIONES IÓNICAS EN HEMIDIAFRAGMAS DE RATA DIRECTA E INDIRECTAMENTE ESTIMULADOS

1º) Nuestros resultados mostraban que ranitidina en el rango 20 μM - 1 mM tenía un incremento contráctil dosis-dependiente mayor con estímulo indirecto y menor con estímulo directo.

2º) La curva dosis-respuesta (CDR) control de ranitidina se desplazaba a la derecha con incremento de $[\text{Mg}^{++}]_o$ a 6 mM y a 12 mM, aumentando el $[\text{K}^+]_o$ a 5.4 mM, disminuyendo $[\text{Ca}^{++}]_o$ a 0.90 mM y a 0.45 mM, al igual que en un medio sin Mg^{++} o con 3.6 mM $[\text{Ca}^{++}]_o$.

3º) Aumentando el K^+ en el medio nutricio a 8.1 mM se anulaba el efecto contráctil de ranitidina.

4º) Había disminución de la CDR de ranitidina muy significativa en bajo $[\text{Ca}^{++}]_o$, de 0.6 mM y alto $[\text{Mg}^{++}]_o$, de 6 mM.

II) DE LA INTERACCIÓN DE LOS CALCIO-ANTAGONISTAS DILTIAZEM Y VERAPAMIL SOBRE LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA.

1º) El efecto contráctil de ranitidina disminuía proporcionalmente a la concentración de diltiazem en este orden: 1 μM < 10 μM < 100 μM .

2º) Las alturas del TOF disminuían con diltiazem 1 μM ; había un incremento de las relaciones T'/T con 10 μM y aproximación al valor de la unidad por menor gradiente entre las relaciones del TOF de ranitidina después de diltiazem 100 μM .

3º) Había un pequeño decremento contráctil de ranitidina con verapamil 1 μM y mayor decremento con verapamil 10 μM , mientras que con 100 μM de verapamil había un mayor incremento contráctil de ranitidina a dosis bajas, mientras que con dosis altas de ranitidina había un significativo descenso contráctil.

4º) Verapamil producía una disminución dosis-dependiente de las alturas del TOF, excepto con dosis 10^{-4} M que causaba incremento contráctil de ranitidina a dosis bajas.

III) INTERACCIÓN DE CAPTOPRIL CON LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE RANITIDINA .-

1º) Captopril con dosis 10 μM y 100 μM disminuía la acción contráctil de ranitidina, mientras que con dosis 1 μM tenía un efecto de incremento contráctil.

2º) Disminuyendo la concentración de calcio a 0.90 mM en el líquido Tyrode había disminución de la contracción de ranitidina, que era más acentuado con el incremento de potasio a 5.4 mM en la solución nutricia.

IV) INTERACCIÓN DE CAPTOPRIL CON LA ACCIÓN CONTRÁCTIL DE NEOSTIGMINA.-

1º) En hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados en medio nutricio Tyrode normal, neostigmina sola causaba un incremento contráctil máximo con dosis 0.1 μM ; menores dosis como 0.01 μM no causaban incremento contráctil y mayores dosis como 1 μM y 10 μM lo disminuían.

2º) Captopril 10 μM disminuía la altura contráctil de neostigmina sola y esta disminución era mayor con captopril 100 μM .

3º) Captopril 10 μM en medio hipocálcico (0.9 mM) causaba una disminución contráctil adicional, todavía mayor en medio hiperpotásico (5.4 mM), excepto con dosis de neostigmina 10 μM .

4º) En el tren de a cuatro (TOF) las relaciones tenían un gradiente máximo (menor valor) con neostigmina 0.1 μM y gradiente mínimo (mayor valor) con 10 μM . En relación con neostigmina sola las relaciones más modificadas por captopril previo a neostigmina eran $T'4/T1$, $T'3/T1$, $T'2/T1$ y $T'1/T1$ de la siguiente manera: a) captopril 10 μM incrementaba los valores del TOF con neostigmina 1 μM y 10 μM ; b) captopril 100 μM disminuía esos valores con neostigmina 0.1 μM ; c) en medio Tyrode hipocálcico (0.9 mM) disminuían esas relaciones con captopril 10 μM previo a neostigmina 0.1 μM , 1 μM y 10 μM , excepto en las relaciones $T'4/T1$, $T'3/T1$ y $T'2/T1$, que se incrementaban; y d) captopril 10 μM en medio hiperpotásico (K^+ 5.4 mM) disminuían esas relaciones con dosis de neostigmina 0.1 μM y 1 μM .

V) ACCIÓN CONTRACTIL COMPARATIVA DE NEOSTIGMINA Y
RANITIDINA.-

A) En medio nutricio Tyrode normal:

1º) En hemidiafragmas de rata indirectamente estimulados tanto neostigmina como ranitidina tenían un incremento contráctil óptimo respectivamente con dosis $0.1 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$

2º) La acción contráctil máxima de ranitidina sola era menor que neostigmina sola.

3º) Cuando se asociaba ranitidina después de neostigmina, la altura contráctil máxima era menor que en la asociación en sentido inverso.

4º) Cuando se asociaba neostigmina después de ranitidina había un incremento contráctil inferior que con neostigmina sola.

5º) El gradiente del TOF era menor con la asociación de neostigmina y ranitidina que solas.

6º) El TOF tenía mayor gradiente con neostigmina después de ranitidina mientras que el gradiente era menor con ranitidina después de neostigmina.

7º) Ni neostigmina ni ranitidina solas anulaban el tétanos. En cambio, cuando se añadía ranitidina después de neostigmina se anulaba el tétanos.

B) En medio nutricio Tyrode hiperpotásico (8.1 mM):

1º) La altura contráctil de ranitidina sola era mayor que neostigmina sola.

2º) La asociación de ranitidina y neostigmina no tenía incremento contráctil .

3º) El tétanos se anulaba por ranitidina después de neostigmina y no en sentido inverso -efecto cronofarmacológico-, ni por ranitidina o neostigmina solas.

4º) En medio hiperpotásico había incremento del gradiente de los estímulos del TOF con ranitidina, mientras que había disminución del TOF con neostigmina después de ranitidina.

VI) EFECTO PROSTIGMIN-LIKE DE RANITIDINA COMPARADO CON NEOSTIGMINA FRENTE A ATRACURIO.-

A) En medio Tyrode normal:

1º) La relajación muscular causada por atracurio era parcialmente revertida por neostigmina o ranitidina, si bien el incremento contráctil era mayor con neostigmina.

2º) En asociación la acción anticurárica era mayor cuando neostigmina precedía a ranitidina y no al revés que carecían de potenciación.

3º) El tren de a cuatro tenía una disminución máxima con atracurio que se hacía mínima con neostigmina sola en asociación posterior.

4º) El tétanos anulado por atracurio tenía un tenue incremento por ranitidina o neostigmina y algo mayor en asociación.

B) En medio Tyrode hiperpotásico:

1º) La acción anticurare era algo mayor con ranitidina sola o ranitidina seguida de neostigmina -al contrario que en medio Tyrode normal-.

2º) Todas las relaciones del TOF se acercaban a la unidad por la acción despolarizante del incremento del potasio en el medio nutritivo.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

AKASU T. and KARCZMAR A. G.: Effects of anticholinesterases and of sodium fluoride on neuromyal desensitization. *Neuropharmacolgy*, 19, 393-403, 1980.

AKASU, T., KOHIMA, M., and KOKETSU, K.: Substance P modulates the sensibility of the nicotinic receptor in amphibian cholinergic transmission. *Brit. J. Pharmac.* 80, 123-131, 1983.

ALI, H. H., SAVARESE, J.J., LEBOWITZ, P. W. and RAMSEY, F.M.: Twitch, tetanus and train-of-four as indices of recovery from nondepolarizing neuromuscular blockade. *Anesthesiology*, 54/4, 294-297, 1981.

ALMERS, W. and PALADE, P.T.: Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: Measurement with vaseline-gap technique. *J. Physiol. (Lond.)* 312, 159-176, 1981.

ANTONIACCIO, M. J. and KERWIN, L.: Pre- and postjunctional inhibition of vascular sympathetic function by captopril in HR. *Hipertension*, 3/1, 54-62, 1981.

ARIYOSHI M., HASUO, H., KOKETSU K., OHTA Y., and TOKIMASA T.: Histamine is an antagonist of acetylcholine receptor at the frog end plate. *Brit. J. Pharmac.*, 85, 65-73, 1985.

ASAI, F., NISHIMURA M., and URAKABA N.: Effects of verapamil and manganese ion on potassium-induced transmitter release in rat diaphragm muscles. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 255, 191-195, 1982.

AXELSSON J. & THESLEFF, S.: A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.*, 147, 178-193, 1959.

BAKER, P.F.; HODGKIN, A.L. and RIDGWAY, E.B.: Depolarization

and calcium entry in squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)* 218, 709, 1971.

BAX, ND. S.; LENNARD, M.S. and TUCKER, C.T.: Effect of betablockers on tyroid hormone. *Brit. Med. J.* 281, 1283, 1980.

BEELER G. W. and REUTER, H.: The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *J. Physiol. (London)* 207, 211-229, 1970.

BERTACCINI, G.; SCARPIGNATO, C.; CORUZZI, G.: Histamine receptors and gastrointestinal motility; an overview, in Trosoli. Lucchelli, Brimblecombe. *H₂-antagonists*. pp. 251-261. (Excerpta Medica. Amsterdam, 1980).

BERTACCINI G. and CORUZZI G.: Evidence for and against heterogeneity in the histamine H₂ receptor population. *Pharmacology* 23, 1-13, 1981.

BERTACCINI, G. CORUZZI, G: Cholinergic-like effects of the new histamine H₂-receptor antagonist ranitidine. *Agents and Actions*. 12: 168-171, 1982.

BERTACCINI G. and CORUZZI G.: Histamine H₂ receptors: a homogeneous population? *Ital. J. Gastroenterol.* 15, 51-58, 1983.

BERTACCINI, G.; CORUZZI, G. and POLI, E.: Histamine H₂ receptor antagonists may modify dog intestinal motility independently of their primary action on the H₂ receptors. *Pharmacol. Res. Commun.*, 17/3, 241-254, 1985.

BERTACCINI, G., CORUZZI, G and POLI, E.: Review article: the hitamine H3 receptor: a novel prejunctional receptor regulating gastrointestinal function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 5(6), 585-591, 1991.

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

BLABER L. C. and BOWMAN W. C.: Studies on repetitive discharges evoked in motor and skeletal muscle after injection of anticholinesterase drugs. *Brit. J. Pharmacol.* 5, 204, 1963.

BLACK, J. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, C. J., GANELLIN, C.R. and PARSONS, E.M.: Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature*, 236, 385-390, 1972.

BOMMER, M.; LIEBICH, D.; KLEY, N.; HERZ, A. and NOBLE, E.: Histamine effects release and biosynthesis of opioid peptides primarily via H₁-receptors in bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 49 (6), 1688-1696, 1987.

BONDI, A.Y.: Effects of verapamil on excitation-contraction coupling, in frog satorius muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 49, 1978.

BOWMAN W. C.: Muscle contraction in: *Pharmacology of neuromuscular function*, pp. 122-180. *Textbook of Pharmacology*. Jhon Wright & Sons, Bristol, 1980a.

BOWMAN, W.C.: Prejunctional and postjunctional cholinergic receptors at the neuromuscular junction. *Anesth. Analg.*, 59, 12, 935-943, 1980b.

BOWMAN, W.C. and RAND, M.J.: *Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. México, 1984.

BRADSHAW, R.T., BRITAIN J.W. CLITHEROW M.J. DALY D. JACK B.J. and R. STABLES: Ranitidine (AH 19065): a new potent selective histamine H₂-receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 66, 464 P, 1979.

BRAUDE, S.; ROYSTON, D.; COE, C. and BARNES P. J.: Histamine increase lung permeability by an H₂-receptor mechanism. *Lancet*, 2 (8399), 372-374, 1984.

BRIMBLECOMBE, R.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, G.J.; EMMET, J.C.; GANELLIN, C.R.; LESLIE, G.B. and PARSONS M.E.: Characterization and development of cimetidine as a histamine H₂-receptor antagonist. *Gastroenterology*, 74, 339-347, 1978.

BRITTAIN, R.T. and DALY, M.J.: Revisión sobre la farmacología animal de ranitidina, un nuevo antagonista de receptores H₂ de la histamina. Glaxo Group Research Ltd., Ware, Herts, Inglaterra. Drug Symposium on ranitidine. Hamburgo, 1980.

BROWN, D.A., CONSTANTINI, A. and MARSH: Angiotensin mimics the action of muscarinic agonist on rat sympathetic ganglia. *Brain Res.* 193, 614-619, 1980.

BULBRING E.: Observations on the isolated phrenic-nerve diaphragm preparation of the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 1, 38-61, 1946.

CAMARRI, E.; CHIRONE, E.; FANTERIA, G. and ZOCCHI, M.: Ranitidine induced bradycardia. *Lancet*, 1, 160, 1982.

CLARK A. L. and HOBBIGER F.: Twich potentiation by organophosphate anticholinesterases in rat phrenic nerve diaphragm preparations. *Br. J. Pharmacol.*, 78, 239-246, 1983.

CLARK A. L., HOBBIGER F. and TERRAR, D.A.: Effects of pancuronium and hexamethonium on paraoxon-induced twich potentiation and antidromic firing in rat phrenic nerve diaphragm preparations. *Br. J. Pharmacol.*, 80, 489-496, 1983.

CLARK A. L., HOBBIGER F. and TERRAR, D.A.: Nature of the anticholinesterase-induced repetitive response of rat and mouse

striated muscle to single nerve stimuli. *J. Physiol.*, 349, 157-166, 1984.

CORUZZI, G.; POLI, R.; FESANI, F.; MEDICI, D. and BERTACCINI G.: Negative inotropic effect of some H₂-receptor antagonists on the isolated human atria. *Experientia*, 39, 1248-1286, 1983.

COSTENTIN, J.; BOULU, P.; SCHWARTZ, J.C.: Pharmacological studies on the role of histamine in thermoregulation. *Agents and Actions*, 3, 177, 1973.

CRONNELLY R.; MORRIS R. B. and MILLER R. D.: Edrophonium: duration of action and atropine requirement in humans during halotane anesthesia. *Anesthesiology* 57, 261-266, 1982.

CRONNELLY, R. and MORRIS, R. B.: Antagonism of neuromuscular blockade. *Anesth.*, 54, 183-194, 1982.

CHANG C.C.; CHEN, T.F. & CHUANG, S-T.: Influence of chronic treatment on the number of acetylcholine receptors and the release of acetylcholine from the rat diaphragm. *J. Physiol.*, 230, 613-618, 1973.

CHANG C.C., HONG, S.J. & KO J.-L.: Mechanisms of the inhibition by neostigmine of tetanic contraction in the mouse diaphragm. *Br. J. Pharmacol.* 87/4, 757-762, 1986.

CHEAH, L.S.; LEE, H.S. and GWEE, M.C.: Anticholinesterase activity of and possible ion-channel block by cimetidine, ranitidine and oxmetidine in the toad isolated rectus abdominis muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 12/4, 353-357, 1985.

CHIBA, S., QUILLEY, C. P., QUILLEY, J. and MCGRIFF, J. C.: Captopril decreases vascular reactivity independently of changes in converting enzyme activity and prostaglandin release in the rat isolated kidney. *Europ. J. Pharmacol.* 83, 243-252, 1982.

DANIELS M.P. and VOGEL Z.: Immunoperoxidase staining of α -bungarotoxin binding sites in muscle end-plates shows distribution of acetylcholine receptors. Nature (Lond.) 234, 339, 1975.

DALY, M.J.: Pharmacology, toxicology and selectivity of ranitidine, in: The clinical use of ranitidine, Glaxo Internatinal symposium proceedings (Ed. I.C.E. Wesdorp), Theracom, Netherlands. pp. 2-7, 1982.

DE GRAEFF, P.A.; VAN GILST, W.H.; DE LANGEN, C.D.J.; KINGAMA, J.H. and WESSELING, H.: Concentration-dependente potentiation by captopril against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. Arch. Int. Pharmacodyn. 280, 181-193, 1985.

DE MELLO, W.C.: On the mechanism of histamine action in cardiac muscle. Europ.J.Pharm. 35, 315-321, 1.976.

DIETZE, G.J.; RETT, K.; JAUCH, K.W.; WIKLMAYR M.; FINK E.; HARTL, W.; GUENTER, B.; FRITZ H. and MEHNERT H.: Captopril bei hipertoniern mit Diabetes mellitus Typ II. Herz, 12/1, 16-21, 1987.

DIONNE, V.E.; STEIMBACH, J.H. and STEVENS, C.F.: An analysis of the dose-response relationship at voltaje clamped frog neuromuscular junctions. J. Phisiol., 281, 421, 1978.

DOMSCHKE, W.; LUX, C. and DOMSCHKE, S.: Furan H₂ antagonist ranitidine inhibits pentagastrin-stimulated gastric secretion stronger than cimetidine. Gastroenterology 79 (6), 1266-1271, 1980.

DONALDSON, P.L. and BEAM, K.G.: Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. Gen. Physiol., 82, 449, 468,

1983.

DONATI, F., FERGUSON A. and BEVAN D. R.: Twitch depression and antagonism of pancuronium with edrophonium, neostigmine or piridostigmine. *Anaesth. Analg.* 62 (3), 314-316, 1983.

DRAYER, F.: Acetylcholine receptor. *Br. J. Anaesth.*, 54, 115-130, 1982.

EISEN, V.; MUNDAY, M.R. and SLATER, J.D.: Effects of angiotensin I converting enzyme inhibition and calcium channel blockade on plasma levels of active and inactive renin in conscious rabbits. *Biochem. Pharmacol.*, 36/14, 2331-2335, 1987.

ELMQVIST, D. and FELDMAN, D.S.: Calcium dependence of spontaneous acetylcholine release at mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. Lond.* 181, 487-497, 1965.

EYRE, P. BESNER, R.N.: Cimetidine fails to block functional antagonism of carbachol by histamine in rat trachea. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 24: 457 (1979).

FELDMAN, S.A.: Effect of changes in electrolytes, hydration and pH upon the reactions to muscle relaxants. *Br. J. Anaesth.*, 35, 546-551, 1963.

FERTUCK, H.C. and SALPETER, M.M.: Localization of acetylcholine receptor by I125 -labeled- α -bungarotoxin binding at mouse motor end plate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1376, 1974.

FERTUCK, H.C. and SALPETER, M.M.: Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after 125 I- α -bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 69, 114, 1976.

FICKERS, J. F.: Concentration dependent effects of

neostigmine on the endplate acetylcholine receptor channel complex. *J. Neurosci.* 5 (2), 502-514, 1985.

FIELD J.L. and NEWBERRY N.R.: On the histamine-induced despolarization of the isolated superior cervical ganglion of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1752-1756, 103 (3), 1991.

FINK, R.H. and STEPHENSON, D.G.: Ca⁺⁺-movements in muscle modulated by state of K⁺-channels in the sarcoplasmic reticulum membranes (*Pflugger Arch.*, 409 (4-5), 374-380, 1987.

FOSSET, M.; JAIMOVICH, E.; DELPONT, E. and LAZDUNSKI, M.: [³H]Nitrendipine receptors in skeletal muscle: Properties and preferential localization in tranverse tubules. *J. Biol. Chem.*, 258, 6086, 1983.

FREER, R. J.: Calcium and angiotensine tachyphylaxis in rat uterine smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 228/5, 1423-1431, 1975.

GALATULAS, I., BOSSA, R. and BENVENUTI, C.: Cimetidina induced neuromuscular blockade in vitro: Antagonism by calcium. *IRCS Medical Science*, 8, 87A, 1980.

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.

GALLI, A.; MANTOVANI, P. and PEPEU, G.: Effect of ranitidine on ileal myenteric plexus preparation and on acetyl and butyrylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 33/12, 1845-1850, 1984.

GANELLIN, C.R.; DURANT, C.J. and EMMETT, J.C.: Some chemical aspects of histamine H₂-receptor antagonists. *Fed. Proc.* 35, 1924-1930, 1976.

GANELLIN, C.R.: Selectivity and the desing of histamine

H₂-receptor antagonists. J. Appl.Chem.Biotechnol., 28, 183-200, 1978a.

GANELLIN, C. R.: Chemistry and structure-activity relationships of H₂-receptor antagonists. In, histamine II and anti-histamines: Chemistry metabolism and physiological and pharmacological actions. (Rocha e Silva m.ed.) handbuch der Experimentellen Pharmakologie Vo. 18, Pte. 2. Springer-Verlag. Berlin, 251-294, 1978b.

GANELLIN, R.: Award in medicinal chemistry. Medicinal chemistry and dynamic structure-activity analysis in the discovery of drugs acting at histamine H₂-receptors. J. Med. Chem. , 24: 913, 920, 1981.

GINSBORG, B. L. and JENKINSON, D. H.: Transmission of impulses from nerve to muscle; in Hefter's Handbuch der experimentellen Pharmakologie, New Series, vol. 42 (ed. E. Zaimis), p.229. London: Springer, 1976.

GLOSSMANN, H.; FERRY, D.R. and BOSCHEK, C.B.: Purification of the putative calcium channel from skeletal muscle with the aid of [³H]-binding. Naunyn-Smiedeberg's Arch. Pharmacol., 323, 1-11, 1983.

GLOSSMANN, H.; GOLL, A.; ROMBUSCH, M. and FERRY, D.R.: Molecular pharmacology of Ca⁺⁺ channels: receptor binding studies. In: Nimodipine. Pharmacological and Clinical Properties, ed. by E. Betz, K. Deck and F. Hoffmeister, pp. 57-73, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1985.

GRAMSTAD, L., LILLEASEN, P. and MINSAAS B. B.: Comparative study of atracurium, vecuronium (Org NC45) and pancuronium. Br. J. Anaesth. 55,1, 95S-96S, 1983.

GRIMA, M., SCHWATZ, J., SPACH, M.O. and VELLY, J.:
Antianginal arylalkylamines and sodium channels: [3H]-
batrachotoxin-A 20-alpha-benzoate and [3H]-tetracaine binding.
Brit. J. Pharmacol. 89, 641-646, 1986.

GWILT M. & WRAY D.: The effect of chronic neostigmine
treatment on channel properties at the rat skeletal
neuromuscular junction. Br. J. Pharmacol., 88, 25-31, 1986.

GWEE M.C.E. and CHEAH L.S.: Actions of cimetidine and
ranitidine at some cholinergic sites: implications in toxicology
and anesthesia. Life Sciences, 39,383-388, 1.986.

HANSEN, W.E., BERTL, S.: The inhibition of acetyl-
cholinesterase and pseudocholinesterase by cimetidine. *Arzneim
Forsch. (Drug Res):* (no 1). 1983a.

HANSEN, W.E. and BERTL, S.: Inhibition of cholinesterases
by ranitidine. *Lancet*, 8318/1, 235, 1983b.

HARSING, L.G.JR., RONAY, A.Z., SOMGYI, G.T., UMEZAWA, H.,
BAJUSZ S. and VIZI, E.Z.: Met 5-enkephalin-Arg 6-Phe 7 inhibition
of noradrenaline and acetylcholine release from peripheral
organs. *J. Auton. Pharmacol.* 4/1, 33-43, 1984.

HAY, D.W.P. and WADSWORTH, R.M.: Local anaesthetic activity
of organic calcium antagonists: Relevance of their actions on
smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 77, 221, 1982.

HAYNES L. W. and SMITH M. E.: Selective inhibition of motor
endplate-specific acetyl-cholinesterase by B-endorphin and
related peptides. *Neurosciences* 7, 1007-1013, 1982.

HEFRON P.F. & HOBBIKER F.: Relation between inhibition of
acetylcholinesterase and response of the rat phrenic nerve-
diaphragm preparation to indirect stimulation a higher

frecuencias. Br. J. Pharmacol., 66, 246-262, 1979.

HEIDMAN, T. and CANGEUS, J.P.: Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states. Ann. Rev. Biochem, 47, 371, 1978.

HUGHES, J.R.: Post-tetanic potentiation. Physiol. Rev. 38, 91-113, 1958.

HUGHES, R. and CHAPPLE, D. J.: The pharmacology of atracurium: a new competitive neuromuscular blocking agent. Br. J. Anaesth., 53, 31-38, 1981.

HUBBARD, J. I., JONES S. F. and LANDAU E. M.: On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. J. Physiol. 196, 75-86, 1968.

IGLESIA, M.J.: Efectos de los antihistaminicos H_2 en la transmisión neuromuscular. Tesina. Madrid, 1986.

ITSKOVITZ, H.D.: Cardiovascular effects of H_2 -receptor antagonists. Int Symp Update: H_2 -receptor antagonists. London. August 24-26, 1983.

JEFFREYS, D.B. and VALE. J.A.: Cimetidine and bradycardia. Lancet, 1, 828, 1978.

JENKINSON, D.H.: The antagonism between tubocurarine and substances which depolarize the motor end plate. J. Physiol., (Lond.), 152, 309, 1960.

JONES, H.; BRADLEY, P.B.; ROBERTS, F.: Excitatory effects of microiontophoretically applied histamine in the rat medulla may be mediated via histamine H_2 -receptors. Br. J. Pharmacol. 79: 282 P, 1983.

KATAYAMA S. and TSAKA, K.: Effects of H_1 -receptor blocking drugs on the frog sartorius neuromuscular junction. Brit. J.

Pharmacol., 85, 747-753, 1985.

KATZ, B.: Nerve, Muscle and Synapse. New York, McGraw-Hill, 1966.

KATZ, R. L. and MILEDI, R.: The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. Proc. R. Soc. B., 161, 496, 1965.

KATZ, B. & MILEDI, R.: The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. J. Physiol., 224, 665-699, 1972.

KATZ, B. and MILEDI, R.: The binding of acetylcholine to receptors and removal from the synaptic cleft. J. Physiol., 231, 549-574, 1973.

KOUNENIS, G.; KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, M. and ELEZOGLOU, V.: The inhibition of acetylcholinesterase by ranitidine: a study on the guinea-pig ileum. J. Pharmacobiodyn., 9/11, 941-945, 1986.

KRAYNACK, N.W.; LAWSON, B.J. and GINTAUTAS, J.: Neuromuscular blocking effect of verapamil in cats. Can Anaesth. Soc. J., 30, 242, 1983.

LAWSON, B.J.; KRAYNACK, N.W. and GINTAUTAS, J.: Neuromuscular and electrocardiographic responses to verapamil in dogs. Anesthes. Analg., 62, 50, 1983.

LEE, C.Y.: Chemistry and pharmacology of polipeptide toxins snake venoms. Ann. Rev. Pharmacol. 12, 265, 1972.

LEE, C.: Train-of-four quantitation of competitive neuromuscular block. Anesth. Analg. (Cleve.), 54, 649-653, 1975.

LEE, H.S., CHEAH, L.S. and GWEE, M.C.E.: Inhibition of acetylcholinesterase by histamine agonists and antagonists. Expt. Pharmac. Physiol. 12, 6, 613-620, 1985.

Mc CARTHY, D.M.: Cimetidine and ranitidine. Annual of Internal. Med. 99 (4), 551-553, 1983.

MANZANERO, J.: Estudio experimental de los anti-histamínicos H₁ y H₂ en el miocardio de la rata y el cobayo. Tesis doctoral. Madrid, 1979.

MANZANERO, J. and APARICIO, L.: Efecto contráctil de ranitidina en la preparación frénico-diafragma de rata. VIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Farmacología. 1978.

MARTONOSI A.N. : Mechanisms of Ca⁺⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Physiol. Rev., 64/4, 1.240-1.320, 1.984.

MASLAND R.L. and WIGTON, R.S.: Nerve activity accompanying fasciculation produced by prostigmine. J. Neurophysiol., 3, 269-275, 1940.

MATSUMO, Y.; HORI, H.; NAKAMURA, H.; ITO, T. and KODOKABA, T.: General pharmacology of the novel angiotensing converting enzyme inhibitor alacepril, 2nd communication: Effects on central nervous and sensory systems and others funtions. Arzneimittelforschung, 36/1, 62-68, 1986.

MILEDI, R.: The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation. J. Phisiol., 151, 1-23, 1960.

MILLER, R.D. and RODERICK, L.: Diuretic-induced hypokaliemia, pancuronium neuromuscular blockade and its antagonism by neostigmine. Br. J. Anaesth., 50, 541-544, 1978.

MORRISON J.D.: The generation of nerve and muscle repetitive activity in the rat phrenic nerve-diaphragm preparatiopn following inhibition of cholinesterase by echothiophate. Br. J.

Pharmacol., 60, 45-53, 1977.

NEILL, E. A. M., CHAPLE, D. J. and THOMSON, C. W.: Metabolism and kinetics of atracurium: an overview. Br. J. Anaesth. 55,1, 23S, 1983.

OTHA, Y.; ARIYOSHI, M. and KOKETSU, K.: Histamine as an endogenous antagonist of nicotinic Ach-receptor. Brain Res., 306, 370-373, 1984.

PAIVA, T.B.; MENDES, G.B.; ABOULAFIA, J. and PAIVA, A.C.M.: Evidence against cholinergic mediation of the effect of angiotensin II on the guinea-pig ileum. Pflügers Arch. 365, 129-133, 1976.

PAYNE, J.P.; HUGHES, R. and ALAZAWI, S.: Neuromuscular blockade by neostigmine in anaesthetized man. Br. J. Anaesth., 52, 69-76, 1980.

PAYNE, J.P. and HUGHES, R.: Evaluation of atracurium in anesthetized man. Br. J. Anaesth., 53/1, 45-54, 1981.

POLI, E.; CORUZZI, G. and BERTACCINI, G.: Action of mifentidine and ranitidine on the isolated rat uterus. Pharmacol. Res. Commun., 16/11, 1091-1100, 1984.

POLI, E. ; MEDICI, D.; CONTINI, C.A. and BERTACCINI, C.: Effects of mifentidine on histamine-stimulated human atrium "in vitro": comparison with ranitidine and cimetidine. Arch. Int. Pharmacodyn. 273, 221-225, 1985.

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.

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.

RE, L., CINGOLANI, M.L., CONCETTONI, C. and ROSSINI, L.: Cholinergic effects of cimetidine and ranitidine. Pharmacol. Res. Commun. 15, 485-517, 1983.

RE, L. and ROSSINI, L.: Electrophysiological analysis of the cholinergic effects of cimetidine and ranitidine. Pharmacol. Res. Commun. 16 (4), 381-399, 1984.

REYNOLDS, J.J.; GOULD, R.J. and SNYDER, S.H.: ³H-Verapamil binding sites in brain and skeletal muscle: regulation by calcium. Eur. J. Pharmacol., 95, 319, 1983

RIKER, W. and WESCOE W.C.: The direct action of prostigmine on skeletal muscle: its relationship to the choline esters. J. Pharmacol. Exp. Ther., 88, 58-66, 1946.

ROSS, M.J.; KLIMOWSKY, M.W.; AGARD, D.A. and STROUD R.M.: Structural studies of a membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo californica. J. Molec. Biol., 116, 635, 1977.

SANCHEZ J.A. and STEFANI E.: Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. J. Physiol., (Lond.), 314, 94-96, 1985.

SARUTA, T., SUZUKI, H., OKUNA, T. and KONDO, K.: Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the vascular response to norepinephrine. Am. J. Cardiol., 49, 1535-1536, 1982.

SATO, T. and ONO, H: Facilitation of neuromuscular transmission by calcium antagonists, diltiazem, nifedipine and verapamil, in the dog. Arch. Int. Pharmacodyn., 249, 235, 1981.

SAWAMURA, A., SPERALAKIS, N., AZUMA, J., HARADA, H. and FUKUDA, K.: Stimulation of cardiac slow Ca⁺⁺ current by high concentration of cimetidine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 236,

192-196, 1986.

SCHWART, A. and TRIGGLE, D.J.: Cellular action of calcium channel blocking drugs. *Annu. Rev. Med.* 35, 325-356, 1984.

SCUKA, M.: Analysis of the effects of histamine on the end-plate potential. *Neuropharmac.*, 12, 441-450, 1973.

SHAH, R.R.: Symptomatic bradycardia in association with H₂-receptor antagonists. *Lancet*, 2, 1108, 1982.

SPEEDING, M. and PAOLETTI, R.: Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.*, 44 (3), 363-376, 1992.

STARKE, K.: Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77, 1-124, 1977.

STEINACKER, A.: Calcium-dependent presynaptic action of substance P at the frog neuromuscular junction. *Nature, Lond.* 267, 268-270, 1977.

SWEET, C.S., GAUL, S.L. REITZ, P.M., BLAINE, E.H. and RIBEIRO L.T.: Mechanism of action of enalapril in experimental hypertension and acute left ventricular failure. *J. Hipertens.* 1/1, 53-63, 1983.

VAN DER KLOOT, W.: Calcium and neuromuscular transmission. in: *Calcium on Drugs Action* (Ed. G. W. Weiss), pp. 261-287. Plenum Press, New York and London, 1978.

VAN NYHUIS, L.S.; MILLER, R.D. and FOGDALL, R.P.: The interaction between d-tubocurarine, pancuronium, polymixin B and neostigmine on neuromuscular function. *Anaesth. Analg. (Cleve)*, 56, 224, 1976.

VELAZQUEZ, B.L.: *Terapéutica con sus fundamentos de*

farmacología experimental. Edit. Científico-Médica, Barcelona 1966.

WALI, F.A.: Actions of angiotensin II and acetylcholine at the rabbit superior cervical ganglion. Pharmacol. Res. Commun. 15, 621-629, 1983.

WALI, F.A.: Enhancement of neuromuscular transmission and contraction by angitensin II at the skeletal muscle (rat diaphragm), Biochem. Soc. Trans., 12, 823, 1984.

WALI, F.A.: Actions of polipeptides at the neuromuscular junction. Agents and Actions, 16/6, 558-566, 1985.

WALI, F.A.: Interactions of nifedipine and diltiazem with muscle relaxants and reversal of neuromuscular blockade with adrophonium and neostigmine. J. Parmacol., 17, 3, 244-153, 1986.

WALI, F. A.: Effect of angiotensina II on mechanical and electrical responses of frog, chick and rat skeletal muscle. Arch. Int. Pharmacodyn. 282, 314-327, 1986.

WALLIS, D.I.; WILLIAMS, C. and WALLI, F.A.: The effect of 5-hydroxytryptamine and hexamethonium on post-train facilitation in the rabbit superior cervical ganglion. Europ. J. Pharmacol. 52, 17-25, 1978.

WALSH, K.B.; BRYANT, S.H. and SWARTZ, A.: Effect of calcium antagonist drugs on calcium currents in mammalian skeletal muscle fibers. J. Parmacol. Exp. Ther., 236, 403-407, 1986.

WAUD, B.E. and WAUD, D.R.: The relation between te response to "train-of-four" stimulation and receptor occlusion during competitive neuromuscular block. Anesthesiology, 37, 413-416, 1972.

WAUD, B.E. and WAUD, D.R.: Interaction of calcium and

potassium with neuromuscular blocking agents. *Brit. J. Anaesth.*, 52, 863-866, 1980.

WEISSLER, I. and KILBINGER, H.: Release of [3H]-acetylcholine from a modified rat phrenic nerve hemidiaphragm preparation. *Naunyn-Smiedeberg's Arch. pharmacol.*, 334, 357-364, 1986.

WEISSLER, I. and STEINLEIN, O.: Differential release of 3H-acetylcholine from the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation by electrical nerve stimulation and by high potassium. *Neuroscience*, 22, 289-299, 1987.

WYLIE, W.D. and CHURCHILL-DAVIDSON, H.C.: *Anesthesiología*, Edit. Salvat, Barcelona, 1974.

WILSON A. T. and WRIGTH, S.: Anti-curare action of potassium and other substances. *Quart. J. exp. Physiol.* 26, 127, 1936.

WILSON, D. F.: Influence of presynaptic receptors on neuromuscular transmission in rat. *Am J. Physiol.*, 242, C366-372. 1982.

WRAY, D.: Noise analysis and channels at the postsynaptic membrane of skeletal muscle. *Prog. Drug. Res.*, 24, 9-56, 1980.

YAMADA, M., TOKIMASA, T. and KOKETSU, K.: Effects of histamine on acetylcholine release in bullfrog sympathetic ganglia. *Eur. J. Pharmacol.*, 82, 15-20, 1982.

ZIMMERMAN, B.G. and GISSLEN, J.: Patterns of renal vasoconstriction and transmitter release during sympathetic stimulation in the presence of angiotensin and cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 163, 320-329, 1968.