

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DEL METODO DEL LACTOBIONATO DE

ERITROMICINA PARA LA VALORACION DE

ANALGESICOS

Tesina presentada por M^a Pilar
Vinardell Martinez-Hidalgo para
obtar al grado de licenciada

Este trabajo ha sido dirigido
por la Dra. Dña. Juana M^a Planas
Rosselló.

Barcelona, julio 1978

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701477805

A mis padres.

Mi más sincero agradecimiento,

a la Dra. Juana M^a Planas por su
constante interés y ayuda en la
dirección de la presente tesina.

al Prof. Dr. Antonio Torralba,
Catedrático de Fisiología Animal
por haberme facilitado los medios
necesarios para realizar este tra-
bajo.

a todos los compañeros del labora-
torio que me han animado en todo
momento.

INDICE

Pag.

	<u>Pag.</u>
3.- MATERIAL Y METODOS.....	32
4.- RESULTADOS.....	39
4.1.- ESTUDIO DEL METODO.....	40
4.2.- RITMO CIRCADIANO.....	44
4.3.- VALORACION DE ANALGESICOS.....	48
4.3.1.- ANALGESICOS NO NARCOTICOS.....	49
4.3.1.1.- ASPIRINA.....	49
4.3.1.2.- FENILBUTAZONA.....	52
4.3.1.3.- INDOMETACINA.....	55
4.3.2.- ANALGESICOS NARCOTICOS.....	61
4.3.2.1.- MORFINA.....	61
4.3.2.2.- CODEINA.....	64
4.3.2.3.- d-PROPOXIFENO.....	64
4.3.3.- ANTAGONISTAS DE LOS NARCOTICOS..	69
4.3.3.1.- NALORFINA.....	69
4.3.3.2.- NALOXONA.....	72
5.- DISCUSION.....	78
6.- CONCLUSIONES.....	94
7.- BIBLIOGRAFIA.....	97

INDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
TABLA I: Significación de la administración repetida a diferentes pesos en ratón macho.....	41
TABLA II: Comparación de la primera administración en función del peso en ratón macho.....	43
TABLA III: Estudio de la variación en el nº de contracciones a lo largo del día en ratón macho (20-25 g).....	45
TABLA IV: Estudio de la variación en el nº de contracciones a lo largo del día en ratón hembra (18-20 g).....	46
TABLA V: ASPIRINA. Valores de las contracciones.	50
TABLA VI: FENILBUTAZONA. Valores de las contracciones.....	53
TABLA VII: INDOMETACINA. Valores de las contracciones.....	56
TABLA VIII: Actividad analgésica en no narcóticos.....	58
TABLA IX: MORFINA. Valores de las contracciones.	62
TABLA X: CODEINA. Valores de las contracciones..	65
TABLA XI: d-PROPOXIFENO. Valores de las contracciones.....	67

TABLA XII: NALORFINA. Valores de las contrac-	
ciones.....	70
TABLA XIII: NALOXONA. Valores de las contrac-	
ciones.....	73
TABLA XIV: Actividad analgésica en narcóticos..	75
TABLA XV: Potencia analgésica de la ASPIRINA,	
encontrada por varios autores.....	83
TABLA XVI: Potencia analgésica de la FENILBU-	
TAZONA encontrada por varios autores.	84
TABLA XVII: Potencia analgésica de la INDOME-	
TACINA encontrada por varios autores.	85
TABLA XVIII: Potencia analgésica de la MORFINA	
encontrada por varios autores.....	86
TABLA XIX: Potencia analgésica de la CODEINA	
encontrada por varios autores.....	87
TABLA XX: Potencia analgésica del d-PROPOXIFENO	
encontrada por varios autores.....	88
TABLA XXI: Potencia analgésica de la NALORFINA	
encontrada por varios autores.....	89

INDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1: Representación de la variación en el n°de contracciones a lo largo del día en ratón macho y hembra.....	47
Figura 2: ASPIRINA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	51
Figura 3: FENILBUTAZONA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	54
Figura 4: INDOMETACINA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	57
Figura 5: Rectas de regresión para analgésicos no narcóticos.....	60
Figura 6: MORFINA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	63
Figura 7: CODEINA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	66
Figura 8: d-PROPOXIFENO. % de respuesta frente a sus propios controles.....	68
Figura 9: NALORFINA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	71
Figura 10: NALOXONA. % de respuesta frente a sus propios controles.....	74
Figura 11: Rectas de regresión para analgésicos narcóticos.....	77

AEREVIATURAS

Ac.....	Acido
col.....	Colaboradores
DE ₅₀	Dosis eficaz cincuenta
Fig.....	Figura
g.....	Gramos
i.m.....	Via intramuscular
i.p.....	Via intrperitoneal
i.v.....	Via intravenosa
mi.....	Minutos
pag.....	Página
PBQ.....	P-Benzoquinona
p.o.....	Via oral
PQ.....	Fenilquinona
Ref.....	Referencia
s.c.....	Via subcutánea
SNC.....	Sistema nervioso central
t.....	Tiempo

1.- INTRODUCCION

Los analgésicos son los fármacos empleados para el alivio del dolor. Cuando se estudia una sustancia que se supone analgésica es necesario valorarla. Para ello es preciso utilizar un método por el que se provoque dolor a un animal y comprobar si la sustancia es capaz de aliviarlo.

Existe una gran variedad de métodos para valorar el grado de analgesia, pero ninguno de ellos reúne suficientes condiciones como para permitir una inequívoca extrapolación de los resultados obtenidos en farmacología experimental a la aplicación terapéutica.

En la presente tesina se ha demostrado la validez de nuestro método para valorar analgésicos narcóticos y no narcóticos y se ha propuesto el posible mecanismo de acción del agente nociceptivo.

2.- PARTE TEORICA

2.1.- ANALGESICOS.

Los analgésicos (an= sin; algos= dolor) o anodinos (odyne = dolor) calman o suprimen el dolor sin pérdida apreciable de la conciencia.

Los analgésicos comprenden un heterogéneo conjunto de fármacos, que aún presentando estructuras químicas y mecanismos de acción diferente, presentan indicaciones terapéuticas comunes.

La clasificación de los analgésicos varía según los distintos autores, así LITTER (77) los divide en dos grandes grupos:

- ANTIPIRETICOS, que gozan de la propiedad de disminuir la temperatura en sujetos febriles y no son drogas de adicción.

- HIPNOANALGESICOS, que además de aliviar el dolor provocan sueño y producen adicción.

TURNER (108) lo hace según:

- ANTIPIRETICOS PERIFERICOS, que actúan a la vez como antiinflamatorios, disminuyendo la temperatura y el edema.

- ANTIPIRETICOS HIPOTALAMICOS que disminuyen la tem-

peratura corporal sin producir adicción.

- NARCOTICOS, que alivian el dolor sin efectos sobre la temperatura y el edema.

Por otro lado GOODMAN Y GILMAN (46) los dividen en dos grandes grupos de analgésicos:

- NO NARCOTICOS

- NARCOTICOS

Esta última clasificación será la considerada a lo largo del presente trabajo.

2.1.1.- ANALGESICOS NO NARCOTICOS

Dentro de este grupo se encuentran aquellos fármacos que alivian el dolor pero no producen adicción.

Siguiendo la clasificación de GOODMAN Y GILMAN (46) podemos dividirlos en:

- SALICILATOS: El prototipo de este grupo lo constituye la aspirina (ácido acetil salicílico). Generalmente actúan en virtud de su contenido en ácido salicílico, aunque la aspirina es activa "per se".

- ANTIINFLAMATORIOS: Dentro de este grupo hay que

distinguir según su estructura química, los derivados del pirazol representados por fenilbutazona, antipirina, aminopirina y los derivados del indol con la indometacina.

- ANTIPIRETIICOS: Constituidos por los derivados del p-aminofenol como la fenacetina y el acetominofeno.

2.1.1.1. ASPIRINA

Es el agente analgésico, antipirético y antiinflamatorio más empleado y es el estandar de referencia para la comparación y evaluación de los salicilatos.

El tipo de dolor que alivia es el de baja intensidad, en especial dolor de cabeza, mialgia y el de otras estructuras somáticas, mientras que el dolor visceral está poco afectado.

Actúa en virtud de un doble efecto:

- Periférico por el cual el alivio del dolor resulta de una modificación de la causa de éste en el punto de origen. Posee propiedades antiinflamatorias y aunque no se sabe el mecanismo de acción parece ser que está relacionada con una disminución del contenido de prostaglandinas (30,38,110).

- Sobre el SNC se ha sugerido una acción sobre el

hipotálamo, tanto para sus efectos analgésicos como antipiréticos. Provoca un descenso en la temperatura corporal, siendo rápido en sujetos y animales febriles, pero no en los normales (103). Se llegó a pensar que actuaba sobre el centro termorregulador.

El hecho de no producir trastornos mentales ni anestesia llevó a pensar que la acción no era sobre la corteza cerebral, siendo probable que actuase sobre el tálamo óptico (42), uno de los centros de las sensaciones dolorosas.

Dada su relativa débil acción analgésica, la evaluación experimental presenta muchos problemas y parece ser que el dolor patológico es más susceptible de aliviarse que el inducido experimentalmente (7,101).

2.1.1.2.- FENILBUTAZONA

Es un derivado de la pirazolina que fue introducido en 1949 para el tratamiento de la artritis reumatoide y enfermedades relacionadas.

Es biotransformada en los microsomas hepáticos (46) dando dos metabolitos: la γ - hidroxifenilbutazona (poco activo) y la oxifenbutazona (potente antiinflamatorio).

Es muy tóxica debido a que provoca la inhibición de

enzimas del ciclo de Krebs, lo que repercute en un descenso en la energía celular.

2.1.1.3.-INDOMETACINA

Posee propiedades antiinflamatorias y antipiréticas. Es además analgésico y es incierto que esta propiedad difiera de la antiinflamatoria.

En humanos una dosis de 50 mg equivale a 600 mg de aspirina.

Dado su toxicidad no es recomendado su empleo general como analgésico-antipirético.

Inhibe la síntesis de prostaglandinas y éste puede ser uno de los mecanismos de actuación (38).

2.1.2.- ANALGESICOS NARCOTICOS

Constituyen un grupo de fármacos usados para el alivio del dolor pero que presentan el riesgo de producir dependencia física y psíquica. También se conocen con el término de opiáceos.

Hay que distinguir entre los de origen natural y sintético.

- origen natural que constituyen los alcaloides del

opio y estan representados por morfina y codeina.

- sintéticos constituidos a su vez por derivados de la meperidina y de la metadona.

Entre los derivados de la meperidina se encuentran difenoxilato, anileridina, alfapronina. Como ejemplos de derivados de metadona está el propoxifeno.

2.1.2.1.- MORFINA

La acción fundamental de la morfina es la analgésica, siendo un efecto selectivo que se obtiene con pequeñas dosis y sin depresión de las otras formas de sensibilidad táctil, térmica y profunda. En realidad con dosis terapéuticas de morfina el estímulo doloroso en sí puede ser reconocido pero no percibido como doloroso. Muchos pacientes dicen que el dolor se siente pero es más confortable.

Actúa sobre todo tipo de dolor, ya sea profundo o visceral, sea leve o de mayor intensidad. Actúa sobre dos aspectos del dolor elevando el umbral de percepción dolorosa y alterando la reacción psíquica, de modo que la ansiedad, aprensión y el miedo desaparecen.

Hasta el presente los mecanismos por los cuales actúa la morfina y otras drogas opiáceas no estan claros. Han sido estudiados unos receptores para los opiáceos en

tejidos neuronales de vertebrados (44,78,93,94,100). Existen evidencias que interaccionan con más de un neurotransmisor ya sea directa o indirectamente.

2.1.2.2.- CODEINA

Es el derivado metilado de la morfina. Posee aproximadamente el 20% de la actividad de la morfina, en el hombre. Este hecho se explica porque la codeína es transformada en morfina al ser demetilada por los enzimas hepáticos y así resulta que es la morfina la que penetra en el cerebro y provoca los efectos analgésicos. WAY (112) ha demostrado que aunque la codeína puede aliviar el dolor con relativa eficacia, en las ratas, si se inyecta i.v., sin embargo no posee actividad analgésica al ser inyectada directamente en el cerebro. En cambio la morfina se muestra activa en el último caso.

2.1.2.3.- PROPOXIFENO

Es una sustancia que posee cuatro estereoisómeros de los cuales sólo el α tiene actividad analgésica, residiendo ésta en el isómero dextrorrotatorio: d-propoxifeno.

Produce analgesia por actuar sobre el SNC y no posee acciones antipiréticas o antiinflamatorias.

Se requieren dosis orales de 90 a 120 mg para producir los mismos efectos que 60 mg de codeína (3).

2.1.3.- ANTAGONISTAS DE LOS NARCOTICOS

Existen varios derivados de la morfina que actúan como antagonistas de ella, aparentemente por un mecanismo de competición en los receptores celulares, debido a la analogía en la estructura química.

El grado de antagonismo no depende sólo de la dosis de antagonista si no también de la del opiáceo y del grado de dependencia física. Se han realizado numerosos estudios sobre los antagonistas de los opiáceos (12,67,82).

Atendiendo a sus acciones hay que distinguir dos grupos:

- Parciales agonistas del tipo de la nalorfina. Además de antagonizar a la morfina, poseen acciones analgésicas.

- Antagonistas puros de los narcóticos representados por la naloxona.

2.1.3.1.- NALORFINA

Desde 1915 en que POHL observó las propiedades de la nalorfina de abolir la depresión respiratoria causada por la morfina, se inició el estudio de los antagonistas de los narcóticos.

LASAGNA Y BEECHER (70) apreciaron que a pesar de que la nalorfina antagonizaba los efectos analgésicos de la morfina, cuando se administraba a pacientes con dolor postoperatorio, producía efectos analgésicos. Esta misma acción ha sido observada por otros autores (60,61,65).

Es de particular interés que a pesar de mostrar efectos analgésicos en el hombre, la nalorfina no muestra actividad con los tests usuales para analgésicos potentes, como el de la placa caliente o el de la pinza en la cola (1,47,50,116). Utilizando el test de SIEGMUND (99) si pudo demostrarse su acción analgésica.

Existe evidencia de que los antagonistas de los narcóticos compiten con las drogas como la morfina por receptores opiáceos estereoespecíficos y aparentemente ocupan estos sitios dada la semejanza estructural. MARTIN (82) propuso la existencia de un receptor similar pero distinto del receptor opiáceo, en el cual los antagonistas como la nalorfina producen sus acciones agonistas.

PERT Y SNYDER (94) han propuesto una teoría basada en la unión de los antagonistas de los opiáceos y los agonistas a receptores de un homogenado de cerebro. La unión de los antagonistas es favorecida por el Na^+ mientras que la de los agonistas es inhibida. Los parciales agonistas como la nalorfina tienen un comportamiento intermedio. Esto hace suponer que el receptor tiene dos conformaciones,

a una de las cuales se unen los agonistas y a la otra los antagonistas.

2.1.3.2.- NALOXONA

Pequeñas dosis i.m. ó i.v., en el hombre previenen los efectos de los opiáceos.

Se ha visto que posee potentes acciones antagonistas de los narcóticos y de los agonistas parciales (9) y no posee actividad analgésica (10).

Como se ha indicado anteriormente, se unen a los receptores opiáceos, siendo esta unión favorecida por el Na^+ (94).

2.2. VALORACION DE ANALGESICOS

El fundamento de los métodos empleados para valorar sustancias analgésicas consiste en provocar a los animales un estímulo doloroso que sea cuantificable y comprobar la capacidad de los analgésicos en disminuir la percepción de este dolor. Estos métodos se denominan tests antinociceptivos.

Para utilizar de forma adecuada estas técnicas se ha de establecer primero un criterio a seguir para provocar y medir las reacciones dolorosas de los animales y atendiendo a este criterio se procederá a la evaluación

de los resultados obtenidos, para ello:

1. Se ha de establecer como factor limitante que el aspecto medible esté relacionado con la sensación dolorosa.

2. El estímulo ha de producir una respuesta que pueda ser medida con relativa constancia.

3. El estímulo ha de causar el mínimo daño a los tejidos.

4. Debe ser aplicable facilmente y poder ser controlado en seguida (63).

Los tests antinociceptivos estan diseñados como modelos del tratamiento patológico en el hombre, pero difieren en que la droga es administrada antes de producir el estímulo nocivo (72).

La elección del test más adecuado en cada caso se realiza atendiendo al tipo de substancia a valorar. Si se desconoce el tipo de droga se ensayan varios tests en que el estímulo utilizado sea distinto.

Un test adecuado para un tipo de drogas ha de proporcionar curvas dosis-efecto con una pendiente adecuada para determinar la potencia de los compuestos y poder expresar ésta como dosis eficaz.

Muchos tests presentan inconvenientes como son los falsos positivos y falsos negativos. Se entiende por falsos positivos cuando dan como analgésicos sustancias que se sabe no lo son en humanos. Cuando no se puede valorar la acción analgésica de ciertas sustancias que en realidad poseen dicha propiedad, se producen falsos negativos.

Los distintos métodos de valoración pueden ser clasificados atendiendo al tipo de sustancia que es valorada con ellos, así tenemos métodos para la valoración de no narcóticos y métodos para narcóticos (108). Pero teniendo en cuenta que a veces un mismo método es válido para ambos tipos de analgésicos es preferible clasificarlos atendiendo al estímulo doloroso aplicado.

Así KEITH (63) los divide en:

- métodos electricos
- métodos mecánicos
- métodos térmicos
- métodos químicos

2.2.1.- METODOS ELECTRICOS

Desde que HELMOTZ en 1851 describió como método para

producir un estímulo nocivo la aplicación de corrientes eléctricas se han desarrollado muchos métodos basándose en este principio.

Todos los métodos consisten en aplicar una corriente eléctrica de determinada intensidad y medir el tiempo que tarda el animal en gritar o en huir.

Se considera la protección producida por el analgésico la prolongación del tiempo de respuesta del animal frente al estímulo doloroso.

El punto de aplicación de este estímulo eléctrico varía de unos a otros métodos. Unos lo aplican en el escroto de la rata macho adulta (81), en la cola del ratón (16,54,88), en la pulpa dentaria (39,50,118).

En otras técnicas se coloca al animal en una jaula de fondo metálico y es en éste donde se produce la descarga eléctrica (24).

2.2.2.- METODOS MECANICOS

Consisten en producir presión sobre la cola del animal.

BIANCHI Y FRANCESCHINI (4) usaron ratones a los que colocaron una pinza en la cola y observaron si intentaban deshacerse de ella o no.

En las ratas se puede aplicar presión en la cola mediante un tubo conectado a un manómetro (6,27,48).

2.2.3.- METODOS TERMICOS

Se produce dolor por aplicación de calor. El método más sencillo es el de la placa caliente, en que se coloca un ratón sobre una placa calentada por debajo con una lámpara o con una mezcla de formiato de etilo y acetona a $55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (34,57). El primer signo de dolor consiste en lamerse las patas delanteras o en saltar. Se mide el tiempo que tarda en responder.

También puede aplicarse el calor sobre la cola del animal (26,28) o sobre el lomo (37).

BEN-BASSAT y col (2) provocaron dolor por inmersión de la cola de la rata en un baño con agua a 58°C y midieron el tiempo que tardaba el animal en retirar la cola del baño.

2.2.4.- METODOS QUIMICOS

Mediante el empleo de un producto químico irritante se produce dolor a los animales.

El método más sencillo consiste en la inmersión de la pata de la rana en una solución ácida. La respuesta frente a esta substancia es la retirada de la pata en un

período de cinco segundos. La droga a valorar se administra y en caso de ser analgésica se prolonga el tiempo de inmersión.

Una sustancia muy irritante es el aceite de croton cuando es aplicada sobre la piel. La administración s.c. de una pequeña cantidad provoca que el animal intente morder.

TEIGER (106) propuso un test específico para analgésicos narcóticos y antagonistas de los narcóticos, basado en el uso de EDTA como agente nociceptivo inyectado i.d. en el cobayo (0.05 ml de una solución de 25 mg/ml de EDTA en suero salino). Provoca una respuesta con una latencia de uno a cuatro segundos y con una duración de treinta a cincuenta segundos. Se producen diferentes tipos de respuesta: vocalización, correr, saltar, intentar subirse al borde de la jaula, sacudida de "perro mojado", alzarse sobre las patas traseras. Todas las respuestas se dan por separado, excepto la vocalización, y con una separación de dos a tres segundos. Se cuentan el número total de episodios independiente del tipo de respuesta. Los animales se administran s.c. con distintas dosis de las sustancias o con suero (animales controles). Transcurridos treinta minutos reciben EDTA, observándose menor número de respuestas en los animales tratados.

Se ha utilizado esta sustancia pues es sabido que

produce dolor en el hombre (62,73). Se cree que su mecanismo de acción resulta del efecto quelante de EDTA.

Por otro lado se ha observado que ciertas sustancias al ser inyectadas i.p. en la rata y el ratón provocan una respuesta típica de contorsión del abdomen y tronco y estiramiento de las patas traseras.

Esta respuesta ha sido llamada a menudo con terminos anglosajones como "writhing" (109), "stretching" (66), "cramping" (86) y también como respuesta de contracciones abdominales (26).

La fenilquinona constituye una de las sustancias inductora de contracciones. SIEGMUND, CADMUS Y LU (99) fueron los primeros en describir el método. Se prepara una solución al 0.02% de fenilquinona en una solución acuosa de etanol al 5%. La inyección i.p. de 0.25 ml provoca las respuestas antes descritas. Esta respuesta se produce varias veces en los diez minutos posteriores a la administración, siendo posible cuantificarlas. Si el animal no responde en este período se desecha.

Para cada sustancia se administran dosis distintas y se determina la DE_{50} según el número de animales que no presentan respuesta.

Se ha podido demostrar actividad analgésica tanto para narcóticos como para no narcóticos.

Variante del método es el de HENDERSHOT Y FORSAITH (55). Usaron ratones de un peso aproximado de 20 g. a los que inyectaron 0.2 ml de una solución al 0.02% de fenilquinona y observaron las contracciones por espacio de veinte minutos. Los animales se agruparon en lotes de 6 ratones. Aquellos que no se contraen no son utilizados. Los que presentan respuesta son guardados para el día siguiente.

Las sustancias a valorar se disuelven en agua o en propilenglicol y veinte minutos después de la inyección de 0.1 ml de la sustancia se inyecta la fenilquinona.

Para los cálculos de la potencia analgésica se considera el % de protección inducido por la dosis de la sustancia.

$$\% \text{ protección} = 100 - \frac{\text{experiencia}}{\text{control}} \times 100$$

El cálculo de la DE_{50} se realiza según LITCHFIELD Y WILCOXON (76).

Dado el inconveniente de tener que solubilizar la fenilquinona en etanol OKUN y col (90) usaron otra quinona para producir las contracciones. Inyectaron ratones machos (16-24 g) con p-benzoquinona, que resulta tan efectiva como la fenilquinona i.p. y presenta la

ventaja de ser soluble en agua (0.2 mg/ml). Es estable dos o más semanas en una botella topacia.

Las contracciones no se producen si se administra s.c. ó i.v. El volumen a administrar es de 0.25 ml. Las sustancias en estudio son inyectadas s.c. y al cabo de treinta minutos se dan 0.25 ml de p-benzoquinona, observándose las contracciones producidas en una hora. Cualquier contracción se considera positiva.

Para cada dosis emplean 10 ratones. La DE_{50} es la dosis que previene en un 50% las contracciones.

Una modificación del método de SIEGMUND se ha usado para el estudio de agentes timolépticos por sus propiedades analgésicas (35). Se inyectan a cada animal i.p. 0.25 ml de una solución alcohólica al 0.02% de fenilquinona. El criterio de analgesia es el % de ratones que no se contraen tras la fenilquinona.

En otra variación del test se ha utilizado ácido acético como estímulo químico (66,117). Con este test se obtienen DE_{50} inferiores a las obtenidas con el método de la placa caliente o con el de la pinza en la cola.

JAQUES (58) demostró que las contracciones debidas al ácido araquidónico en el ileon aislado de cobayo

eran inhibidas por los analgésicos y constituían un método "in vitro" para su valoración. En ésto se basó HELFER (51) cuando utilizó esta misma sustancia inyectada i.p. en el ratón y observando que producía la respuesta característica de contracciones, las cuales podrían ser inhibidas por los analgésicos.

El experimento se realizó con ratones machos de 20 g a los que se retiró la comida doce horas antes de la experiencia. Se efectuó la experiencia con lotes de 5 animales. Se inyectó una solución al 0.03% de ácido araquidónico. Se contaron el número de contracciones durante un período de diez minutos tras la administración del agente álgico. Las sustancias en estudio se administraron, una hora antes, en un volumen no superior a 0.1 ml/10 g mediante sonda gástrica. Las sustancias poco solubles se suspendieron en goma de tragacanto.

En contraste con la mayoría de los métodos, en éste se producen las contracciones sin período de latencia, inmediatamente tras la administración, alcanzando su máxima frecuencia a los diez minutos.

Sirve para valorar analgésicos no narcóticos, narcóticos y antagonistas de los narcóticos con propiedades analgésicas. Los analgésicos narcóticos son activos por vía oral y presentan actividad a dosis inferiores que

en otros métodos. La mayor sensibilidad de este método se ve en que los antagonistas de los narcóticos, que son agonistas parciales, muestran una DE_{50} p.o. del mismo orden de magnitud o a veces inferior a la obtenida por otros autores con la administración s.c. de las mismas sustancias (9,25,105). Fenilbutazona es más activa en el test del ácido acético que en el del araquidónico, mientras que los salicilatos son casi iguales.

Estas diferencias pueden ser debidas al uso de distintos ratones o al ayuno (15,91).

Otras muchas sustancias se han empleado en la producción de contracciones. Bradiquinina es una de ellas, apareciendo las contracciones tras un período de latencia de diez minutos. Dosis de 21 mg/Kg de aspirina bloquean la respuesta dolorosa (36).

Se han producido contracciones en rata, ratón, conejo de indias y gato usando una solución de aloxan en agua a la dosis de 35 mg/Kg (18).

Mediante el empleo de iodoacetato sódico i.p. en ratas, VAN DER WENDE (109) provocó contracciones aplicables a la valoración de opiáceos y antipiréticos.

El último método descrito corresponde al empleo de ácido etacrínico (59) como productor de contracciones en

la rata, observándose el número de éstas producidas en un período de treinta minutos. Se pueden valorar drogas analgésicas narcóticas y no narcóticas.

2.2.4.1.- ETIOLOGIA DE LAS CONTRACCIONES

Como hemos visto existe una gran variedad de sustancias que inyectadas i.p. en ratas o ratones provocan contracciones abdominales. Dichas sustancias no poseen propiedades físicas o químicas comunes que permitan explicar su similar modo de acción.

ECKHARDT (33) intentó explicar el mecanismo de distintas sustancias como fenilquinona, 5-hidroxitriptamina y ácido clorhídrico diluido. Todas ellas difieren en la duración del efecto. Supuso la existencia de distintas causas:

1. Irritación directa.

2. Producción de serotonina que se supone relacionada con el dolor.

El pH de las soluciones utilizadas estaba comprendido entre 4 y 5. Si la causa de las contracciones fuera una irritación por la acidez, las sustancias no ácidas deberían ser inactivas. Se observó que la serotonina en el ratón provocaba la misma respuesta a pH 4.7 y

a pH 7 y administrando hidróxido sódico no se produjeron contracciones en ninguna especie estudiada, por tanto la variación en el pH no está relacionado con el fenómeno. Por otro lado la producción de serotonina no es una causa de las contracciones pues sólo es efectiva en el ratón y no en la rata.

Observando una relación entre la capacidad anti-5 hidroxitriptamina "in vitro" y la de antagonizar las contracciones por la fenilquinona se postuló que la causa podría ser la producción de 5-hidroxitriptamina (33). Atendiendo a esto la inyección repetida de fenilquinona disminuiría el contenido de 5-hidroxitriptamina de los tejidos y con ello el número de contracciones (13). Efectivamente se ha observado un descenso en las contracciones por la administración continuada de fenilquinona y un descenso en el contenido de 5-hidroxitriptamina en los tejidos intestinales.

Apoya la hipótesis el que los inhibidores de la MAO (enzima que metaboliza a la 5-hidroxitriptamina) además de elevar el contenido de 5-hidroxitriptamina tisular, inhiben las contracciones.

El período de latencia observado antes de iniciarse las contracciones por la fenilquinona se cree debido a la liberación de 5-hidroxitriptamina.

MACARAEG (80) observó una rápida tolerancia a las contracciones provocadas por la fenilquinona y ácido acético y postuló que cualquier sustancia responsable de las contracciones puede consumirse por la administración repetida del agente álgico provocando la disminución de la respuesta.

Se ha comprobado que las contracciones inducidas por el araquidónico se inician en seguida tras la administración, lo que hace suponer que éste actúa directamente por irritación de las terminaciones del dolor (53).

La administración repetida de araquidónico no produce, por el contrario, tolerancia y los animales tolerantes a la fenilquinona muestran aún contracciones con araquidónico, es decir no existe tolerancia cruzada como sucede en el caso del ácido acético y la fenilquinona (80).

La diferente actuación del araquidónico respecto a otras sustancias puede explicarse de distintas maneras:

- Araquidónico actúa directamente en los receptores del dolor sin producir un daño irreversible.
- Produce la liberación de un mediador químico en

una cantidad tal que su resíntesis puede tener lugar antes de la próxima administración.

- Produce una sustancia nociceptiva endógena en pequeña cantidad pero capaz de estimular los receptores dolorosos presentes en la cavidad abdominal.

En los método "in vitro" en que se utiliza araquidónico parece que actúa indirectamente produciendo acetilcolina en los nervios o en sus terminaciones (58).

WHITTLE (114) supone que la causa del dolor provocado por diversas sustancias administradas i.p. es la producción de una cinina.

Las cininas poseen la propiedad de:

- aumentar la permeabilidad capilar
- estimular las terminaciones nerviosas de las fibras del dolor.

Los sucesos que siguen a la administración i.p. de acético y otros agentes álgicos puede explicarse por la formación de un mediador bioquímico con estas propiedades. Se ha encontrado un polipéptido con propiedades de cinina en el exudado peritoneal durante las contracciones.

Muchos de los productores de contracciones son conocidos como activadores del sistema de cininas y esto es lo común entre distintas, aunque no todas, las sustancias nociceptivas.

Se había observado que las prostaglandinas presentaban un efecto hiperalgésico en la pata de la rata (68, 115). Para intentar explicar el efecto álgico del ácido acético se ha determinado el contenido de prostaglandinas en el peritonéo de la rata (30), observándose un gran aumento (desde 20 a 620 ng) tras la administración i.p. del agente. Dicho aumento es inhibido si anteriormente se administran sustancias analgésicas.

Como puede deducirse de lo expuesto existe una gran discrepancia en cuanto a que sustancias son las mediadoras en la producción del dolor por estimulación peritoneal.

Se supone que los receptores para las contracciones están localizados en el tracto gastrointestinal y mediante vías aferentes conectan con el lóbulo posterior del cerebelo (74). Este fenómeno equivaldría al reflejo del vómito en los roedores, por carecer de centro para el mismo, y sería común con todas las sustancias álgicas.

2.2.4.2.- CONDICIONES QUE INFLUYEN EN LA INHIBICION DE LAS CONTRACCIONES.

- Variaciones en la cepa. Uno de los principales problemas en los ensayos farmacológicos está en el control de la variación en los animales experimentales.

Para el ensayo de una sustancia la elección de los animales no puede ser realizada con anticipación (23) y hay que basarse en los datos existentes o determinarse experimentalmente (14).

Varios autores (5.15,83) han observado variaciones en las respuestas fisiológicas según la cepa de ratones empleada en la experiencia. Se requieren unos animales robustos y sanos para poder aceptar los valores experimentales obtenidos.

Concretando en el test de la fenilbenzoquinona se encontraron diferencias de comportamiento según la cepa de ratones utilizada y se obtuvieron diferentes valores de DE_{50} para la morfina (107).

Debido a la dificultad encontrada con el test de la fenilquinona se realizó una experiencia para comprobar las diferentes respuestas obtenidas con distintas cepas de ratones. Se estudiaron once cepas que se dividieron en tres grupos atendiendo a la respuesta observada. Uros

mostraban un gran número de contracciones, otros daban una respuesta intermedia y otros a penas se contraían. Además se diferenciarse en el número también lo hacían en los caracteres de la contracción y así los que presentaban un mayor número se observaban más fácilmente y por el contrario eran menos claras las contracciones de los que a penas respondían.

- Condiciones ambientales. En todo ensayo biológico juega un papel importante el ambiente que rodea (98).

Se ha observado que la inyección p-benzoquinona i.p. en el ratón reduce la temperatura corporal. Colocando a los animales a una temperatura ambiente de 34°C no desciende su temperatura tras la inyección y aumenta el número de contracciones y la proporción de ratones que responden.

Al aumentar el número de ratones sensibles a la acción de PBQ es posible reducir el número de animales necesarios.

Ahora bien al realizar la experiencia tanto a 21°C como a 34°C se obtienen similares relaciones dosis-efecto con los analgésicos narcóticos (91).

El colocar a los animales en jaulas individuales o todos en la misma no afecta a la respuesta pero si aumen-

ta la inhibición de las contracciones cuando se les administra drogas analgésicas o no (90).

- Dieta. Dejando a los animales en ayunas durante la noche se observa la misma sensibilidad a la PBQ que en los animales alimentados pero la contracción se produce más rápidamente alcanzando el máximo de cinco a diez minutos.

Se logra obtener una relación dosis-efecto para los analgésicos no narcóticos mucho más efectiva. En cambio la relación dosis-efecto para analgésicos narcóticos no se ve afectada por este hecho (91).

3.- MATERIAL Y METODOS

La eritromicina es un antibiótico del tipo de los macrólidos (29), que puede ser usado en forma de lactobionato, sal soluble que permite su administración en solución acuosa. Al ser administrado intraperitonealmente en el ratón le provoca unas contracciones similares a las obtenidas con otras sustancias (55,66,80) y que permite utilizarlo como método de valoración de analgésicos.

Este producto no actúa sobre la fibra nerviosa lesionándola, sino que provoca un dolor agudo, transitorio y de fuerte componente psíquico (43).

Se han utilizado ratones albinos FFB:CD-1, con pesos comprendidos entre 17 y 24 g, alimentados con una dieta estándar y mantenidos en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Antes de la experiencia, se ha dejado a los animales en ayunas durante un espacio de diez horas, con agua "ad libitum".

Se ha comprobado el perfecto estado físico de los ratones, observando si poseían reflejo de agarre al suspenderlos de un alambre.

En una primera parte del trabajo se ha procedido al estudio del método. Para ello se han hecho lotes de 5

ratones a los que se ha administrado p.o. 10 ml/Kg de metilcelulosa al 1%, una hora antes del agente nociceptivo, con el fin de establecer las mismas condiciones experimentales que se establecen posteriormente al estudiar los analgésicos.

Transcurrida esta hora, se ha administrado a cada ratón por vía intraperitoneal 10 ml/Kg de una solución de lactobionato de eritromicina en agua destilada (16 mg/ml) de manera que cada uno recibe una dosis de 160 mg/Kg, dosis que se ha visto resulta eficaz (96).

Los ratones se han colocado individualmente en recipientes de plástico transparente con el fin de poder observarlos perfectamente.

Tras la administración y sin existir un período de latencia, los ratones inician las contracciones abdominales, que duran diez minutos.

Se procede al conteo de las contracciones provocadas en este espacio de tiempo, calculándose la media.

Los animales se mantienen en las condiciones iniciales durante una semana. Al octavo día se procede a la repetición de la prueba para comprobar si se mantiene constante la respuesta de los ratones.

Por otro lado se ha estudiado la duración de la respuesta, observando a los animales por un espacio de treinta minutos posterior a la administración del agente álgico.

También se ha estudiado si había diferencia de comportamiento a lo largo del día. Para ello se ha hecho una administración de lactobionato de eritromicina en cuatro horas distintas: 08-09 h, 12-13 h, 16-17 h y 19,20 h y al día siguiente se ha repetido el intervalo 08-09 h.

Tras el estudio de las condiciones del método se ha procedido a la valoración de los analgésicos.

Administrados los animales en una primera administración con metilcelulosa al 1% y posterior inyección de lactobionato de eritromicina, se cuentan las contracciones. La media nos sirve como control de la respuesta de los ratones frente a la acción álgica del lactobionato de eritromicina.

Los animales se guardan una semana, transcurrida la cual se tratan con sustancias analgésicas. Se han estudiado tres grupos de sustancias. Un primer grupo lo constituyen analgésicos no narcóticos tales como : aspirina, fenilbutazona e indometacina. Un segundo grupo lo

forman analgésicos narcóticos: morfina, codeína, d-propoxifeno. El último grupo está formado por antagonistas de los narcóticos: malorfina y naloxona.

Las drogas se han suspendido en metilcelulosa al 1%, ensayándose distintas dosis para cada una de ellas. Se han elegido las dosis siguiendo una progresión geométrica. Las suspensiones se han preparado de acuerdo con las dosis, de manera que los animales recibieran un volumen constante de 10 ml/Kg. Para la administración oral se ha empleado una sonda gástrica.

Un grupo de animales ha recibido únicamente metilcelulosa al 1%, constituyendo los controles que nos han permitido comprobar que se repetían los resultados obtenidos la semana anterior.

Para cada una de las dosis se han anotado las contracciones provocadas al administrar lactobionato de eritromicina i.p., comprobándose un descenso en el número de las mismas conforme aumenta la dosis del analgésico.

Se ha trabajado empleando el método del doble ciego, de manera que era desconocida la dosis y el producto administrado, en el momento de realizar la prueba.

En el estudio estadístico las diferencias entre las medias de los distintos grupos se han realizado y evaluado mediante el test "t" de Student. En todos los casos se aceptó como significativo un nivel de probabilidad igual o inferior a 0.05.

Las curvas dosis-efecto de cada uno de los analgésicos se han linearizado empleando papel semilogarítmico. Se ha representado frente a las dosis el número de contracciones a la vez que el porcentaje de inhibición de la respuesta. Como 0% de inhibición se ha considerado la media del número de contracciones de la totalidad, y como zona no significativa este valor medio $\pm$ los límites fiduciales para $p = 0.05$, es decir 25.55 ± 1.0031 .

Las rectas de regresión se han calculado mediante el método de los mínimos cuadrados, utilizando los resultados de cada animal.

La determinación de la DE_{50} de cada uno de los analgésicos se ha hecho graficamente relacionandola con las contracciones obtenidas en los animales controles. Se considera como DE_{50} aquella dosis que ha reducido el número de contracciones a la mitad.

La significación estadística de la diferencia entre dos pendientes de regresión (m_1 y m_2) se ha calculado

a partir de:

$$t (m_1 / m_2) = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{v_{m_1} + v_{m_2}}}$$

Conocido el valor t y el grado de libertad ($N = n_1 + n_2 - 4$) se halla en la tabla de distribución el nivel de probabilidad (31,69).

Todos los cálculos se han realizado con la ayuda de un programador AT&TIO COMPUCORP 327 Scientist.

4.- RESULTADOS

4.1.- ESTUDIO DEL METODO.

Como es sabido muchas determinaciones farmacológicas difieren en el comportamiento de los animales empleados (5,15,83). Este fenómeno se da en la prueba de las contracciones abdominales inducidas por la fenilquinona, presentando diferencias según la cepa de ratones utilizada (107).

Basándonos en este hecho, la primera parte del trabajo ha consistido en ver si existía una diferencia en la sintomatología de la respuesta frente al lactobionato de eritromicina al variar la cepa.

En un trabajo anterior (96) utilizando ratón albino Swiss, se observó que no existía diferencia significativa en el número de contracciones inducidas por el lactobionato de eritromicina al variar el peso y sexo de los animales, así como tras la administración repetida.

Hemos utilizado ratón FFB:CD-1 de diferentes pesos. Agrupados los animales atendiendo al peso se han calculado las medias del número de contracciones para cada uno de estos grupos, no observándose diferencia significativa en ninguno de los casos (TABLA I).

También se ha comprobado la no existencia de di-

Peso (g)	1 Admón.			2 Admón.			t	p >
	M	s	n	M	s	n		
17-19	25.00	3.81	5	24.80	0.84	5	0.1025	0.05
19-24	26.24	9.77	49	23.78	7.18	49	1.4056	0.05
25-29	29.50	10.68	11	24.79	6.48	11	1.1922	0.05
17-29	26.85	9.66	65	24.05	6.71	65	1.9044	0.05

TABLA I : Significación de la administración repetida a diferentes pesos en ratón macho.

ferencia significativa entre los valores hallados en determinaciones realizadas en los mismos ratones y separadas una semana. Se han agrupado los animales según el peso y también se ha considerado la totalidad de los mismos. Así los valores obtenidos en una primera administración no difieren de los obtenidos en una segunda administración (TABLA II).

Al no haber diferencia significativa variando el peso del ratón hemos podido utilizar animales de cualquier edad.

Se han podido utilizar los ratones como sus propios controles por no variar la respuesta en dos administraciones separadas una semana. A pesar de que los ratones presentan la misma respuesta en intervalos menores de tiempo (96), hemos preferido hacer los ensayos dejando transcurrir una semana, con el fin de asegurar la perfecta recuperación de los animales.

Se ha estudiado el tiempo que duran las contracciones, para lo que se ha anotado el número observado en los diez primeros minutos y se ha continuado la observación hasta treinta minutos después de la administración de lactobionato de eritromicina. El resultado obtenido con los ratones observados, es que sólo dos han presentado una contracción transcurridos los diez primeros minutos. Se puede con ello decir que las con-

PESO (g)	M	s	n	t	p >
19	25.00	3.81	5		
19-24	26.24	9.77	49	0.2763	0.05
19	25.00	3.81	5		
25-29	29.50	10.68	11	0.8568	0.05
19-24	26.24	9.77	49		
25-29	29.50	10.68	11	0.9661	0.05

TABLA II: Comparación de la primera administración en función del peso en ratón macho.

tracciones cesan después de diez minutos y por ello sólo es necesario este período de tiempo para realizar el conteo.

4.2.- RITMO CIRCADIANO

Teniendo en cuenta la existencia de ritmo circadiano en la percepción del dolor (104), hemos procedido al estudio de la respuesta frente al lactobionato de eritromicina en distintos intervalos del día.

Se ha dividido el día en cuatro períodos y se ha repetido a las 24 horas el primer período para comprobar si se mantienen constantes los valores obtenidos. Los intervalos observados han sido: 08-09 h, 12-13h, 16-17 h, 19-20 h, y al día siguiente se ha repetido el intervalo 08-09 h.

La experiencia ha sido realizada en machos y en hembras para observar si se presentaban diferencias entre los dos sexos.

El momento de máxima percepción del dolor, observado por un mayor número de contracciones en el ratón, ha sido durante el intervalo 19-20 h, en los dos sexos. (Fig 1). Por la mañana se observa una menor sensación dolorosa. Parece que desciende algo en el intervalo de 12-13 h, aunque no resulta significativo, para ir aumen-

INTERVALO HORAS	M	S	n	ϵ
08-09	17.10	2.51	10	0.79
12-13	15.50	7.09	14	1.89
16-17	16.00	7.73	14	2.06
19-20	23.92	7.00	12	2.02
08-09	16.69	3.17	13	0.88

TABLA III: Estudio de la variación en el n° de contracciones a lo largo del día en ratón macho (20-25 g).

INTERVALO HORAS	M	s	n	ε
08-09	15.43	4.73	14	1.27
12-13	12.43	9.13	14	2.44
16-17	17.38	9.11	13	2.53
19-20	24.07	8.54	14	2.28
08-09	14.79	8.56	14	2.29

TABLA IV : Estudio de la variación en el n°de contracciones a lo largo del día en ratón hembra (18-20 g).

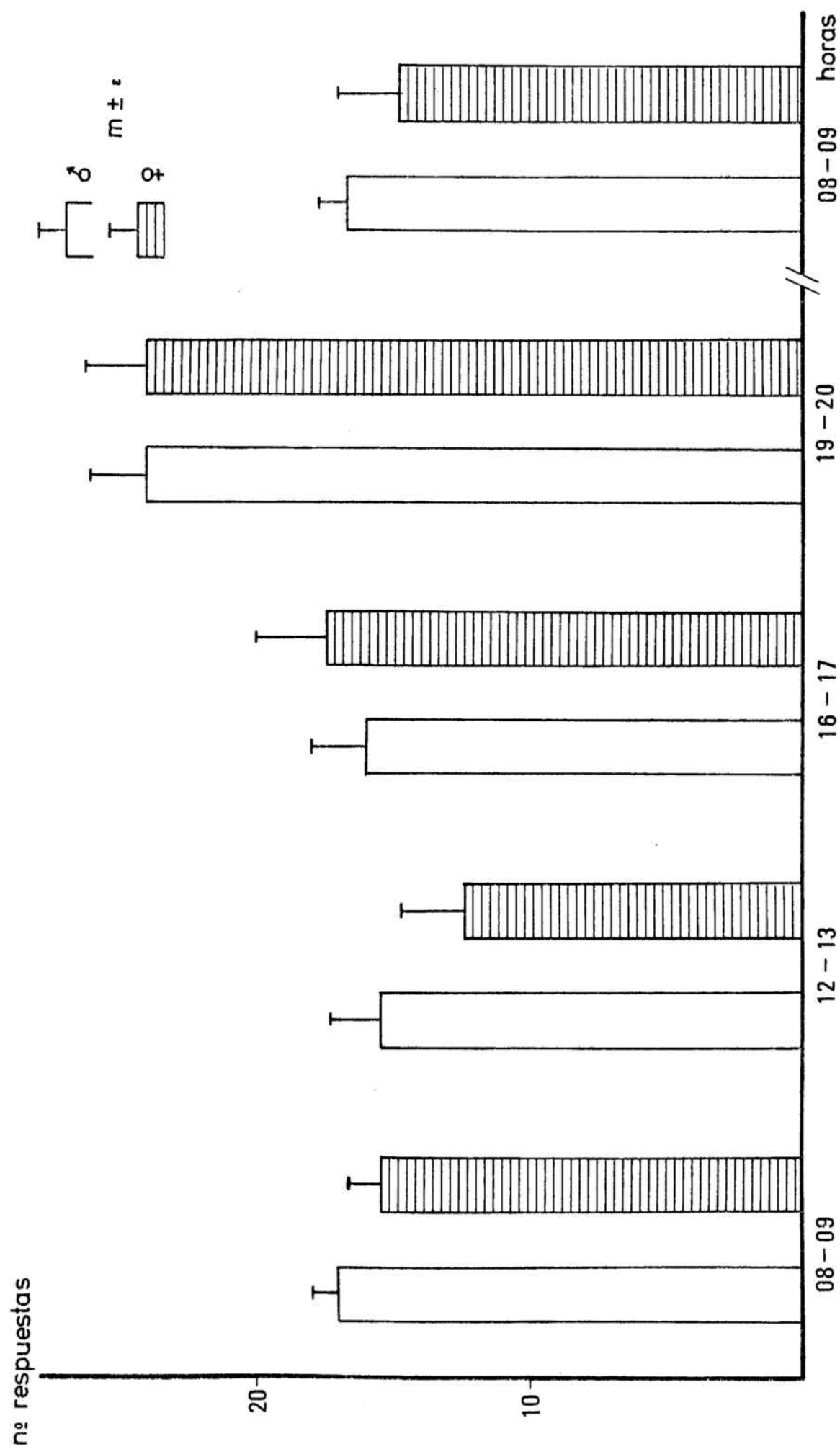


Figura 1: Representación de la variación en el n° de contracciones a lo largo del día en ratón macho y hembra.

tando al llegar la tarde.

Comparando las medias entre los distintos intervalos no se observa diferencia significativa por la mañana, tanto en machos como en hembras. En los dos sexos se observa una diferencia significativa entre los valores obtenidos a 19-20 h y los observados por la mañana. En los machos existe diferencia entre el primer intervalo de la tarde (16-17 h) y el segundo (19-20 h), fenómeno que no se observa en las hembras.

En los dos sexos se ve la repetición de los resultados obtenidos por la mañana 08-09 h al efectuar el ensayo al día siguiente en otros animales.

Comparando los valores observados en cada uno de los intervalos no existe una diferencia significativa cuando la experiencia se realiza en machos o en hembras.

Dado que el número de contracciones obtenidas de 19-20 h es el mayor, se han realizado todas las determinaciones por la tarde, con el fin de poder observar más claramente diferencias.

4.3.- VALORACION DE ANALGESICOS.

Como se ha indicado anteriormente los analgésicos se han dividido en tres grupos distintos según su meca-

nismo de acción, a saber: no narcóticos, narcóticos y antagonistas de los narcóticos.

Se han elegido representantes de cada uno de los grupos, de los cuales se conocen claramente su actividad y sus potencias relativas como analgésicos. Con ello se ha pretendido comprobar la validez del método al no dar falsos negativos.

4.3.1.- ANALGESICOS NO NARCOTICOS.

Dentro de este grupo se ha seleccionado un analgésico de cada tipo como representante típico del grupo. Estos han sido: Aspirina, Fenilbutazona e Indometacina.

4.3.1.1.- ASPIRINA.

Las dosis ensayadas han sido: 50, 100, 200 y 400 mg/Kg, administrados p.o., una hora antes del estímulo doloroso.

Se han calculado las medias aritméticas del número de contracciones para cada una de las dosis. Comparadas estas medias con la correspondiente a los mismos animales en una primera administración (animales controles), se ve un descenso a medida que aumenta la dosis (TABLA V).

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	ϵ	% INHIBICION
control	24.44	9.07	72	1.07	0
50	21.33	10.57	9	3.52	13
100	19.33	7.58	15	1.96	21
200	15.14	8.72	14	2.33	38
400	9.90	6.97	10	2.20	59

TABLA V: ASPIRINA. Valores de las contracciones.

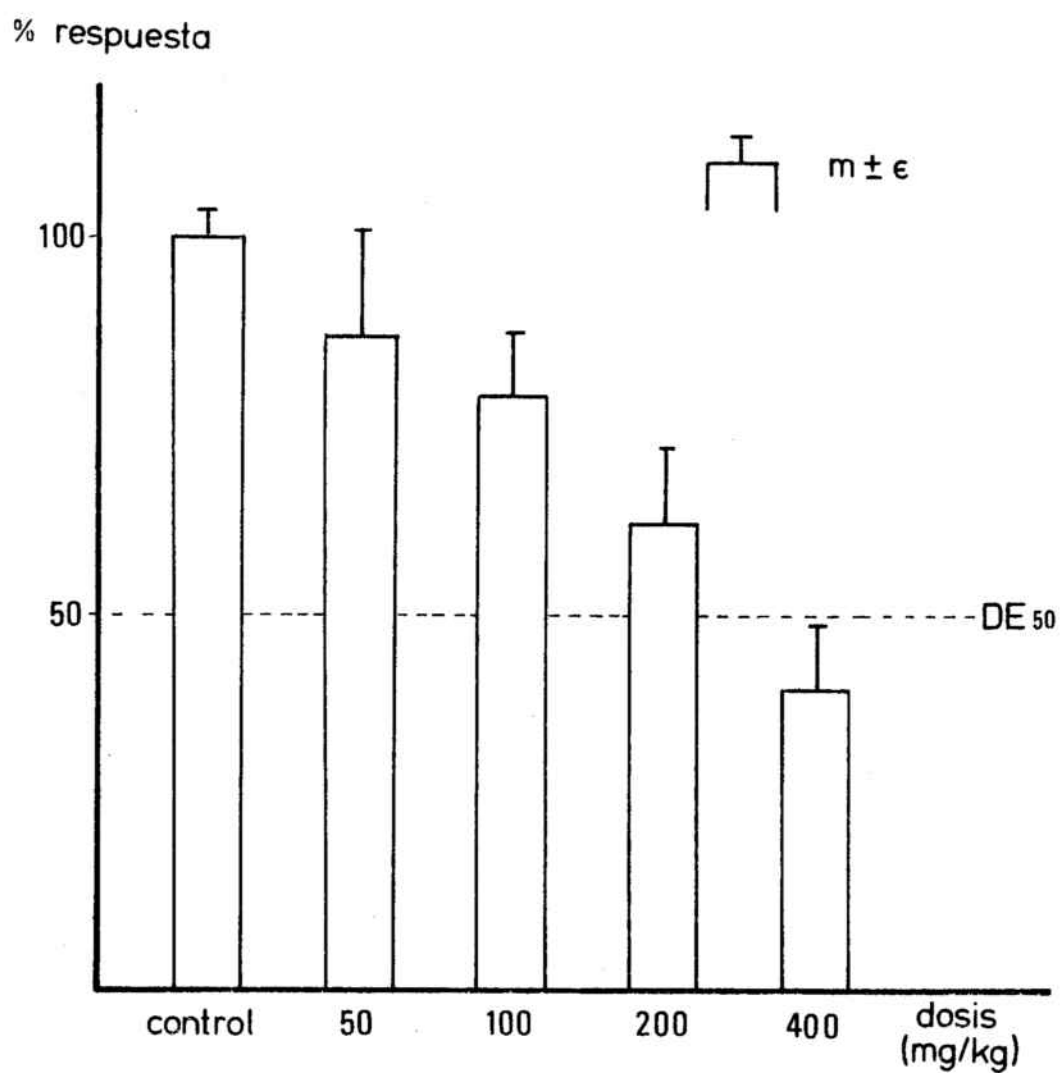


Figura 2: ASPIRINA. % de respuesta frente a sus propios controles.

Se ha calculado el % de respuesta para cada dosis referidas a los controles y también el % de inhibición de dicha respuesta. Se considera como % de inhibición de la respuesta la diferencia entre 100 y el % de respuesta. Los datos obtenidos para cada dosis aparecen representados en forma de histogramas (Fig.2). La barra representativa de los controles se expresa como 100% de respuesta y corresponde a los mismos animales que en un ensayo posterior son administrados con aspirina.

Se ha calculado la recta de regresión utilizando medias ponderadas. Teniendo en cuenta, que no existe diferencia entre los distintos controles, se ha agrupado a todos, dando un valor medio $\pm$ los límites fiduciales de las contracciones inducidas en el ratón por el lactobionato de eritromicina i.p. (para $p = 0.05$).

La ecuación de la recta aparece en la TABLA VIII junto con el valor del coeficiente de correlación, que ha resultado con una significación de $p < 0.001$.

La DE_{50} ha sido calculada graficamente, siendo el valor obtenido 280 mg/Kg.

4.3.1.2.- FENILBUTAZONA.

Se han ensayado las dosis de 20, 40, 80 y 160 mg/Kg. Los histogramas correspondientes al % de respuesta apa-

DOSIS (mg/Kg)	M	s	n	ε	% INHIBICION
control	26.09	7.94	22	1.69	0
20	20.00	2.91	5	1.30	23
40	28.80	6.38	5	2.85	28
80	15.40	3.58	5	1.60	41
160	12.40	7.50	5	3.35	52

TABLA VI: FENILBUTAZONA. Valores de las contracciones.

% respuesta

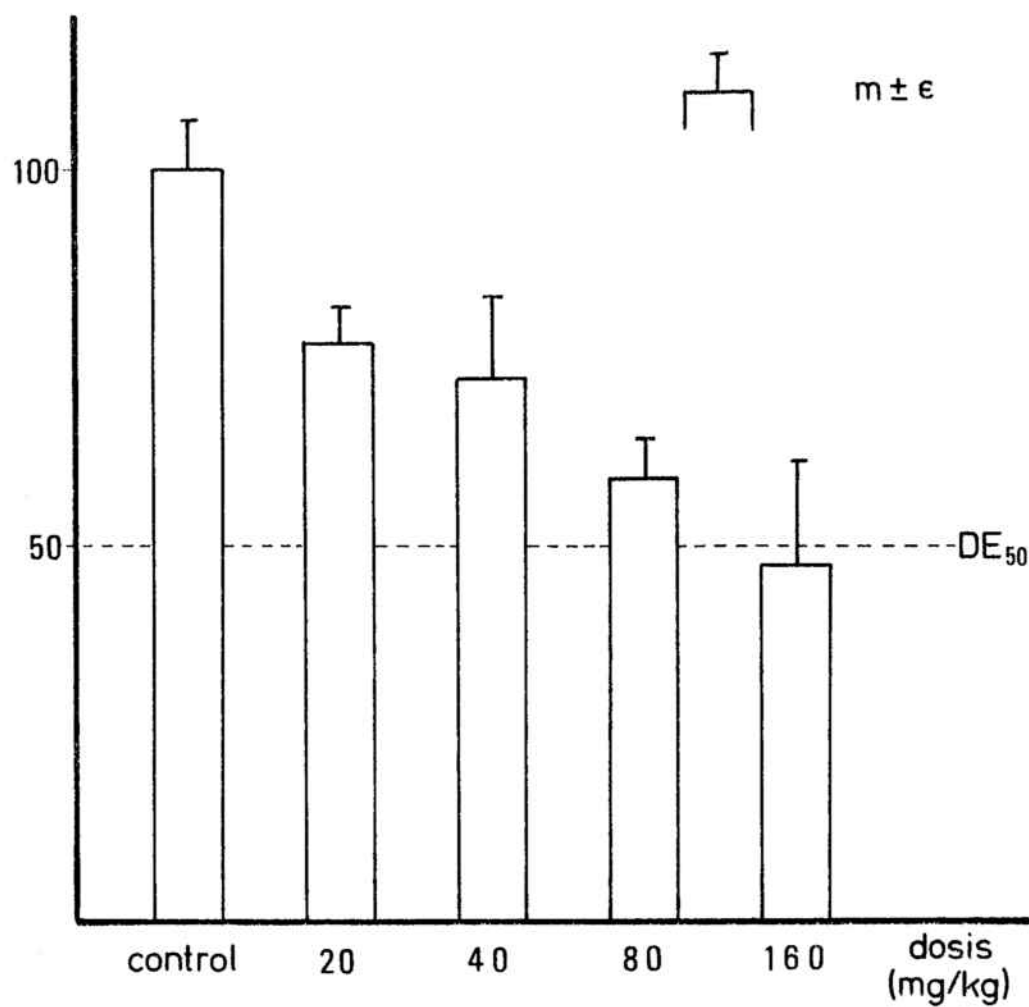


Figura 3: FENILBUTAZONA. % de respuesta frente a sus propios controles.

recen en la Fig 3.

En la TABLA VIII se representa la ecuación de la recta de regresión para esta substancia, que se encuentra en la Fig. 5 . El coeficiente de correlación de dicha recta ha presentado una significación de $p < 0.001$. La TABLA VI nos da el valor de las medias a cada una de las dosis.

El valor de la DE_{50} ha resultado 150 mg/Kg, siendo 1.86 veces más activa que la aspirina.

4.3.1.3.- INDOMETACINA.

Las dosis de 4, 8, 16, 32 y 64 mg/Kg son las que se han utilizado en su valoración.

En la TABLA VII aparecen las medias de las contracciones para cada una de las dosis ensayadas. La recta de regresión ha dado un coeficiente de correlación con una significación de $p < 0.001$ (TABLA VIII).

Como en los casos anteriores se han representado los % de respuesta frente a sus propios controles, apareciendo en la Fig 4.

La recta de regresión viene representada en la Fig 5. La DE_{50} obtenida con esta substancia ha sido

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	ε	% INHIBICION
control	26.64	10.02	39	1.60	0
4	19.50	5.24	6	2.14	27
8	18.42	6.21	7	2.35	31
16	15.50	5.10	10	1.61	42
32	14.12	4.99	8	1.76	47
64	11.88	7.16	9	2.39	55

TABLA VII: INDOMETACINA. Valores de las contracciones.

% respuesta

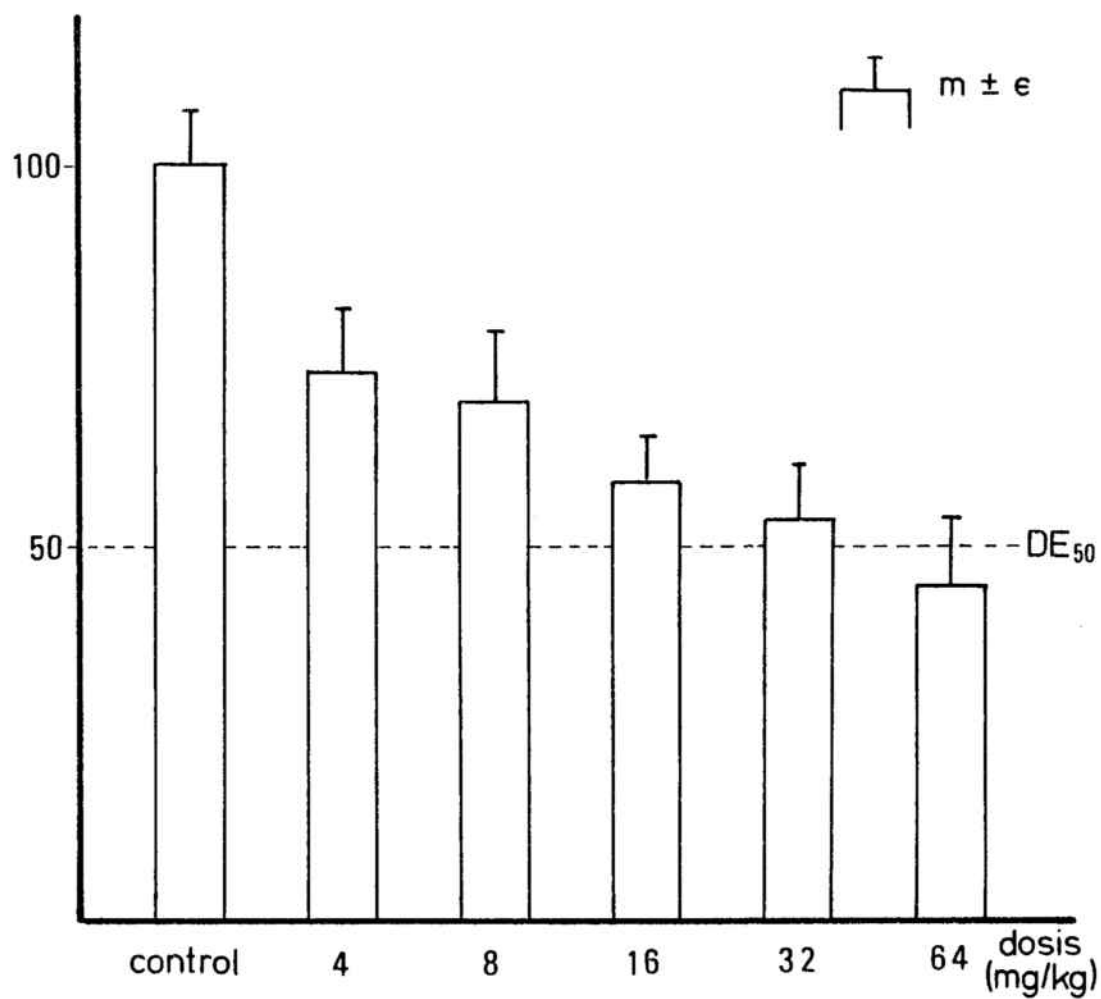


Figura 4: INDOMETACINA. % de respuesta frente a sus propios controles.

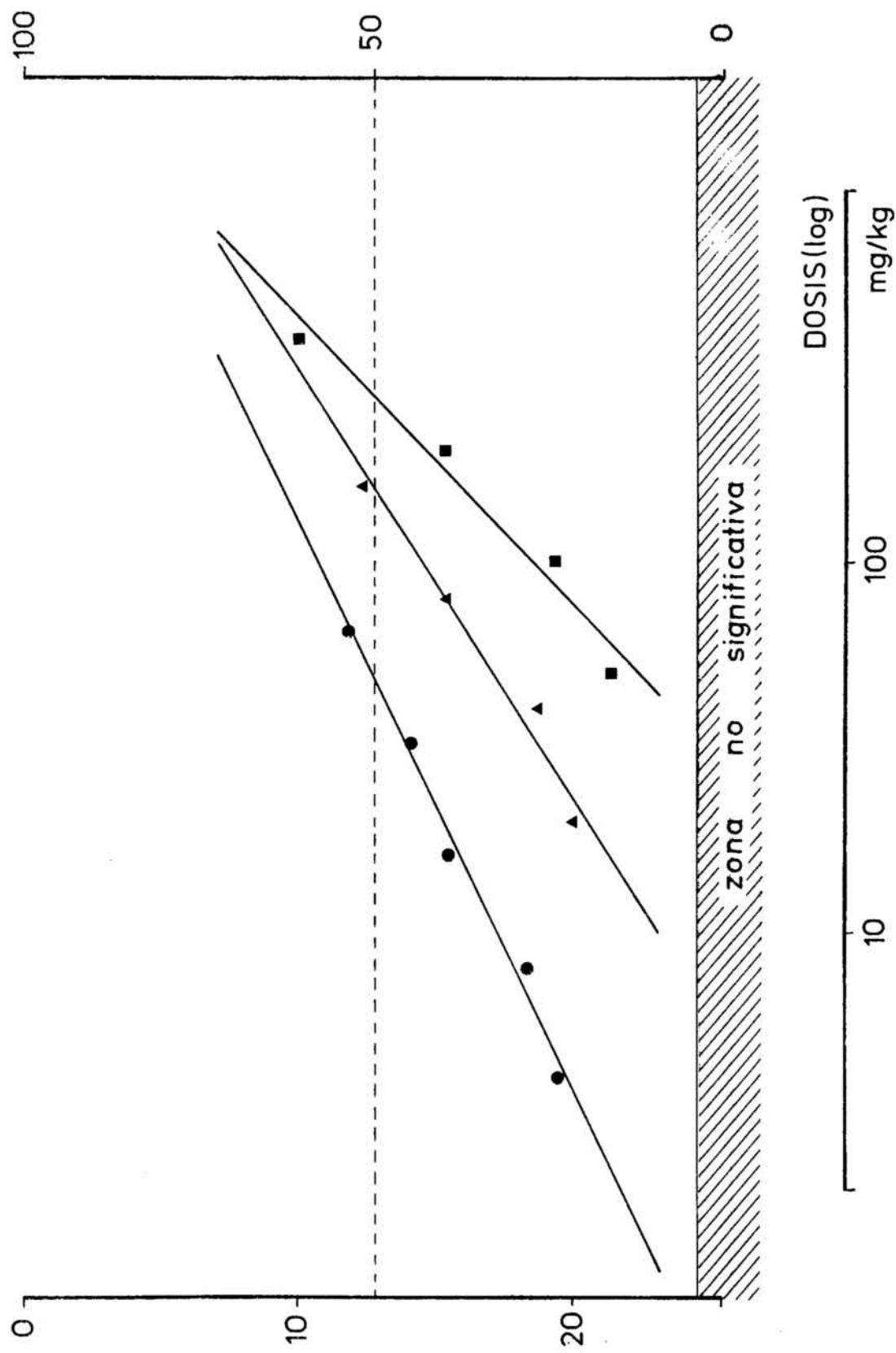
ANALGESICO	DE ₅₀ (mg/Kg)	RECTA REGRESION	r	p <
Aspirina	280	$y = -12.9x + 44.4$	0.9802	0.001
Fenilbutazona	150	$y = -8.7x + 31.9$	0.9837	0.001
Indometacina	45	$y = -6.51x + 23.71$	0.9918	0.001

TABLA VIII: Actividad analgésica en no narcóticos.

Figura 5: Rectas de regresión para analgésicos no narcóticos. Aspirina (■), fenilbutazona (▲) e indometacina (●).

Nº RESPUESTAS

% INHIBICION



45 mg/Kg p.o.

El grupo de los analgésicos no narcóticos ha presentado una actividad en este orden: Indometacina Fenilbutazona Aspirina. Siendo indometacina 6.2 veces más activa que aspirina y 3.3 veces más activa que fenilbutazona.

4.3.2.- ANALGESICOS NARCOTICOS

Se han elegido en este grupo morfina, codeina y d-propoxifeno.

Los criterios empleados para la realización de los cálculos han sido los mismos que en los casos anteriores. Por un lado se han determinado los porcentajes de respuesta respecto a sus propios controles y por otro las rectas de regresión referidas a la totalidad de los controles.

4.3.2.1.- MORFINA

Dosis ensayadas: 1, 2, 4 y 8 mg/Kg.

Las medias de las contracciones obtenidas con cada una de las cuatro dosis aparecen en la TABLA IX. Los histogramas representativos del % de la respuesta se encuentran en la Fig.6

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	ε	% INHIBICION
control	26.95	11.11	60	1.43	0
1	17.18	6.53	17	1.58	36
2	15.08	7.73	13	2.14	44
4	12.33	8.66	9	2.89	54
8	6.20	4.49	5	2.01	77

TABLA IX: MORFINA. Valores de las contracciones.

% respuesta

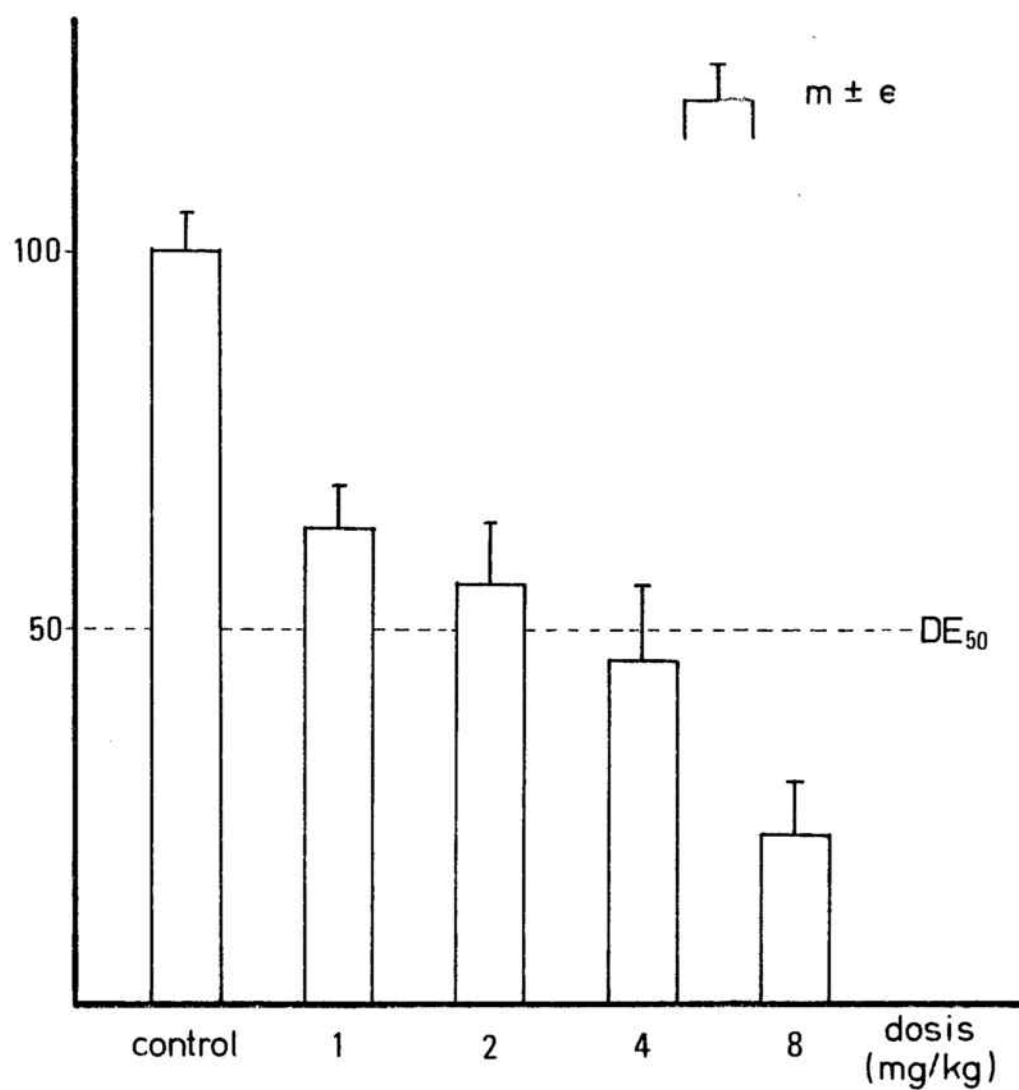


Figura 6: MORFINA. % de respuesta frente a sus propios controles.

Ha presentado una recta de regresión (Fig 11) con un coeficiente de correlación cuya significación ha sido $p < 0.001$ (TABLA XIV).

La DE_{50} ha sido 2.9 mg/Kg.

4.3.2.2.- CODEINA.

Se han ensayado las dosis de: 4, 8, 16, 32 y 64 mg/Kg. En la TABLA X aparecen los valores medios de las contracciones para cada una de las dosis y se representa el descenso del % de respuesta con el aumento de la dosis en la Fig 7.

La ecuación representativa de la recta de regresión se encuentra en la TABLA XIV y dicha recta está representada en la Fig 11. Igual que en los casos anteriores el coeficiente de correlación ha ofrecido una significación de $p < 0.001$.

La DE_{50} ha sido 16 mg/Kg, siendo 5.52 veces menos activa que la morfina.

4.3.2.3.- d-PROPOXIFENO.

Para la determinación de la DE_{50} han sido utilizadas las dosis de: 16, 24, 32 y 45 mg/Kg.

En la Fig 8 se ha representado el % de respuesta

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	e	% INHIBICION
control	27.34	12.52	47	1.83	0
4	20.80	6.86	10	2.17	24
8	17.79	9.29	14	2.48	35
16	12.16	3.76	6	1.54	56
32	7.66	2.87	6	1.17	72
64	5.66	1.63	6	0.67	79

TABLA X: CODEINA. Valores de las contracciones.

% respuesta

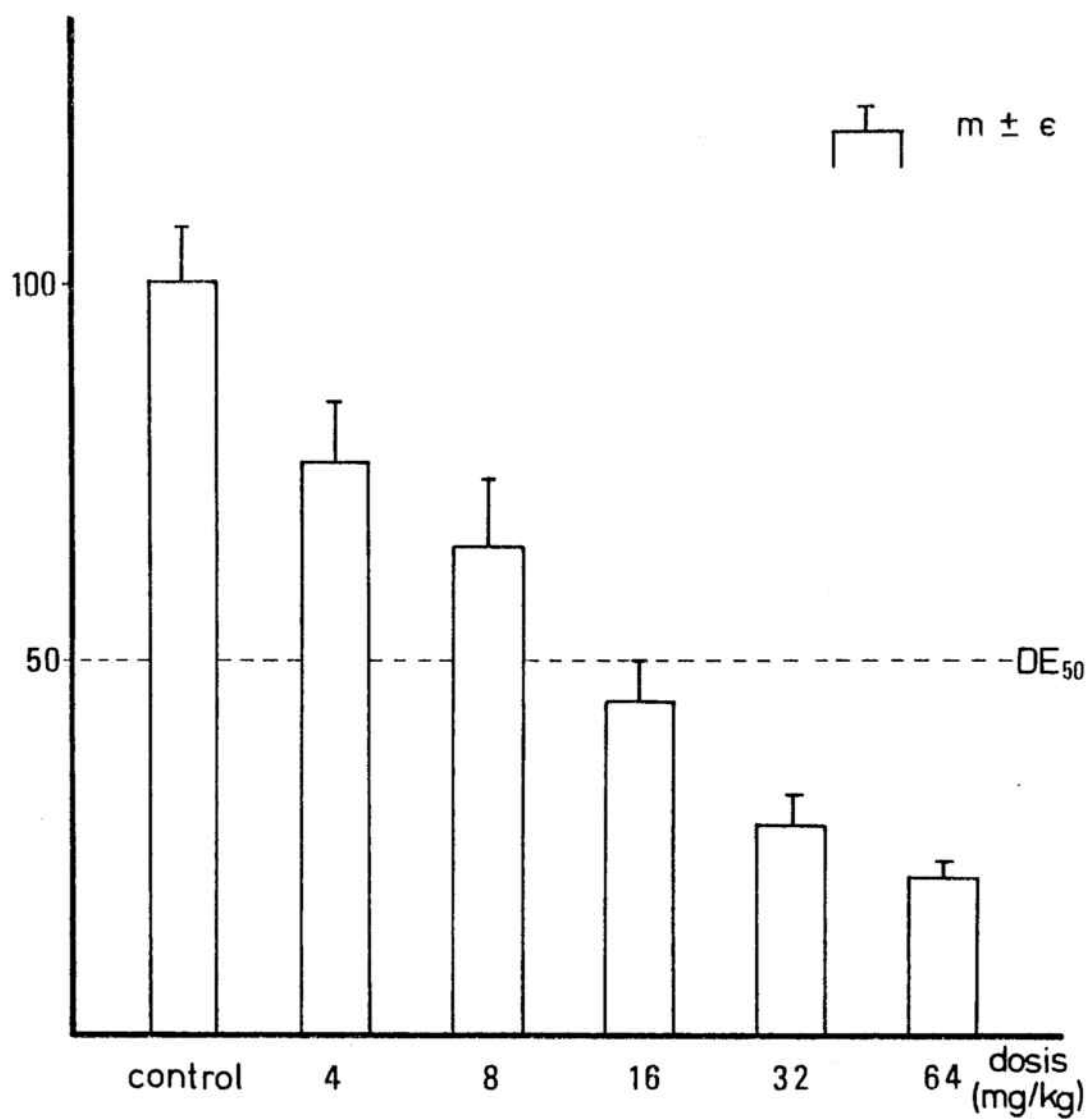


Figura 7: CODEINA. % de respuesta frente a sus propios controles.

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	ϵ	% INHIBICION
control	24.89	9.23	49	1.32	0
16	21.57	8.00	7	3.02	13
24	18.00	8.00	5	3.58	28
32	15.22	7.74	9	2.58	39
45	8.11	4.51	9	1.50	67

TABLA XI: d-PROPOXIFENO. Valores de las contracciones.

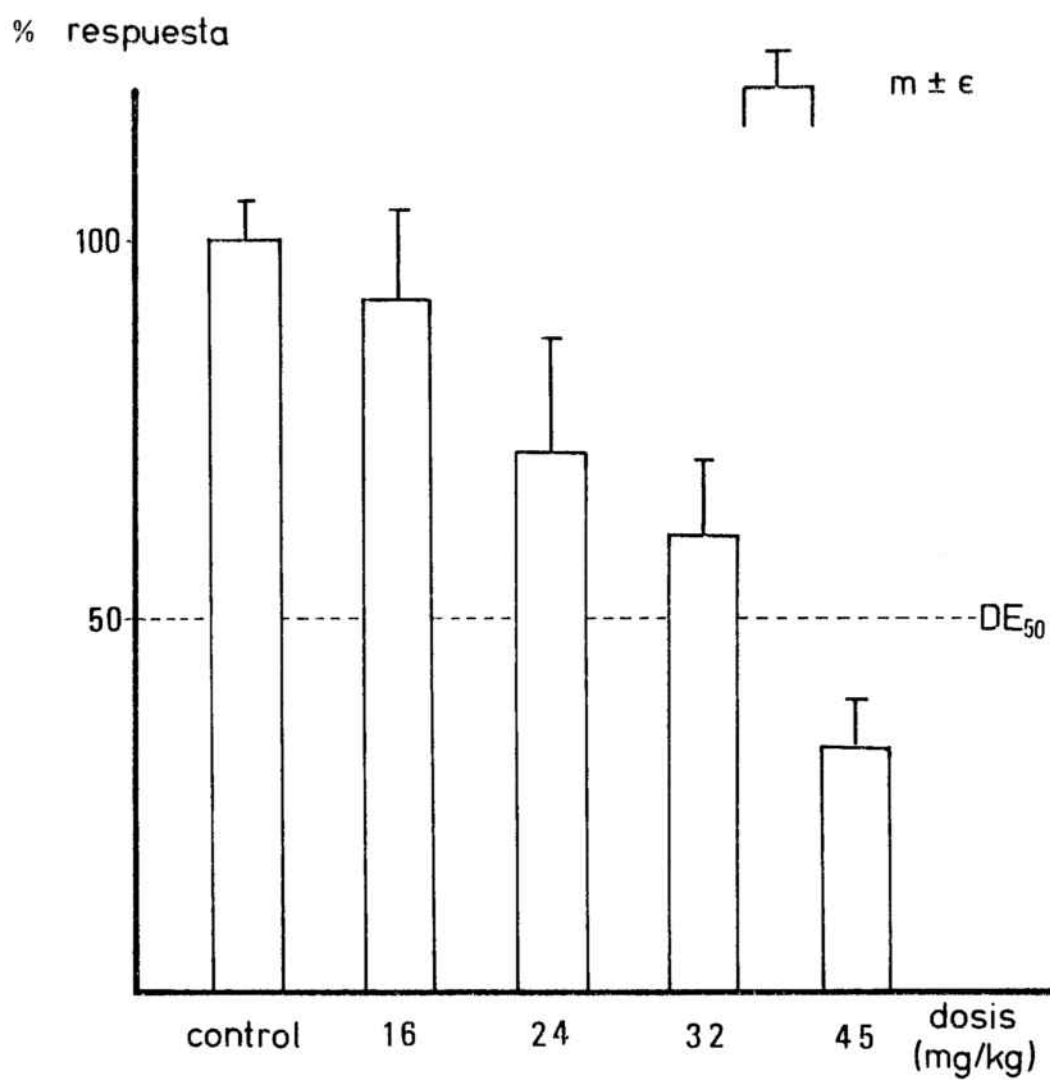


Figura 8: d-PROPOXIFENO. % de respuesta frente a sus propios controles.

para cada una de las dosis ensayadas, recogiendo los valores absolutos en la TABLA XI.

La recta de regresión ha dado una correlación con una significación de $p < 0.001$. Dicha recta nos ha permitido el cálculo de la DE_{50} , siendo ésta 34 mg/Kg. Presenta una actividad analgésica 11.72 veces inferior a la de la morfina.

El orden de actividad analgésica ha sido: Morfina > Codeína > d-Propoxifeno.

4.3.3.- ANTAGONISTAS DE LOS NARCOTICOS.

Dentro de este grupo se han elegido dos sustancias con caracteres diferentes. Por un lado se ha estudiado la nalorfina, sustancia que presenta propiedades agonistas con los narcóticos, entre ellas la de provocar analgesia al ser administrada sola. También hemos estudiado el comportamiento de Naloxona, sustancia que resulta ser antagonista pura de los narcóticos, resultando inactiva como analgésico.

4.3.3.1.- NALORFINA.

Se han ensayado cinco dosis distintas: 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 mg/Kg. Estas dosis han provocado un descenso en el número de contracciones, como puede

DOSIS (mg/Kg)	M	s	n	ε	% INHIBICION
control	22.59	6.78	44	1.02	0
0.4	21.22	7.51	9	2.05	6
0.8	19.40	5.02	5	2.25	14
1.6	16.44	5.77	9	1.92	27
3.2	12.20	1.30	5	0.58	46
6.4	10.20	1.09	5	0.49	55

TABLA XII: NALORFINA. Valores de las contracciones.

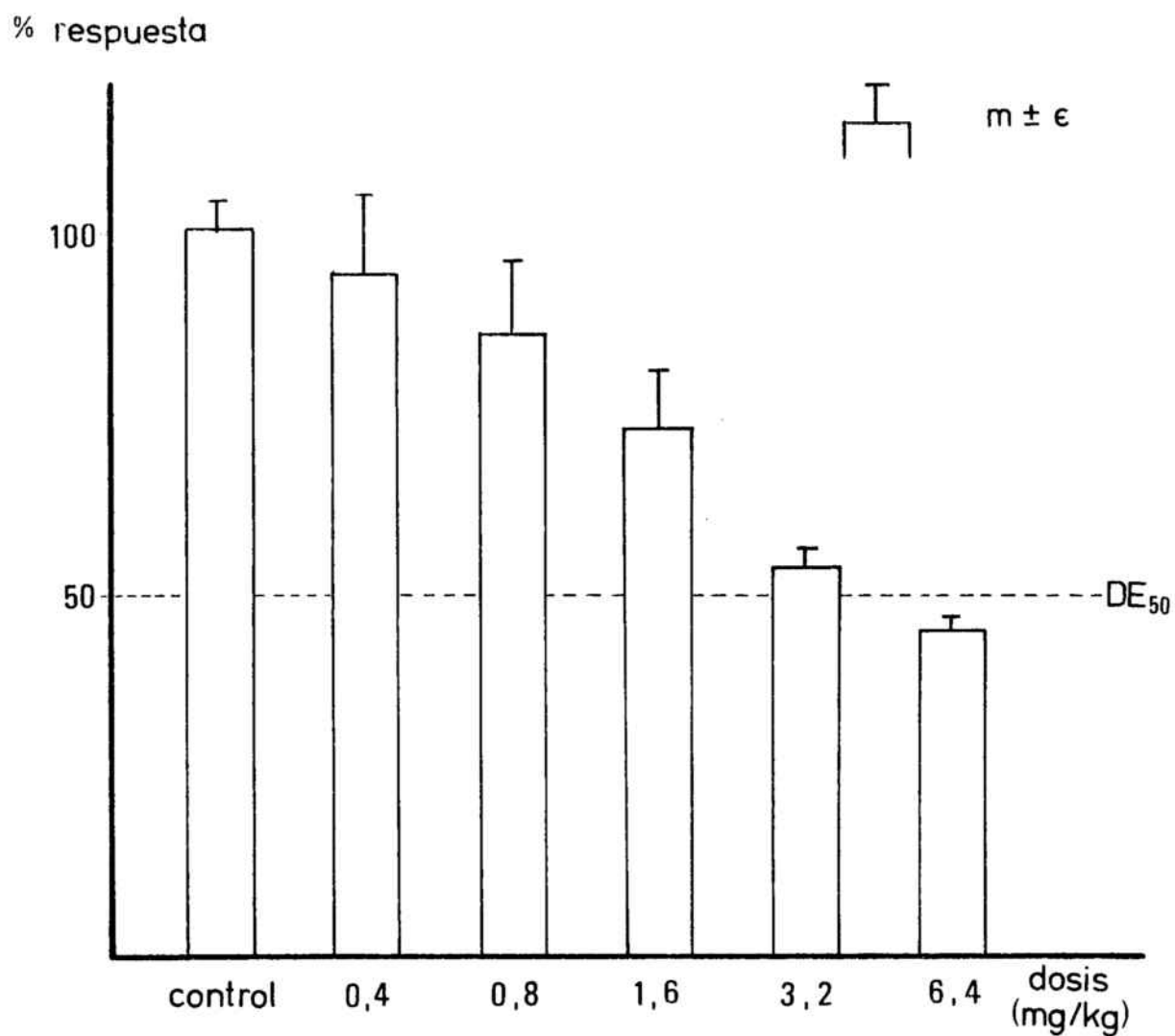


Figura 9: NALORFINA. % de respuesta frente a sus propios controles.

observarse en la Fig. 9 y en la TABLA XII aparecen los valores numéricos correspondientes a las contracciones medias en cada dosis.

La recta de regresión ha presentado una ecuación que se recoge en la TABLA XIV y se representa en la Fig. 11. El coeficiente de correlación nos ha dado con una significación de $p < 0.001$.

La DE_{50} ha sido 3.5 mg/Kg, presentando menor actividad que la morfina y más actividad que codeína.

Se ha procedido a comparar la pendiente de las rectas de regresión correspondientes a morfina y nalorfina, no ofreciendo diferencia significativa.

4.3.3.2.- NALOXONA

Unicamente se ha ensayado una dosis (100 mg/Kg), resultando inactiva, sin ofrecer diferencia significativa con sus propios controles como puede observarse en la Fig. 10.

En la TABLA XIII aparecen las medias del número de contracciones de los controles y de los animales tratados. No se ha encontrado un efecto hiperalgésico de esta sustancia a la dosis ensayada.

DOSIS (mg/Kg)	M	S	n	t
control	23.70	6.70	10	2.12
100	20.50	3.24	10	1.02

TABLA XIII: NALOXONA. Valores de las contracciones.

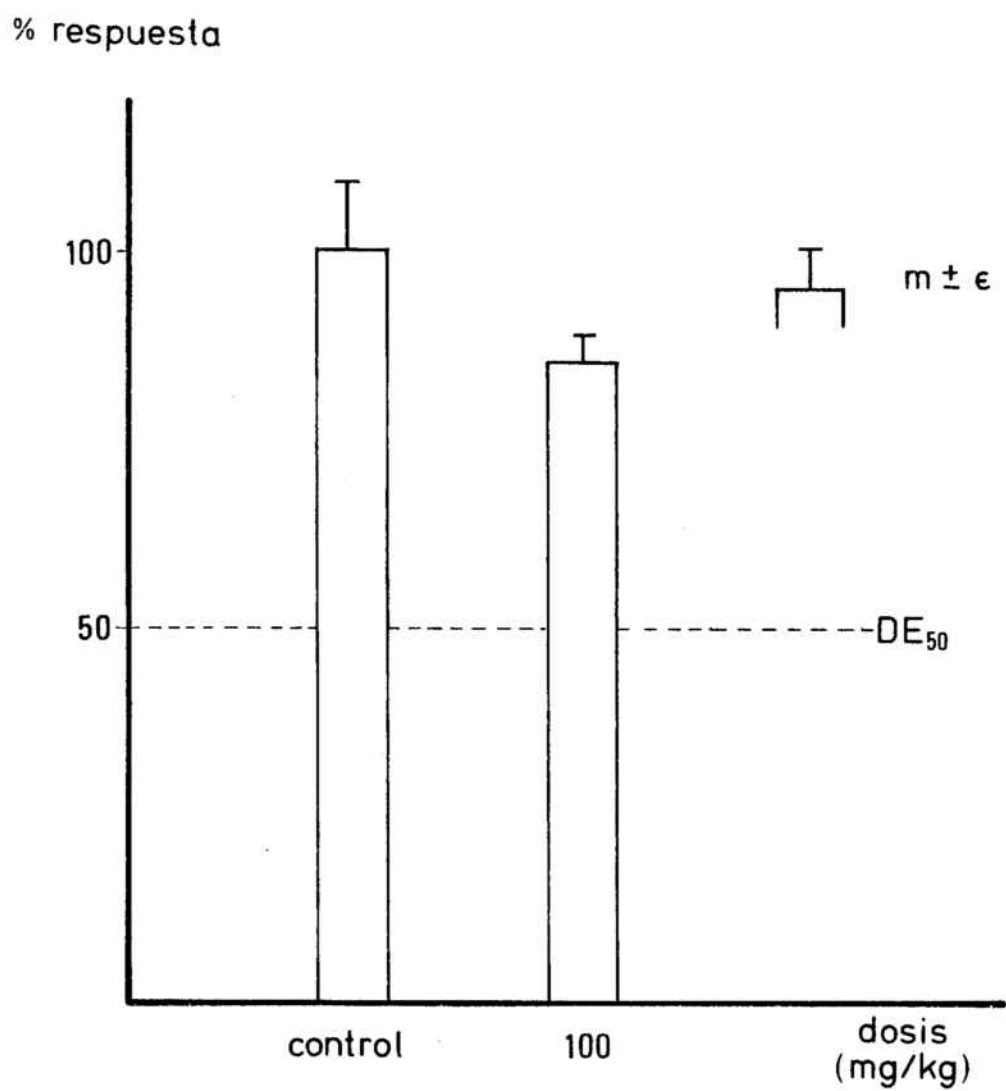


Figura 10: NALOXONA. % de respuesta frente a sus propios controles.

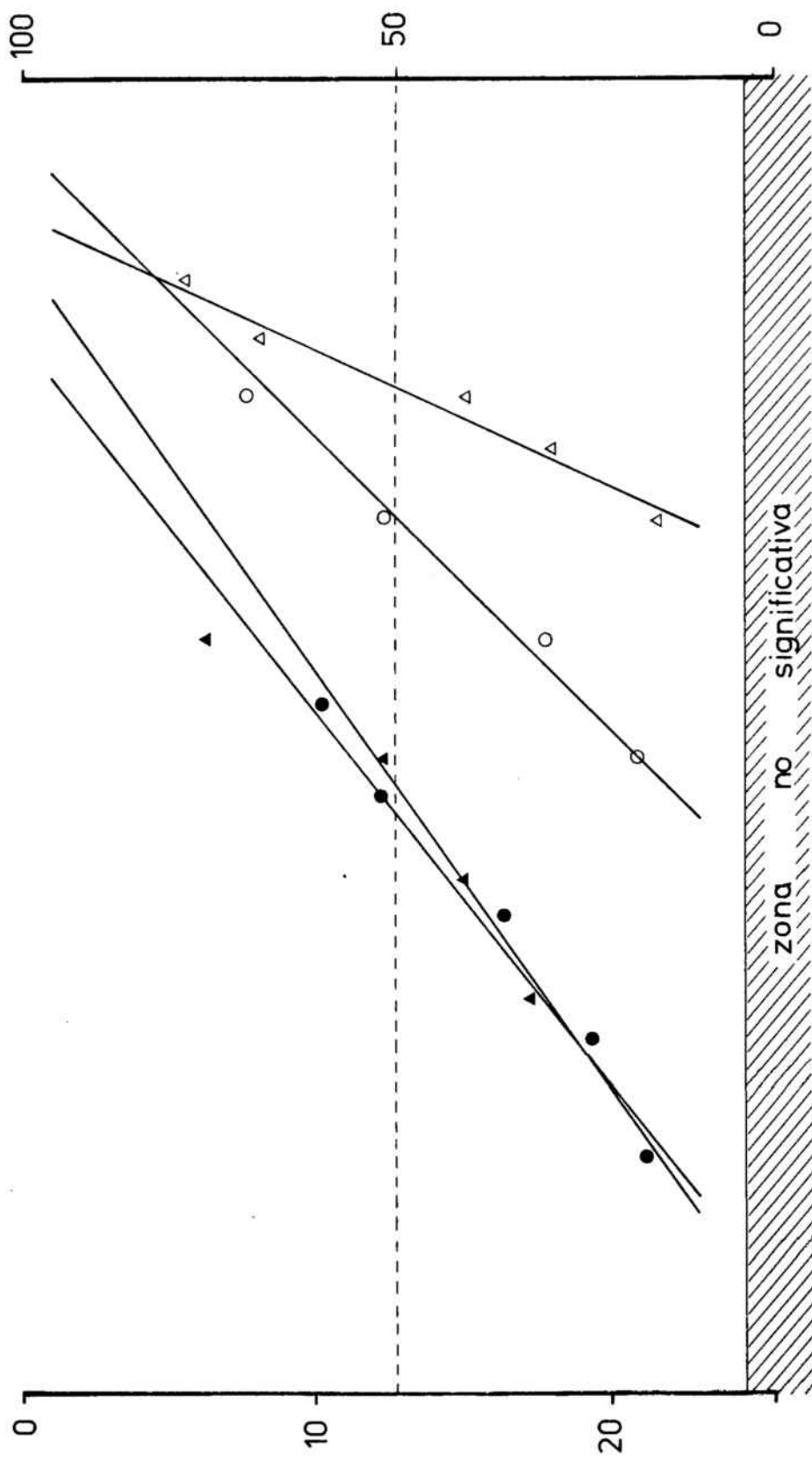
ANALGESICO	DE ₅₀ (mg/Kg)	RECTA REGRESION	r	p <
Morfina	2.9	$y = -10.69x + 17.68$	0.9761	0.001
Codeina	16	$y = -13.59x + 29.33$	0.9902	0.001
d-Propoxifeno	34	$y = -29.43x + 57.96$	0.9717	0.001
Nalorfina	3.5	$y = -9.49x + 27.34$	0.9908	0.001
Naloxona	inactiva	-	-	-

TABLA XIV: Actividad analgésica en narcóticos.

Figura 11: Rectas de regresión para analgésicos narcóticos. Morfina ($\blacktriangle$), codeína (O), d-propoxifeno ($\triangle$) y nalorfina ($\bullet$).

Nº RESPUESTAS

% INHIBICION



5.- DISCUSION

Como se ha señalado anteriormente existe una diferencia en el comportamiento de los ratones de distintas cepas, frente al estímulo doloroso producido por PQ y PBQ. Hemos considerado de gran importancia el comprobar que nuestro método es lo suficientemente reproducible como para inducir los mismos efectos en distintos ratones. Para ello se ha procedido a recomprobar la respuesta provocada por el lactobionato de eritromicina en una cepa de ratones distinta de la estudiada en un trabajo anterior(96). Se han estudiado los parámetros que se habían estudiado anteriormente.

No ha habido diferencia de comportamiento en animales de distinto peso, lo cual permite su empleo indiscriminado a cualquier edad.

Tampoco se ha encontrado diferencia significativa en cuanto a la respuesta que presentan los mismos animales con la administración repetida. Este hecho presenta una doble ventaja. Por un lado permite utilizar los mismos animales como sus propios controles, lo que repercute en un ahorro de animales y en poder seleccionar a aquellos animales que han presentado una respuesta positiva.

Por otro lado al no disminuir el número de las contracciones cuando se repite el ensayo en días diferentes, permite el empleo de nuestro método para estudiar la to-

tolerancia de los animales frente a drogas que causan dependencia, como es la morfina. Esto no puede realizarse con la PQ o con el ácido acético (53,80,106) por disminuir gradualmente las contracciones conforme se les administra el producto sucesivamente.

Se ha visto que las contracciones cesan a los diez minutos de la administración, lo que hace que sea un método rápido. Con ello no sólo se gana en el tiempo necesario para efectuar el test, sino que además evita la posible fatigabilidad del operario, hecho de gran importancia en estos tests tan subjetivos (22).

Para que un método de valoración farmacológica resulte lo más acertado posible, nos ha de permitir obtener unos resultados que coincidan con los datos que se conocen de su empleo en humanos. Se ha de evitar la producción de falsos negativos, para ello se han de estudiar aquellas drogas, de las cuales se conoce sobradamente su actividad. Es por este motivo que hemos elegido unas sustancias determinadas para comprobar la eficacia de nuestro método. Todo método de valoración farmacológica ha de dar unas curvas dosis-efecto con una significación adecuada.

Con las drogas no narcóticas hemos obtenido unas rectas cuyas pendientes resultan de menor inclinación que las de los narcóticos, debido tal vez a su menor potencia analgésica. Esto también se ha observado en otros métodos.

La potencia de los analgésicos no narcóticos que hemos encontrado concuerda con su potencia en humanos. Ha resultado Indometacina > Fenilbutazona > Aspirina en cuanto a actividad. Por tanto las dosis necesarias para producir la misma respuesta analgésica son Aspirina > Fenilbutazona > Indometacina.

De las drogas narcóticas ha resultado más activa la morfina que la codeína, lo cual es lógico dado que esta última se demetila en el hígado y en último término es la morfina la que actúa (112).

Como es sabido d-Propoxifeno resulta menos activa que las dos anteriores.

Nalorfina, es un antagonista de los narcóticos con propiedades agonistas. Por este motivo ha resultado analgésica pero menos que la morfina.

La sensibilidad de un método para detectar la actividad analgésica de la nalorfina depende de su sensibilidad frente a la morfina. Así aquellos métodos que detectan 1 mg/Kg de morfina pueden detectar a la nalorfina (82).

El hecho de no obtener actividad analgésica para naloxona está de acuerdo con lo encontrado en clínica (2,3).

Podemos decir que nuestro método no presenta falsos negativos, pues las drogas ensayadas, que son bien conocidas por sus propiedades analgésicas, han resultado activas en nuestro método.

No hay falsos positivos, al menos en la naloxona que ha resultado inactiva a la dosis ensayada. Otros autores tampoco han encontrado actividad para esta sustancia empleando métodos similares. Así, PEARL (92) usando PBQ no halló actividad a la dosis de 30 mg/Kg y BLUMBERG (10) a la dosis de 82 mg/Kg.

Existe una gran dispersión en cuanto a los valores de DE_{50} obtenidas por diversos autores mediante el empleo de diferentes sustancias inductoras de contracciones. (TABLAS XV a XXI).

Más que el valor absoluto, interesa en un método de valoración de analgésicos, obtener un valor relativo entre las distintas sustancias, lo más cercano posible a los datos obtenidos en la clínica. Con ello queremos decir que la potencia que obtengamos para una droga ha de ser similar a la obtenida en la aplicación terapéutica de dicha droga.

En varios estudios se han comprobado cambios en el comportamiento frente al dolor a lo largo del día (22, 97, 113).

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (mi).	AUTOR	(año)	REF.
190	Ac. Acético	p.o.	30	KOSTER	(1959)	66
134	"	p.o.	-	VINEGAR	(1976)	111
21	Bradiquinina	p.o.	30	EMELE	(1963)	36
200	"	s.c.	20	COLLIER	(1964)	20
165	PBQ	p.o.	-	SIEGMUND	(1957)	36
32	"	p.o.	30	LINEE	(1972)	75
50	"	p.o.	30	LINEE	(1972)	75
140	"	p.o.	5	PARKES	(1965)	91
150	PQ	p.o.	30	EMELE	(1963)	36

TABLA XV: Potencia analgésica de la ASPIRINA encontrada por varios autores.

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (ml).	AUTOR	(año)	REF.
250	Araquidónico	p.o.	-	HELPER	(1968)	51
64.7	Acetilcolina	s.c.	20	COLLIER	(1968)	21
62.1	"	p.o.	20	COLLIER	(1968)	21
42	PBQ	s.c.	20	HENDERSHOT	(1959)	55
50	"	p.o.	30	LINEE	(1972)	75

TABLA XVI: Potencia analgésica de la FENILBUTAZONA encontrada por varios autores.

DE 50	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (mi).	AUTOR	(año)	REF.
0.65	Ac. Acético	-	30	DERAEDT	(1976)	30
0.528	Acetilcolina	p.o.	20	COLLIER	(1968)	21
10	Araquidónica	p.o.	-	HELPER	(1970)	52
0.6	PBQ	p.o.	30	LINEE	(1972)	75
1.1	"	p.o.	30	LINEE	(1972)	75
10	Bradiquinina	-	-	BURNS	(1960)	17

TABLA XVII: Potencia analgésica de la INDOMETACINA encontrada por varios autores.

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (mi).	AUTOR (año)	REF.
3.5	Ac. Acético	p.o.	15	WITKIN (1966)	117
1.5	"	s.c.	30	KOSTER (1959)	66
1.5	"	-	-	KEITH (1960)	63
0.4	Araquidónico	p.o.	-	HELPER (1968)	51
0.4	PBQ	p.o.	30	LINEE (1972)	75
0.59	"	s.c.	15	BLUMBERG (1965)	9
1.15	"	s.c.	-	SIEGMUND (1957)	99
1.4	"	p.o.	20	HILL (1977)	56
0.516	Acetilcolina	s.c.	20	COLLIER (1968)	21

TABLA XVIII: Potencia analgésica de la MORFINA encontrada por varios autores.

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (ml) .	AUTOR	(año)	REF.
42	Ac. Acético	p.o.	30	KOSTER	(1959)	59
4	Araquidónico	p.o.	-	HELPER	(1968)	51
8.44	Acetilcolina	p.o.	20	COLLIER	(1968)	21
3	Bradiquinina	p.o.	30	EMELE	(1963)	36
6.4	PBQ	s.c.	-	SIEGMUND	(1959)	99
10	"	p.o.	-	EMELE	(1961)	35
2.5	"	p.o.	30	LINEE	(1972)	75
5	"	p.o.	20	PARKES	(1965)	91
5.6	PQ	s.c.	-	HENDERSHOT	(1959)	55

TABLA XIX. Potencia analgésica de la CODEINA encontrada por varios autores.

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (mi).	AUTOR (año)	REF.
5.45	Acetilcolina	s.c.	20	COLLIER (1968)	21
5.63	"	p.o.	20	COLLIER (1968)	21
40	Bradiquinina	p.o.	30	EMELE (1963)	36
5.5	PBQ	p.o.	30	EMELE (1963)	36
40	Ac. Acético	p.o.	-	NICKANDER (1977)	87
6.9	"	s.c.	-	NICKANDER (1977)	87

TABLA XX: Potencia analgésica del d-PROPOXIFENO encontrada por varios autores.

DE ₅₀	METODO	VIA	t ACTUACION DROGA (mi).	AUTOR	(año)	REF.
1.96	Acetilcolina	s.c.	20	COLLIER	(1968)	21
0.769	Triptamina	s.c.	20	COLLIER	(1968)	21
0.8	Araquidónico	p.o.	60	HELPER	(1968)	51
0.28	PBQ	s.c.	23	SMITS	(1970)	102
0.48	"	s.c.	15	BLUMBERG	(1965)	9
0.54	"	s.c.	15	PEARL	(1966)	92
0.92	"	s.c.	15	TABER	(1964)	105
2.1	PQ	s.c.	-	HENDERSHOT	(1959)	55

TABLA XXI: Potencia analgésica de la NALORFINA encontrada por varios autores.

Realizando estudios sobre el grado de analgesia producido por la morfina se encontraron variaciones que seguían un ritmo circadiano (79.84).

Utilizando el método de la placa caliente (34) para valorar analgésicos se ha observado una diferencia en la percepción del dolor, correspondiendo un mayor efecto álgico en el período de la mañana (4.30-8.30) y menor por la tarde (18.30-22.30) (22,44).

El hecho de encontrar diferencia según se realice la experiencia por la tarde o por la mañana es de gran importancia y ha de tenerse en cuenta en el momento de la valoración farmacológica de los analgésicos.

STREMPEL (104) ha encontrado a su vez un ritmo circadiano en la sensación dolorosa en humanos. Presenta diferencia según el tipo de dolor provocado. Así causando un dolor epiléptico mediante un pinchazo con una aguja se observa una menor sensación dolorosa al mediodía y mayor durante la noche. Si el dolor es de tipo protopático, por inmersión de la mano en agua fría, se observa el fenómeno inverso, es decir más dolor por el mediodía y menos por la noche.

FREDERICKSON (40) halló un efecto hiperalgésico de la naloxona utilizando el método de la placa caliente (34). Dicho efecto hiperalgésico presentaba un ritmo circadiano que coincidía con el de las endorfinas.

Las endorfinas son sustancias endógenas cerebrales encontradas por HUGHES y a las que se atribuye la propiedad de disminuir la sensación dolorosa (93,94). Se ha comprobado la existencia de una variación en su síntesis a lo largo del día.

FREDERICKSON (40) atribuye la actividad hiperalgésica de la naloxona a que antagoniza la actividad analgésica endógena de las endorfinas. Para ello se basa en el hecho de que la naloxona presenta su mayor actividad hiperalgésica en el intervalo en que la síntesis de endorfinas es menor.

Utilizando el test de la formalina en rata (89) no se pudo encontrar una actividad hiperalgésica para la naloxona y en este hecho se basan para decir que dicho test funciona mediante un mecanismo de acción independiente de las endorfinas y que no es de acción central.

Uno de los posibles modos de actuar las sustancias químicas empleadas para provocar contracciones abdominales en el ratón es por irritación directa debido a su acidez. Este no es el caso del lactobionato de eritromicina pues se ha determinado el pH de la solución resultando ser 6.8, prácticamente neutro.

La respuesta frente a la administración del lactobionato de eritromicina, es decir las contracciones, se

produce inmediatamente tras la administración del agente álgico, por lo que no es probable que sea debido a la producción de algún mediador químico del dolor, pues requeriría un cierto tiempo para liberarse y actuar. En el caso del ácido acético se produce un aumento del contenido de prostaglandinas en la cavidad peritoneal, pero transcurren unos minutos antes de iniciarse las contracciones (55,66).

Existen tres hechos que nos hacen suponer que el mecanismo por el que actúa el lactobionato de eritromicina, no es de origen central y no está relacionado con las endorfinas.

Por un lado tenemos que existe una diferencia significativa en cuanto a la percepción del dolor por la tarde, siendo ésta mucho más acentuada. Esta variación con el día se opone a la obtenida con la placa caliente (22) y al ritmo de las endorfinas (40).

El contenido de endorfinas es mayor por la tarde que por la mañana, con lo que si existiera una relación con éstas, se tendría que reducir el número de las contracciones provocadas por la tarde.

Naloxona no ha resultado hiperalgésica con nuestro método, fenómeno que está relacionado con el contenido en endorfinas.

El método de la placa caliente es específico para la valoración de analgésicos narcóticos (108) y además está sometido a las variaciones en el contenido de endorfinas.

Nuestro método permite la valoración tanto de analgésicos narcóticos como de no narcóticos, no estando estos últimos relacionados con las endorfinas.

Todo ello parece indicar que el mecanismo mediante el cual el lactobionato de eritromicina provoca dolor es de origen periférico más que central.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- El lactobionato de eritromicina actúa como agente nociceptivo productor de contracciones abdominales, al ser administrado intraperitonealmente en el ratón, a la dosis de 160 mg/Kg.
- 2.- La respuesta dolorosa se inicia inmediatamente tras la administración y cesa a los diez minutos.
- 3.- No existe diferencia en el comportamiento al variar la cepa de ratones empleada. Tampoco hay diferencia significativa en la respuesta cuando los animales son de distinto peso o cuando el agente álgico se administra sucesivamente en intervalos de siete días.
- 4.- Existe una diferencia en cuanto a la percepción del dolor a lo largo del día, presentando un mayor efecto álgico por la tarde, entre las 19 y 20 h. Este hecho se da tanto en machos como en hembras.
- 5.- Es un método que permite valorar analgésicos tanto narcóticos como no narcóticos.
- 6.- En el estudio de analgésicos no narcóticos la indometacina ha dado mayor actividad que la fenilbutazona y ésta a su vez mayor que la aspirina.
- 7.- Los analgésicos narcóticos han presentado una actividad que coincide con su aplicación terapéutica. siendo la morfina la más activa, seguida de la codeína y

del d-propoxifeno.

8.- La nalorfina, antagonista de los narcóticos y con propiedades agonistas, ha presentado una actividad analgésica inferior a la morfina y superior a la codeína.

9.- La naloxona, antagonista puro, no ha dado efecto analgésico ni tampoco hiperalgésico.

10.- El mecanismo de acción del lactobionato de eritromicina en la inducción del dolor no es por irritación directa al presentar su solución un pH fisiológico.

11.- No se provoca la liberación de un mediador químico debido a que las contracciones se inician inmediatamente tras la administración.

12.- El mecanismo de acción es independiente de las endorfinas cerebrales al no haberse obtenido un efecto hiperalgésico con la naloxona, y porque coincide el momento de mayor contenido de endorfinas, dentro del ritmo circadiano, con el umbral algico más bajo.

13.- Por último, según nuestros datos se puede concluir que el mecanismo de acción del lactobionato de eritromicina es probablemente de origen periférico y no central.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- ARCHER, S. (1962). Science N.Y. 137, 541-543
- 2.- BEN-BASSAT y col. (1959). Arch. Intern. Pharmacodynamie. 122, 434.
- 3.- BENJAMIN, F.B. (1958). Science. 128, 303.
- 4.- BIANCHI, C.; FRANCESCHINI, J. (1954). Brit. J. Pharmacol. 9, 280.
- 5.- BIGGER, J.D.; CLARINGBOLD, P.J. (1954). Nature Lond. 174, 596-597.
- 6.- BLAIR, A.M.J.N. (1960). Brit. J. Pharmacol. 15, 247.
- 7.- BLOOMFIELD, S.S.; HURWITZ, H.N. (1970). J. Clin. Pharmac. 21, 45-50.
- 8.- BLUMBERG, H.; DAYTON, H.B.; GEORGE, M.; RAPAPORT, D.N. (1961). Fedn. Proc. 20, 311.
- 9.- BLUMBERG, H. (1965). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118, 763-766.
- 10.- BLUMBERG, H.; DAYTON, H.B.; WOLF, P.S. (1966). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 123, 755-758.
- 11.- BORNSCHEIN, R.L. (1977). Pharmacol. Bioch. & Beha. 6, 6, 621.
- 12.- BRAUDE, M.C.; HARRIS, L.S.; MAY, E.L.; SMITH, J.P. (1974) in Narcotics Antagonists. Raven Press. New York.
- 13.- BRITTAIN, R.T.; LEHERER, D.N.; SPENCER, P.S.J. (1963) Nature London. 200, 895-896.

- 14.- BROWN, A.M. (1961). J. Pharm. Pharmacol. 13, 670-678.
- 15.- BROWN, D.M.; HUGHES, B.O. (1962). J. Pharm. Pharmacol. 14, 399-405.
- 16.- BURN, J.H.; FINNEY, D.J.; GOODWIN, L.G. (1950). in Biological Standardization. Oxford University Press. London.
- 17.- BURNS, J.J. y col. (1960). Ann. New York Acad. Sc. 86, 253.
- 18.- CARROLL, M.N.; LIM, R.K.S. (1958). Fed. Proc. 17, 357
- 19.- COLOT, M. (1972) in Notions Techniques de Pharmacologie générale. pag.3-17. Ed. Masson Et. C^{ie}.
- 20.- COLLIER, H.O.J.; HAMMOND, A.R.; HORWOOD-BARRETT, S. SCHNEIDER, C. (1964). Nature (London). 204, 1316-1318.
- 21.- COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. (1968). Brit.J. Pharmacol. Chemoterapy. 32, 295-310.
- 22.- CROCKETT, R.S.; BORNSCHEIN, R.L.; SMITH, R.P. (1977) Physiol & Behav. 18, 193-196.
- 23.- CHAI, C.K. (1960). Nature, Lond. 185, 514-518
- 24.- CHARLIER, R. y col. (1961). Arch. Intern. Pharmacodynamie. 134, 306.
- 25.- CHERNOV, H.J.; WILSON, D.E.; FOWLER, F. PLUMMER, A.J. (1967). Arch. Inter. Pharmacodynamie. 167, 171-178.

- 26.- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. (1941). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 72, 74.
- 27.- DANDIYA, P.C.; MENON, M.K. (1963). Arch. intern. Pharmacodynamie. 141, 223.
- 28.- DAVIES, O.L.; RAVENTOS, J.; WALPOLE, A.L. (1946). Brit. J. Pharmacol. 1, 255.
- 29.- DEL POZO, A. (1967). Farmacia Galénica especial. Tomos I, III. Romargraf. S.A. Barcelona.
- 30.- DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; BENZOY, J.; PETERFALVI, M. (1976). Arch. Inter. Pharma. Ther. 224, 1, 30-42.
- 31.- DOMENECH, J.M. (1975). Métodos estadísticos para la investigación en ciencias humanas. Ed. Herder. Barcelona.
- 32.- DUGGAN, D.E.; HOGANS, A.F.; KWAN, K.C. Mc. MAHON, F.G. (1972). J. Pharmac. exp. Ther. 181, 563-575.
- 33.- ECKHARDT, E.T.; CHEPLOVITZ, F.; LIPO, M.; GOVIER, W.M. (1958). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 186-188.
- 34.- EDDY, N.B.; LEIMBACH, D.J. (1953). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 107, 385.
- 35.- EMELE, J.F.; SHANAMAN, J.; WARREN, M.R. (1961). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 134, 206-209.
- 36.- EMELE, J.F.; SHANAMAN, J. (1963). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 680-682.

- 37.- ERCOLI, N.; LEWIS, M.N. (1945). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 84, 301.
- 38.- FERREIRA, S. H.; VANE, J.R. (1974). A. Rev. Pharmac. 14, 57-73.
- 39.- FLEISH, A.; DOLIVO, M. (1953). Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 11, 305.
- 40.- FREDERICKSON, R.C.A.; BURGIS, V.; EDWARDS, J.D. (1977). Science, 198, 4318, 756-758.
- 41.- GAENSLER, E.A. (1951). J. Clin. Invest. 30, 406.
- 42.- GANONG, W.F. (1976). Fisiología Médica. 5 Ed.
- 43.- GIRALDEZ, A. (1974). Actas del VII Congreso del Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum. Praga.
- 44.- GOLDSTEIN, A.; LOWNEY, L.I. (1971). Proc. Natn. Acad. Sci. USA. 68, 1742-1747.
- 45.- GOODMAN Y GILMAN (1955). The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2 Ed. Mac.Millan Publishing Co. Inc. New York.
- 46.- GOODMAN Y GILMAN (1975). The Pharmacological Basis of Thrrapeutics. 5 Ed. Mac,Millan Publishing Co. Inc. New York.
- 47.- GREEN, A.F.; RUFFELL, G.K.; WALTON, E. (1954). J. Pharm. Pharmac. 6, 390-397.

- 48.- GREEN, A.F. y col. (1951). Brit. J. Pharmacol. 6, 527.
- 49.- GROLLMAN, A. (1962). Pharmacology and Therapeutics
5 Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- 50.- HARRIS, L.S.; PIERSON, A.K. (1964). J. Pharmacol.
Exptl. Therap. 143, 141.
- 51.- HELFER, H.; JAQUES, R. (1968). Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 26, 137-144.
- 52.- HELFER, H.; JAQUES, R. (1970). Pharmacology. 4, 163.
- 53.- HELFER, H. (1970). Pharmacology. 3, 41-52.
- 54.- HELSLEY, G.C. y col (1968). J. Med. Chem. 11, 472.
- 55.- HENDERSHOT, L.C.; FORSAITH, J. (1959). J. Pharmacol.
Exptl. Therap. 125, 1, 237-240.
- 56.- HILL, R.C.D.; ROEMER, D.; BUESCHER, H. (1977). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 201, 3, 580-586.
- 57.- JANSSEN, P.A.J., JAGENEAU, A. (1957). J. Pharm. Pharmacol. 9, 381-400.
- 58.- JAQUES, R. (1959). Helv. Physiol. Acta. 17, 255-267.
- 59.- JAQUES, R. (1977). Arzn. Hel. Forsch. Drug. Resear.
27, 9, 1698.
- 60.- KEATS, A.S.; TELFORD, J. (1956). J. Pharmac. Exptl.
Therap. 117, 190-199.
- 61.- KEATS, A.S.; TELFORD, J. (1964). J. Pharmac. Exptl.
Therap. 143, 157-164.

- 62.- KEEL, C.A.; ARMSTRONG, D. (1964). in Substances Producing Pain and Itch. Edward Arnold Publisher, Ltd. London.
- 63.- KEITH, E.A. (1960). Amer. J. Pharm. 132, 202-230.
- 64.- KOLL, W.; REFFERT, H. (1938). Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 190, 687.
- 65.- KORNFELD DE. T.J.; LASAGNA, L. (1963). Fedn. Proc. 22, 248.
- 66.- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E, J. (1959). Fed. Proc, 18, 412.
- 67.- KOSTERLITZ, H.W.; COLLIR, H.O.J. (1973). in Agonist and Antagonist Actions of Narcotic Analgesics Drugs. University Park Press. Baltimore.
- 68.- KUHN, D.C.; WILLIS, A.L. (1973). Brit. J. Pharmacol. 49, 183P.
- 69.- LAMOTTE, M. (1965). Estadística Biológica. Principios Fundamentales. Toray-Masson S.A. Barcelona.
- 70.- LASAGNA, L. BEECHER, H.K. (1954). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 112, 356-363.
- 71.- LASAGNA, L. DE KORNFELD, T.J. (1961). J.A.M.A. 178, 887.
- 72.- LAURANCE, D.R.; BACHARACH, A.L. (1964). Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics I, 183-201. Academic Press. London and New York.

- 73.- LEIPZIG, L.J.; BOYLE, A.J.; Mc.CANN, D.S. (1970).
J.Chronic. Dis. 22, 553-563.
- 74.- LIM, R.K.S.; GUZMAN, F. (1968). in Pain. Academic
Press. London and New York.
- 75.- LINEE, P. (1972). J. Pharmacol (Paris). 3, 513-515.
- 76.- LITCHFIELD, J.; WILCOXON, F. (1949). J. Pharmacol.
Exptl. Therap. 96, 99-113.
- 77.- LITTER, M. (1966). Farmacología. 3 Ed. Ed. El Ate-
neo. Buenos Aires.
- 78.- LOWNY, L.I.; SCHULZ, K.; LOWERY, P.J.; GOLDSTEIN, A.
(1974). Science. Wash. 183, 749-753.
- 79.- LUTSCH, E.F.; MORRIS, R.W. (1971). Experientia. 27,
420-421.
- 80.- MACARAEG, P.V.J.; BIANCHINE, J.R.; LASAGNA, L. (1968).
J.Pharmacol. Exptl. Therap. 161, 130-140.
- 81.- MACHT, D.I.; MACHT, M.B.J. (1940). J. Am. Pharm.
Assoc. (Sci. Ed). 29, 193.
- 82.- MARTIN, W.R. (1967). Pharmacol. Rev. 19, 463-521.
- 83.- MATHER, K. (1946). Analyst, 71, 407.
- 84.- MORRIS, R.W.; LUTSCH, E.F. (1969). J. Pharmacol.
Sci. 58, 374-376.
- 85.- MURPHREE, H.B. (1962). Clin. Pharmac. Ther. 3, 473.

- 86.- MURRAY, W.J.; MILLER, J.W. (1960). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 128, 380.
- 87.- NICKANDER, R.; SMITS, S.E.; STEINBERG, M.I. (1977). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 200, 1, 245.
- 88.- NILSEN, P.L. (1961). Acta. Pharmacol. Toxicol. 18, 10.
- 89.- NORTH, M.A. (1978). Life. Sciences, 22, 4, 295-302.
- 90.- OKUN, R. ; LIDDON, S.C.; LASAGNA, L. (1963). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 139, 107-109.
- 91.- PARKES, M. W.; PICKENS, J.T. (1965). Brit. J. Pharmacol. 25, 81-87.
- 92.- PEARL, J.; HARRIS, L.S. (1966). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 154, 319-323.
- 93.- PERT, C.B.; SNYDER, S.H. (1973). Science. Wash. 179, 1011-1014.
- 94.- PERT, C.B.; SNYDER, S.H. (1974). Molec. Pharmac. 10, 868-879.
- 95.- PFEIFFER, C.C. y col (1948). Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 21.
- 96.- PLANAS, J.M. (1974). Tesina. Facultad Farmacia. Barcelona.
- 97.- PROCACCI, P.; BYZELLI, G.; PASSERI, I.; SASSI, R.; VOEGELIN, M.R.; ZOPPI, M. (1972). Res. Clin. Stud. Headache. 3, 160.

- 98.- RUSELL, W. M. S.; BURCH, R.L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique, London. Methuen and Co. Ltd.
- 99.- SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. (1957). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 729-731.
- 100.- SIMON, E.J.; HILLER, J.M.; EDELMAN, I. (1973). Proc. natn. Acad. Sci. USA. 70, 1947-1949.
- 101.- SMITH, G.M.; BEECHER, H.K. (1969). Clin. Pharmac. Ther. 10, 213-216.
- 102.- SMITS, S.E.; TAKEMORI, A.E. (1970). Brit. J. Pharmacol. 39, 627-638.
- 103.- SOLLMANN, T. (1957). A Manual of Pharmacology p 722. Saunders, Philadelphia.
- 104.- STREMPER, H. (1977). J. Interdisc. Cycle. Resear. 8, 276-280.
- 105.- TABER, R.I.; GREENHOUSE, D.D.; IRWIN, S. (1964). Nature, 204, 189.
- 106.- TEIGER, D.G. (1976). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 197, 311-316.
- 107.- TOUMI, A.; GOUT, R.; CROS, J. (1976). Pharmacol. (Paris). 7, 497-506.
- 108.- TURNER, R.A. (1965). Screening Methods in Pharmacology. Academic Press. London and New York.

- 109.- VAN DER WENDE, G.; MARGOLIN, S. (1956). Fed. Proc. 15, 494.
- 110.- VANE, J.R. (1971). Nature. 231, 494.
- 111.- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. (1976). Europ. J. Pharmacol. 37, 23-30.
- 112.- WAY, E.L.; ADLER, T.K. (1962). The Biological Disposition of Morphine and its surrogates. World Health Organization, Geneve.
- 113.- WEITZMAN, E.D.; LUCE, G. (1969). Mental Health Prog. Rep. 3 N.I.M.H., PHS, Pub No 1876, 319-332.
- 114.- WHITTLE, B.A. (1964). Int. J. Neuropharmacol. 3, 369-378.
- 115.- WILLIS, A.L.; CORNELSEN, M. (1973). Prostaglandins, 3, 353.
- 116.- WINTER, C.A.; ORAHOVATS, P.D.; LEHMAN, E.G. (1957). Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 110, 186-202.
- 117.- WITKIN, L.B.; HEUBNER, C.F.; GALDI, F.; O'KEEFE, E.; SPITALETTA, P.; PLUMMER, A.J. (1961). J. Pharmacol. Exptl. Therap. 133, 400-408.
- 118.- YIM, G.K.W. y col (1955). J. Pharmacol Exptl. Therap. 59, 291.