

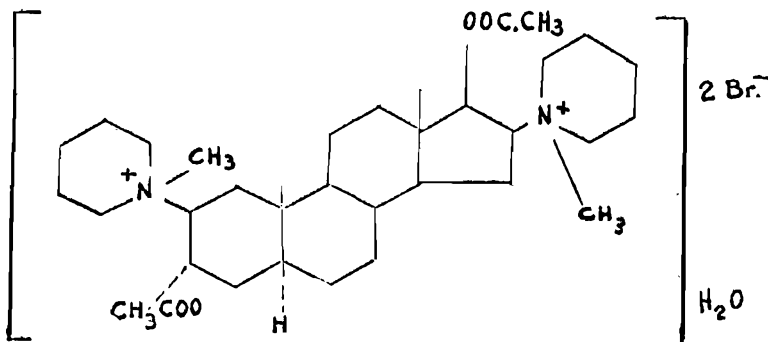
## La farmacología del bromuro de pancuronio: un nuevo y potente agente esteroide en el bloqueo neuromuscular

DR. W. R. BUCKETT, DR. CHRISTINE E. B.  
MARJORIBANKS, DR. FIONA A. MARWICK Y  
DR. MARION B. MORTON

LA incorporación de un grupo biológicamente activo a una estructura química existente en estado natural constituye un avance interesante hacia la obtención de nuevos agentes farmacológicos. Cuando una estructura del tipo de la acetilcolina, por ejemplo, es fijada sobre el núcleo A del 5  $\alpha$ -androstano-17-ona o de la 5  $\alpha$ -pregnan-20-ona, se obtienen agentes de bloqueo neuromuscular cuya actividad puede alcanzar 1/15 de la potencia de la tubocurarina (Le-

wis, Martin-Smith, Muir y Ross, 1967). A pesar de su valor clínico limitado, tales compuestos han orientado las investigaciones hacia la síntesis de cuerpos esteroideos bis amino cuaternarios. Una serie de derivados dimetoalúricos del 2  $\beta$ , 16  $\beta$ -diamino-5  $\alpha$ -androstano-3  $\alpha$ -17  $\beta$ -diol fue descrita por Buckett, Hewett y Savage (1967). Uno de ellos, el 2  $\beta$ , 16  $\beta$ -dipiperidino-5  $\alpha$ -androstano-3  $\alpha$ , 17  $\beta$ -diol-diacetato dimetobromuro (número de código NA97, con denomina-

### FORMULA



ción aceptada de bromuro de pancuronio) es un potente agente bloqueador neuromuscular, cuyas acciones fueron comparadas con las del cloruro de tubocurarina, según las experiencias descritas en este trabajo.

### *Preparaciones neuromusculares*

#### MÉTODOS

Se anestesiaron gatos con una mezcla de cloralosa (70 mg/kg) y pentobarbitona sódica (12 mg/kg) inyectada intraperitonealmente; a conejos y perros se les anestesió con pentobarbitona sódica (45 mg/kg) inyectada por vía intravenosa, y a cierto número de gallinas se les administró barbitona sódica (200 mg/kg) en inyección intravenosa. En todos los casos la tráquea fue intubada y se aplicó ventilación artificial durante cada experimento. Se provocaron contracciones y tetanias del músculo gástrico por estimulación de la porción periférica del nervio ciático, oprimido en el espacio poplíteo, con choques rectangulares de 0.5 mseg de duración y de casi dos veces la fuerza necesaria para producir un espasmo máximo. Para excitar los músculos directamente, se aplicaron estímulos de 1 mseg de duración entre un alambre de platino insertado a través de la unión músculotendinosa y un electrodo adherido a una aguja que atravesaba el fémur.

La intensidad de los choques fue de grado tal como para producir contracciones iguales en magnitud a un espasmo máximo producido indirectamente. Las contracciones fueron registradas por medio de miógrafos de resorte de acero plano e inscritas sobre papel ahumado. En gatos, perros y conejos se registró la presión arterial de la arteria carótida mediante un manómetro de

mercurio. Las drogas fueron inyectadas en la vena yugular a través de una cánula.

En dos experimentos con gatos se registraron contracciones máximas del músculo tibial anterior, y el músculo fue preparado para la inyección arterial de acetilcolina, según la técnica de Brown (1938).

En otros dos experimentos con gatos se registraron los potenciales de acción del músculo gástrico simultáneamente con los potenciales de acción nerviosos registrados antidrómicamente desde el cabo periférico de la raíz abdominal S<sub>1</sub> seccionada. Después de la amplificación por medio de preamplificadores Tektronix (tipo 122), los potenciales de acción musculares y nerviosos fueron exhibidos simultáneamente en un osciloscopio Textronix (tipo 502) de haz doble. El método empleado fue idéntico al descrito por Blaber y Bowman (1963).

La temperatura muscular fue registrada empleando una sonda termopar tipo (RM4) conectada a un termómetro eléctrico (Ellab, Copenague, tipo TE3). En el experimento efectuado para averiguar los efectos de diferentes temperaturas, se modificó la temperatura del músculo por calentamiento directo con una lámpara o enfriándolo con hielo triturado colocado alrededor del músculo y variando la temperatura de la mesa de operaciones.

También se efectuaron experimentos con preparaciones de diafragma-nervio frénico aislado de ratas (Büllbring, 1946). La preparación se suspendió en un baño de 100 ml de solución de Ringer que contenía (g/l): NaCl, 8; KCl, 0.2; CaCl<sub>2</sub>, 0.14; glucosa, 2; NaHCO<sub>3</sub>, 0.36; y a través del cual se hizo burbujear una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de bióxido de carbono. Las contracciones fueron producidas a la fre-

cuencia de 4/min, estimulando el nervio con pulsaciones rectangulares de 1 mseg de duración y de intensidad mayor que la requerida para producir el espasmo máximo. Se comparó la potencia con la de la tubocurarina.

Los músculos rectos mayores del abdomen de ranas se mantuvieron suspendidos en la solución Ringer para rana descrita por Jindal y Despande (1960).

#### *Animales no anestesiados*

Ratones: Se formaron grupos de 10 ratones albinos con peso entre 18 y 22 g y se les infundieron diferentes concentraciones de pancuronio y tubocurarina en la vena caudal. La infusión se administró a razón de 0.125 ml por minuto a través de un tubo flexible de nylon (calibre 00) y con aguja calibre 16.

Se registró el tiempo que tardó cada ratón en soltarse de una malla vertical de alambre (malla de 1 cm) y se refirió al tiempo de inyección por 20 g de peso corporal. Se ajustó la concentración de las drogas para obtener el resultado final en tres minutos de infusión. La duración de la parálisis se determinó según el tiempo que transcurrió hasta que los ratones pudieron nuevamente sostenerse agarrados a la malla.

Conejos: Se escogieron conejos (machos blancos de Nueva Zelanda) con peso entre 3.000 y 3.100 kg. Se evaluaron la potencia y la duración de la acción del pancuronio, comparadas con las de la tubocurarina por el método de "inclinación de la cabeza" de Haining, Johnston y Smith (1960).

Pollos: El pancuronio también fue inyec-

tado intraperitonealmente a pollos de un día de vida.

#### *Acción atropinoide*

La potencia del pancuronio para disminuir la contracción del íleon aislado del cobayo provocada por la acetilcolina fue comparada con la de la atropina. Se empleó el método de superfusión según Adam, Hardwick y Spencer (1954).

#### *Liberación de histamina*

Se investigó la liberación de histamina por el pancuronio en dos especies. En el gato se estudió la reacción depresora tardía descrita por Collier y Macauley (1952); en el cobayo se empleó la prueba de la broncoconstricción, según Konzett y Rossler (1940).

#### *Toxicidad aguda*

Los valores de la LD50 fueron determinados en ratas blancas machos Wistar con peso entre 100-150 g, mediante aplicación intravenosa; en ratones machos con peso entre 18 y 22 g, mediante de inyección intravenosa, intraperitoneal y subcutánea y por administración oral; en conejos, con peso entre 3.0-3.1 kg, mediante inyección intravenosa. Se utilizaron 10 animales por grupo, y el método de cálculo, con base en datos de 24 horas, fue el de Litchfield y Wilcoxon (1949).

También se inyectó pancuronio por vía intravenosa a gatos anestesiados y ventilados artificialmente, como antes se ha descrito. Las dosis fueron incrementadas para determinar la máxima tolerable.

#### *Drogas*

Las drogas empleadas fueron: tartrato ácido de (—) adrenalina; cloruro de edro-

fonio; bromuro de hexametonio; fosfato ácido de histamina; metilsulfato de neostigmina; tartrato ácido de nicotina; cloruro de potasio; yoduro de suxametonio; cloruro de tubocurarina y bromuro de pancuronio. Antes de emplear estas drogas fueron disueltas en solución del 0.9% (p/v) de NaCl, con excepción de los preparados aislados de tejidos, con los cuales se usó la solución Ringer apropiada. Las dosis que se mencionan en el texto se refieren a las sales.

## RESULTADOS

### *Acción bloqueadora neuromuscular*

En dosis de 0.02-0.05 mg/kg por vía intravenosa, el pancuronio bloqueó las contracciones máximas inducidas indirectamente de los músculos gastrocnemio y tibial anterior del gato. Durante el bloqueo de las contracciones indirectamente inducidas, la estimulación directa del músculo produjo contracciones normales. En experimentos en que los potenciales de acción de los nervios y músculos fueron provocados simultáneamente, las mismas dosificaciones de pancuronio anulaban los potenciales de acción muscular, mientras que los potenciales de acción nerviosa permanecieron inalterados. Estos resultados localizan el sitio de acción del pancuronio en la sinapsis neuromuscular.

Las contracciones del músculo tibial anterior del gato, provocadas por la inyección arterial de 5 mcg de acetilcolina, fueron completamente bloqueadas por la inyección intravenosa de pancuronio a dosis de 0.01-0.02 mg/kg, aun cuando las dosificaciones más bajas disminuyeron sólo parcialmente las contracciones máximas provocadas por estimulación nerviosa. Este

resultado demuestra que la acción del pancuronio es esencialmente una acción post-sináptica antiacetilcolina parecida a la de la tubocurarina, y esta conclusión es sostenida por los resultados obtenidos en el recto mayor del abdomen de la rana, en el cual el pancuronio, en concentraciones de 0.1-0.3 mcg/ml, suprimió las contracciones producidas por 3 mcg/ml de acetilcolina.

El bloqueo neuromuscular producido por el pancuronio en gatos anestesiados mostró las características del bloqueo producido por las drogas bloqueadoras no despolarizantes. Por lo tanto:

- 1 El bloqueo fue antagonizado por el edrofonio (1 mgcbg) y por la neostigmina (0.1 mg/kg).
- 2 El suxametonio, en dosis de 0.1 a 0.2 mg/kg, antagonizó el bloqueo neuromuscular producido por el pancuronio.
- 3 Una dosis pequeña de tubocurarina (0.02 mg/kg), insuficiente en sí para disminuir el espasmo, aumentó el bloqueo parcial producido por el pancuronio.
- 4 El cloruro de potasio, en dosis de 1 mg/kg, se opuso al bloqueo parcial producido por el pancuronio.
- 5 La adrenalina, en dosis de 0.01 mg a 0.1 mg/kg, también se opuso al bloqueo parcial producido por el pancuronio.
- 6 Durante el bloqueo parcial por el pancuronio de las contracciones máximas, la tensión de la tetania indirectamente provocada (50/seg por 8 seg) se sostuvo mal y las contracciones postetánicas aumentaron temporalmente en amplitud.

7 La extensión del bloqueo producido por el pancuronio 0.012 mg/kg) en el gato fue menor a temperaturas bajas. La temperatura muscular varió entre 23° y 43°C.

Cabe suponer que una molécula tan grande como la del pancuronio esté exenta de acción despolarizante. Esto fue confirmado por los resultados obtenidos en experimentos practicados con músculos de ranas y aves, que no descubrieron pruebas de la reacción de contractura característica con las drogas despolarizantes. En la gallina anestesiada, el pancuronio, a dosis de 0.05 mg/kg, bloqueó las contracciones máximas provocadas indirectamente. Se compararon los efectos del pancuronio y la tubocurarina sobre el músculo gastrocnemio de la gallina y de los cuales se contrastaron con la contractura que induce el suxametonio. En el pollo no anestesiado, la dosis de pancuronio de 1 mg/bg, inyectada intraperitonealmente, causó parálisis flaccida, y en el músculo recto mayor del abdomen aislado de la rana, concentraciones de 0.1-0.3 mcg/ml no tuvieron efecto patente por sí mismas, pero bloquearon la reacción a la acetilcolina. Todos estos resultados son característicos de las drogas de bloqueo del tipo no despolarizante, como la tubocurarina (ver, p. ej., Bowman, 1964).

#### *Potencia relativa*

La Tabla I da los resultados obtenidos de experimentos en los cuales la potencia y duración de la acción de pancuronio fueron comparadas con las de la tubocurarina en diferentes especies. En diecinueve gatos anestesiados, se comparó la potencia y duración de acción del pancuronio con las

de la tubocurarina. La acción del pancuronio fue de un orden de potencia diez veces mayor que la de la tubocurarina, a igualdad de peso; pero la duración de la acción de dosis de igual efecto fue similar. Potencias relativas similares se obtuvieron en experimentos con conejos y gallinas anestesiados, y en la prueba de "inclinación de cabeza" con conejos (Tabla I). Sin embargo, en el perro anestesiado, el pancuronio fue solamente cinco veces más potente que la tubocurarina, aunque la duración de su acción fue casi la misma (Tabla I). En el ratón, el pancuronio fue sólo ligeramente más potente que la tubocurarina y la duración de su acción fue alrededor de tres veces mayor (Tabla I). En el diafragma aislado de la rata, el pancuronio fue ligeramente menos potente que la tubocurarina, y en el músculo recto mayor del abdomen aislado de la rana fue casi dos veces más potente (Tabla I).

#### *Acción bloqueadora ganglionar*

El pancuronio es casi cuatro veces menos potente que el hexametonio y aproximadamente la mitad que la tubocurarina para bloquear a la respuesta del íleon del cobayo a la nicotina, y es casi ocho veces menos potente que el hexametonio para bloquear las contracciones de la membrana nictitante del gato provocadas por estimulación preganglionar del tronco simpático cervical. En ninguno de los experimentos efectuados en animales anestesiados, el pancuronio produjo caída de la presión sanguínea, confirmando así que su acción de bloqueo ganglionar es débil.

Líneas de dosis-reacción de mejor ajuste para el bloqueo neuromuscular en la preparación ciático-gastrocnemio del gato anes-

TABLA I

ESPECIES	Núm. de Estimaciones	Potencia Relativa (tubocurarina=1.0)	Duración de Acción (tubocurarina=1.0)
(a) animales anestesiados			
conejos .....	3	11.5 ± 2.7	0.99 ± 0.26
gatos .....	19	9.41	1.15
perros .....	2	5.19 ± 1.13	0.88 ± 0.17
gallinas .....	3	10 (aproxim.)	1 (aproxim.)
(b) animales en ayunas			
ratones .....	4	1.88 ± 0.04	3.21 ± 0.08
conejos .....	4	10.9 ± 0.58	1.06 ± 0.57
(c) tejidos aislados			
diafragmas de ratas .....	6	0.60 ± 0.004	—
recto mayor del abdomen de ranas .....	6	2.3 ± 0.55	—

POTENCIA Y DURACION RELATIVAS DE LA ACCION DEL PANCURONIO EN DIFERENTES PRUEBAS

Los resultados aquí señalados representan la potencia y duración relativas de la acción del pancuronio en comparación con la tubocurarina, a la que se le fija un valor igual a 1.0. En animales anestesiados se utilizó la preparación del ciático-gastrocnemio. La potencia y la duración de acción relativas fueron determinadas gráficamente en comparación con la tubocurarina, utilizando las respectivas líneas de reacción a las diferentes dosis del mismo animal. Se dan las desviaciones estándar, excepto por lo que concierne a los gatos, en cuyo caso se hizo una estimación directa a partir de las líneas de mejor coincidencia obtenida de diecinueve experimentos combinados; en las gallinas se obtuvo una aproximación. Se usaron ratones despiertos para comparar la potencia y duración de la acción en relación con la tubocurarina, mediante comparación gráfica directa del tiempo de infusión intravenosa necesario para causar pérdida de la fuerza de aprehensión y el tiempo de recuperación. Con los conejos se siguió la técnica de la "caída de la cabeza", según Haining, Johnston y Smith (1960). Se practicaron determinaciones de potencia relativa en tejidos aislados, por medio de ensayos de 2 x 2, en comparación con la tubocurarina.

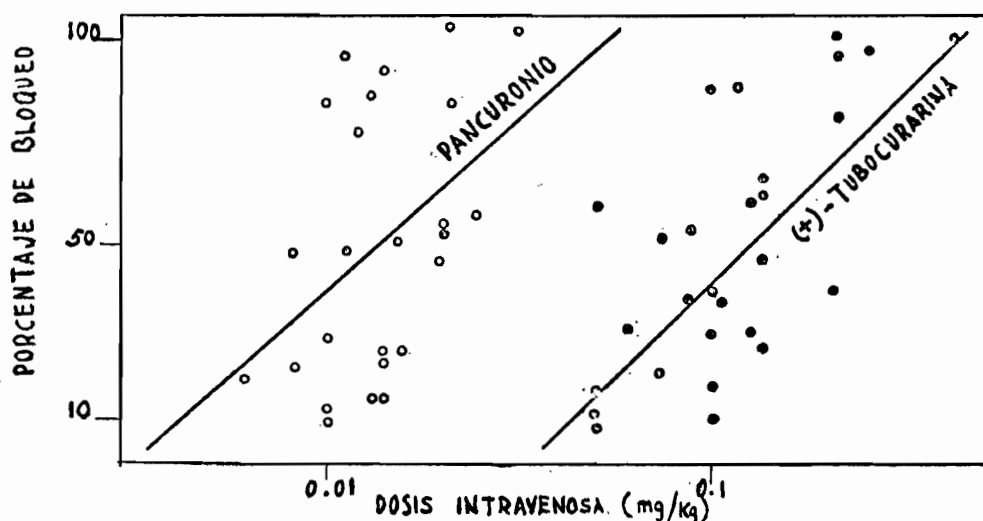


FIGURA 1

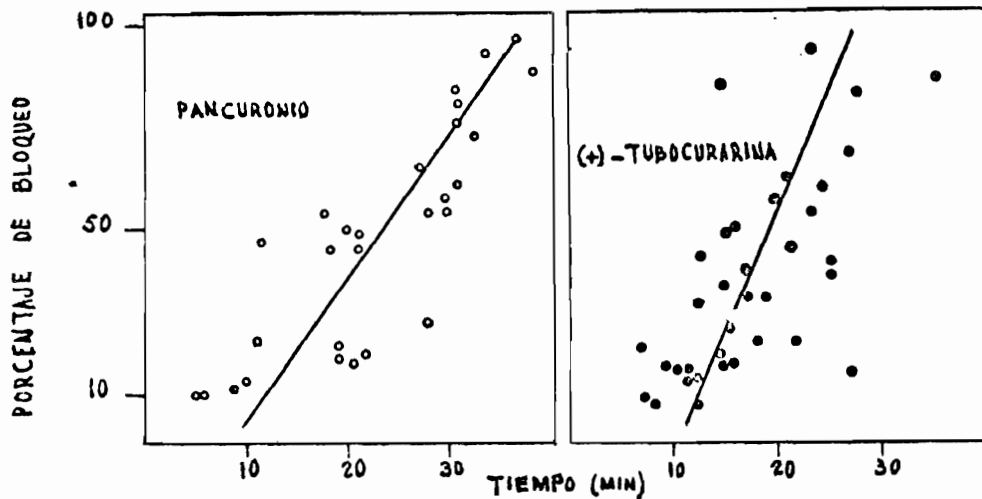


FIGURA 2

tesiado con cloralosa-pentobarbitona, después de la aplicación de pancuronio y de tubocurarina. Abscisas (escala log.): dosis intravenosa de la droga en mg/kg de peso corporal. Ordenadas: porcentaje del bloqueo neuromuscular. Resultados de 19 experimentos.

#### Actividad atropinoide

Se encontró que el pancuronio está casi desprovisto de la actividad que ejerce la atropina sobre el íleon del cobayo. En comparación con la atropina (potencia=1.0) el promedio de tres estimaciones de la potencia del pancuronio fue de  $2.6 \times 10^{-8}$ .

Relación enter el bloqueo neuromuscular y la duración de la acción del pancuronio y los de la tubocurarina sobre la preparación ciático-gastrocnemio del gato. Abscisas: duración en minutos. Ordenadas: porcentaje de bloqueo neuromuscular. Resultados combinados de 19 experimentos computados para dar líneas de mejor ajuste.

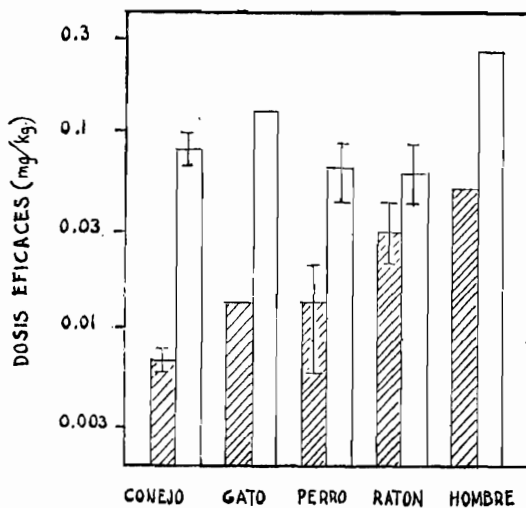


FIGURA 3

Dosis eficaces para el bloqueo neuromuscular del bromuro de pancuronio (▨) y la tubocurarina (□) para varias especies ( $\pm$  S.D.). Preparación ciático-gastrocnemio de conejo, gato y perro; fuerza de "agarre" del ratón, Valores en el hombre

según Baird y Reid (1967) para el bloqueo de la transmisión entre el nervio cubital y los músculos hipotenares.

**TABLA II**  
**POTENCIA DEL BLOQUEO GANGLIONAR DEL PANCURONIO IN VITRO Y EN VIVO**

Los resultados indican la potencia relativa del bloqueo ganglionar por el hexame-

tonio o la tubocurarina ( $=1.0$ ), obtenidos por comparación gráfica directa. In vitro, se usó el método del íleon aislado del cobayo estimulado por la nicotina, según Feldberg (1951); y en vivo, las contracciones de la membrana nictitante del gato anestesiado con pentobarbitona en respuesta a la estimulación preganglionar del tronco simpático cervical; las drogas se inyectaron por vía intravenosa.

**TABLA II**

PREPARADO	Núm. de Estimaciones	POTENCIA DEL BLOQUEO GANGLIONAR ( $\pm$ error tolerable)	
		hexametonio=1.0	tubocurarina=1.0
Ileon de cobayo estimulado con nicotino .....	6	0.251 $\pm$ 0.013	0.563 $\pm$ 0.016
Membrana nictitante de gato anestesiado .....	5	0.120 $\pm$ 0.012	—

*Liberación de histamina*

La broncoconstricción producida por la histamina y la tubocurarina en cobayos anestesiados no se presentó cuando se administró el pancuronio, ni siquiera con dosis tan altas como 10 mg/kg, lo que indica la ausencia total de liberación de histamina por el pancuronio. Esto se confirmó por la estabilidad de la presión sanguínea después de la inyección de pancuronio al gato tratado con hexametonio.

*Toxicidad aguda*

En la Tabla III se dan los valores de la LD<sub>50</sub> del pancuronio, para varias especies. En todos los casos, la muerte sobrevino por la parálisis respiratoria causada por la acción de bloqueo neuromuscular de la droga. Los resultados en ratones demuestran que la toxicidad es máxima con la inyección intravenosa y mínima en administración oral. Las grandes dosis necesarias en administración oral indican que la absorción

**TABLA III**

**TOXICIDAD AGUDA DEL PANCURONIO PARA VARIAS ESPECIES**  
Los límites de error de 95% aparecen entre paréntesis.

Especies	Vía de Administración	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Ratón	Intravenosa	0.047 (0.045—0.050)
	Intraperitoneal	0.152 (0.144—0.160)
	Oral	0.167 (0.158—0.175)
	Subcutánea	21.9 (19.0—25.2)
Rata	Intravenosa	0.153 (0.136—0.172)
Conejo	Intravenosa	0.016 (0.015—0.018)



es pobre, como puede esperarse de este tipo de molécula. El conejo es más sensible al pancuronio que el ratón, el que a su vez es mucho más sensible que la rata. En gatos anestesiados y artificialmente ventilados, el pancuronio en dosis de 500 mg/kg, no produjo toxicidad aguda por más de dos horas después de la inyección.

#### COMENTARIO

Los resultados muestran que el pancuronio es un potente agente bloqueador neuromuscular, con duración de acción comparable a la de la tubocurarina. Las pruebas demuestran que su mecanismo de acción es parecido al de la tubocurarina. En contraste con ésta, su potencia de bloqueo ganglionar y liberadora de histamina es muy débil; en consecuencia, los efectos colaterales, hipotensión y broncoespasmo, que causa la tubocurarina, no los produce el pancuronio. Estos hallazgos han sido comprobados clínicamente (Baird y Reid, 1967). Los datos sobre sensibilidad de especies animales indican que la dosificación para el ratón, en mg/kg, se aproxima a la dosis humana.

En relación con las drogas conocidas, el pancuronio es uno de los más potentes agentes de bloqueo neuromuscular de que se ha informado hasta la fecha. Cierta alcaloide natural de estructura esteroide, la maluetina (3  $\beta$ , 20  $\beta$ -bis dimetilamino-5  $\alpha$ -pregnano bismetocloruro) y sus esteroisómeros (Khuong Huu-Lainé y Pinto-Scognamiglio, 1964) tienen potencia similar a la tubocurarina, pero producen hipotensión al ser inyectados. Recientemente, Alauddin, Caddi, Lewis, Martin-Smith y Sugrue (1965) y Bamford, Davis y Parnell (1967) han sintetizado y ensayado esteroisómeros de esteroides dialcilaminínicos y cicloaminínicos

substituidos en posiciones 3 y 17; todos ellos mostraron menor potencia que la tubocurarina administrados al gato o al mono. En el pancuronio, los grupos acetílicos presentes en las posiciones 3 y 17, contiguos a las funciones amino en 2 y 16, pueden producir relativa compresión estérica en los anillos A y D de la molécula esteroide, de manera que el anillo A es mantenido en una posición intermedia oblicua entre las posibles configuraciones rígidas (lancha o silla), las cuales podrían ser óptimas en cuanto a su aptitud para fijarse en los receptores y así contribuir a la alta potencia obtenida.

#### RESUMEN

1. Se describe la actividad de bloqueo neuromuscular de un nuevo aminosteroido: el pancuronio (2  $\beta$ , 16  $\beta$ -dipiperidino-5  $\alpha$ -androstano-3  $\alpha$ , 17  $\beta$ -diol diacetato dimetobromuro).
2. El pancuronio es diez veces más potente que la tubocurarina, según las especies empleadas para la investigación, mientras que posee similar duración de acción.
3. La acción del pancuronio es no depolarizante, está libre de acción histaminógena, es un potente bloqueador ganglionar y no produce hipotensión.

#### SUMMARY

The neuromuscular blocking activity of a new aminosteroid: pancuronium (2  $\beta$ , 16  $\beta$ -dipiperidino-5  $\alpha$ -androstano-3  $\alpha$ , 17  $\beta$ -diol diacetate dymetobromide). Pancuronium is ten time as potent as tubocurarine and a similar duration of action. Pancuronium activity is not depolarizing, it is

free from histaminogen action, it is a strong ganglionic blocking agent and is not hypotensive.

Los autores desean agradecer al Prof. W. C. Bowman (Universidad de Strathclyde) por los resultados de los experimentos de medición de potenciales de acción y efectos de la inyección arterial de acetilcolina al gato, y por su valiosa ayuda en la preparación de este trabajo. También manifiestan su gratitud al Dr. B. B. Vargaftig (Laboratorios Endopancrine, S. A.) por la valoración de la broncoconstricción en cobayos.

#### REFERENCIAS

1. Adam, H. M., Hardwic, D. C. y Spencer, K. E. V.: Assay of histamine on the isolated guinea-pig intestine by the method of superfusion. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 9, 360-366, 1954.
2. Alauddin, M., Caddy, B., Lewis, J. J., Martin-Smith, M. y Sugrue, M. F.: Non-depolarizing neuromuscular blockade by 3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -bis (quaternary ammonium) 5 $\alpha$ -androstanes. *J. Pharm. Pharmac.*, 17, 55-59, 1965.
3. Baird, W. L. M. y Reid, A. M.: The neuromuscular blocking properties of a new steroid compound, pancuronium bromide. *Br. J. Anaesth.*, 39, 775-780, 1967.
4. Bamford D. G., Biggs, D. F., Davis, M. y Parnell, E. W.: Neuromuscular blocking properties of stereoisomeric androstane 3, 17-bisquaternary ammonium salts. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 30, 194-202, 1967.
5. Blaber, L. C. y Bowman, W. C.: Studies on the repetitive discharges evoked in motor nerve and skeletal muscle after injection of anticholinesterase drugs. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 20, 326-344, 1963.
6. Bowman, W. C.: Neuromuscular blocking agents. In *Evaluation of drug activities: pharmacometrics*, vol. 1, ed. Laurence, D. R. y Bacharach, A. L., pp. 325-351. London and New York: Academic Press, 1964.
7. Brown, G. L.: The preparation of the tibialis anterior (cat) for close arterial injection. *J. Physiol., Lond.*, 92, pp. 22-23, 1938.
8. Buckett, W. R., Hewett, C. L. y Savage, D. S.: Potent steroidal neuromuscular blocking agents. *Chim. Ther.*, 2, 186, 1967.
9. Bülbiring, E.: Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. *Br. J. Chemother.*, 1, 38-61, 1946.
10. Collier, H. O. J. y Macauley, B.: The pharmacological properties of "Laudolissin", a long-acting curarizing agent. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 7, 398-408, 1952.
11. Feldberg, W.: Effect of ganglion-blocking substances on the small intestine. *J. Physiol., Lond.*, 113 483-505, 1951.
12. Haining, C. G., Johnston, R. G. y Smith, J. M.: The neuromuscular blocking properties of a series of bisquaternary tropeines. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 15, 71-81, 1960.
13. Jindal, M. N. y Deshpande, V. R.: Neuromuscular blockade by streptomycin and dihydrostreptomycin. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 15, 506-509, 1960.
14. Khuong Huu-Lainé, F. y Pinto-Scognamiglio, W.: Activite curarisants du lichlorure de 3 $\beta$ , 20 $\alpha$ -pregnane (Malouétine) et de ses stereoisomers. *Archs int. Pharmacodyn. Thé.*, 147, 209-219, 1964.
15. Konzett, H. y Rössler, R.: Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronchialmuskulatur. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak., 195, 71-74, 1940.
16. Lewis, J. J., Martin-Smith, M., Muir, T. C. y Ross, H. H.: Steroidal monoquaternary ammonium salts with non-depolarizing neuromuscular blocking activity. *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 502-508, 1967.
17. Litchfield, J. T. y Wilcoxon, F.: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 96, 99-113, 1949.