INSTITUTO DE FARMACOLOGIA
Universidad de Concepción

Relación entre la actividad analgésica y anticolinoesterásica de algunos fármacos *

(con 3 gráficos)

por

Lecannelier, R. S., Bardisa, U. L., Tamayo, R. L., Ibaceta, D. R.

INTRODUCCION

A partir de 1951, ha sido una de las líneas de investigación de este Laboratorio, tratar de establecer el mecanismo de acción de los fármacos analgésicos.

En trabajos anteriores (1-2-3-4-5), hemos analizado una serie de posibilidades, presentando algunos hechos originales y hemos llegado a la conclusión que es necesario plantear este problema en el terreno bioquímico.

Investigamos la influencia del sistema neurovegetativo, asociando a los analgésicos, fármacos parasimpáticos-miméticos, parasimpático-líticos, simpático-miméticos y antiadrenérgicos. En igual forma estudiamos el efecto de algunos bloqueadores sinápticos y de ciertas alteraciones hormonales (3-4).

Nuestros planteamientos en el terreno bioquímico se orientan en la actualidad en las siguientes direcciones: 1º—interferencia en el metabolismo glucídico, que investigamos asociando los analgésicos a inhibidores de este metabolismo, como la floridzina, el monoyodoacetato y el malonato de sodio (6); 2º—alteraciones de la acetilación biológica, administrando los analgésicos junto a estimulantes de la colinoacetilasa como los ácidos pantoténicos y glutámico, verificando además las modificaciones "in vivo" de la acetilación de la sulfanilamida por fármacos depresores (7); y 3º— la posible inhibición de algunos enzimos por los fármacos analgésicos, como ser: las colinoesterasas y las amino-oxidasas.

En la presente comunicación hemos querido dilucidar sólo la participación de la colinoesterasa en la analgesia, estudiando "in vitro" la acción de algunos fármacos depresores del sistema nervioso central sobre este enzimo y establecer una correlación

---

* Este trabajo ha sido auspiciado por el Consejo de Investigación Científica de la Universidad de Concepción.

entre la actividad analgésica y anticolinoesterásica. En caso contrario se consideraría esta última propiedad, sólo como un efecto de menor importancia, que explicaría sus acciones secundarias.

Diferenciamos dos tipos de colinoesterasas que son clásicos, aún cuando ciertos trabajos tienden a demostrar la existencia de mayor número de ellas (8). La ubicación de los dos enzimos es bastante relativa y variable según la especie: acetilcolinoesterasa, vera, verdadera o específica, que existe de preferencia en el tejido nervioso (cerebro) y en los eritrocitos (9); y pseudocolinoesterasa, falsa o inespecífica, que encontramos especialmente en el suero sanguíneo.

La primera hidroliza a la acetilcolina en proporción más alta que cualquier otro substrato, hidroliza a la acetil beta metilcolina en menor grado que a la acetilcolina y no hidroliza a la benzoilcolina, carbaminoilcolina y ésteres de alcoholes simples; en tanto que la pseudocolinoesterasa hidroliza a la benzoilcolina y no a la acetil beta metilcolina (9-10).

La presencia de la acetilcolinoesterasa en todos los tipos de tejidos conductores y la dependencia de la conducción de la actividad del enzimo, permiten concluir que el rol de la colinoesterasa es esencial en este fenómeno. La función de la pseudocolinoesterasa parece ser sólo complementaria (11-12-13).

Fármacos como la fisostigmina y la prostigmina inhiben el enzimo en forma reversible (14-15) y en forma irreversible, los alquilfosfatos como el diisopropilfluorfosfato, el tetraetilpirofosfato y el hexaetilpirofosfato. Las bases de amonio cuaternarias y las aminas terciarias actúan sobre las acetilcolinoesterasa y la pseudocolinoesterasa respectivamente (16).

Junto a los fármacos recién mencionados, existe un grupo de substancias que poseen cierta actividad anticolinoesterásica menor (17-18), se incluyen en esta categoría los anestésicos locales, cafeína, atropina, morfina y sucedáneos, etc. (19-20).

Debido a las discrepancias entre los autores, en cuanto a los porcentajes de inhibición por estos fármacos y a las diferentes concentraciones de substrato y enzimo utilizados, comenzamos por buscar las condiciones óptimas para detectar efectos inhibitorios, empleando para ello soluciones de eserina y prostigmina del orden de 10^{-7}M, con diluciones variables de substratos y enzimos.

Encontrada la combinación de concentraciones de substratos y enzimos, más convenientes, procedimos a ensayar los distintos fármacos en diluciones crecientes.

Los fármacos estudiados corresponden a las distintas drogas utilizadas en nuestros trabajos analgesiométricos (5) y hemos agregado la estricnina, cuyo efecto sobre el sistema nervioso central ha sido explicado por su acción anticolinoesterásico (21). Los resultados obtenidos se presentan a continuación en gráficos, con la finalidad de aceptar o rechazar la participación de un mecanismo anticolinoesterásico en el efecto analgésico de algunos fármacos.

METODICA

1.—Descripción de los aparatos

En nuestras determinaciones empleamos un aparato de **Warburg, C. Gerhardt.** Aparte de los manómetros correspondientes a este aparato, usamos los de doble capilar, modelo DKB Braun-Melsungen.

La calibración de matraces y manómetros debe hacerse con el objeto de conocer el espacio reaccional que dispone el gas desprendido por la acción del enzimo sobre el substrato, midiendo el volumen del matraz, el tubo de conexión y el espacio que queda entre la llave del manómetro y la superficie del líquido Brodie, en la marca 15 o 18, según el tipo de manómetro usado.

Este volumen se designa con el símbolo "Vg", calculado por nosotros por el método Krebs-Grisolia, que junto con otras variables como la temperatura, presión, solubilidad del gas, etc., nos ha de dar la constante "K" de cada manómetro. Multiplicando "K" por el desnivel "h", obtenemos el volumen del gas producido por el efecto de la acción enzimática.

2.—Determinación de la actividad colinoesterásica.

Se empleó la técnica clásica de Ammon, calculando el volumen de anhidrido carbónico desprendido del medio bicarbonatado (R_{30}) por efecto del ácido acético producido en la hidrólisis de la acetilcolina por la colinoesterasa (9).

En el depósito central de cada matraz colocamos 0.6 ml. de solución enzimática y 0.7 ml. de solución del inhibidor. En el bulbo lateral, 0.3 ml. de acetilcolina, lo que hace un volumen total de 1.6 ml.

Se ajustan los matraces ya preparados en su manómetro correspondiente asegurándolo mediante dos pequeños resortes, colocando previamente en la juntura una mezcla de lanolina, vaselina y cera de abejas (en la proporción 5:5:1).

Se deja como control un manómetro que, en lugar de inhibidor lleva R_{30}, enzimo y substrato en igual cantidad que en los otros manómetros. Otro manómetro hace las veces de termobarómetro que registrará las variaciones de presión atmosférica y temperatura dentro del local de trabajo. En el depósito principal del matraz de este manómetro se coloca 1.6 ml. de R_{30}. La variación que se registre se restará como factor de error a los manómetros.

Se deja en contacto 15 minutos el enzimo con el inhibidor estando las llaves de paso abiertas, luego, se llevan los manómetros al carro de oscilación, quedando los matraces introducidos dentro del baño termorregulado. Se regula a razón de 90 a 100 oscilaciones por minuto, incubando por espacio de 30 minutos. A continuación, sacando el manómetro del carro se vierte el substrato sobre el enzimo y se hace oscilar nuevamente por espacio de 5 minutos para normalizar la reacción. Se verifican los niveles de la solución Brodie, se cierra la llave de paso y se hacen las lecturas a los 10, 20 y 30 minutos.

Terminada la experiencia, los matraces se enjuagan con abundante agua potable, se remueve el lubricante con alcohol y se hacen hervir en mezcla cromo sulfúrica durante 10 minutos, luego se lavan con agua potable, agua destilada y se secan a la estufa.

3.—**Soluciones y reactivos.**

Suero Ringer bicarbonatado (R_{30}).— Fué empleado para hacer todas las diluciones de tejidos, substratos y las soluciones de los inhibidores. El pH del R_{30} fué 8,4, controlado periódicamente en un potenciómetro Beckman, modelo G.

Solución Brodie.—Cloruro de sodio 4.6 g; desoxicolato de sodio 1 g; Azul de Evans 0.05 g; agua c. s. p. 100 ml. Su densidad es 1.033. También se le agregó algunos cristalitos de timol para impedir el desarrollo de hongos.

Cloruro de acetilcolina (Artersol Colliére), **Salicilato de Artersol** Eserina (S. B. Penick Co.), Neostigmina (Roche), éster dimetilcarbámico de m-hidroxifenil trimetilamonio metilsulfato. **Clorhihidrato de Morfina** (May & Baker), **Clorpromazina** (Largactil-Specia), **Clorhidrato de procaína** (Novocaína Winthrop), **Sulfato** de Estricnina (Merck), Pentobarbital sódico (Bubeck & Dolder),**Meperidina** (Demerol Winthrop), **Metadona Clorhidrato** (Amidona Beta), **Aminopirina** (Baker Chem. Co.), **Salicilato de sodio** (Merck), **Salicilamida** (Coleman & Bell).

4.—**Técnicas usadas.**

a) **Homogenizado de cerebro** (22). Se decapitan ratas sin anestesia. Se extrae el cerebro, el cual se limpia cuidadosamente de vasos sanguíneos bajo agua destilada. Se seca sobre papel filtro, se pesa y se lleva al Homogenizador (Arthur Thomas, modelo 4288 G), que contiene 1 ml. de diluyente isotónico. Se homogeniza por 5 minutos y se hace la dilución correspondiente para llevarlo al porcentaje deseado.

El homogenizado es una suspensión de los componentes de 1 protoplasma incluyendo mitocondrias, microsomas y gránulos de secresión, etc., más una solución de factores tales como proteínas, iones, enzimos, etc. Es posible en estas preparaciones estudiar reacciones determinadas, agregando los substratos correspondientes, en nuestro caso acetilcolina.

b) **Hemolizado de eritrocitos.**—Se extrae sangre por punción cardíaca, habiendo humedecido la jeringa con Heparina. Esta sangre se centrifuga, se elimina el plasma y los eritrocitos se lavan con suero fisiológico. Esta operación se repite cuatro veces consecutivas.

Los eritrocitos así tratados se hemolizan con solución 0.025 M de bicarbonato de sodio, en proporción 1:4 respectivamente, para hacerla al 20%.

c) **Suero sanguíneo.**—Se utilizó para determinaciones de colinoesterasa inespecífica. La sangre se extrajo por punción cardíaca.

5.—**Animales empleados.**

Para los ensayos de colinoesterasa en homogenizado de cerebro hemos empleado ratas de ambos sexos.

En nuestras experiencias con suero y hemolizado de eritrocitos hemos usado perros de ambos sexos, que no hubieran recibido tratamiento previo.

6.—**Cálculos del porcentaje de inhibición.**

La comparación entre la hidrólisis producida en el manómetro control (expresada en mm^3 de CO_2) y la alcanzada en los manómetros en cuyos matraces se había agregado algún fármaco, nos permitió calcular el porcentaje de inhibición para cada manómetro, habiendo descontado previamente la variación del termobarómetro.

En todos los casos empleamos diluciones crecientes, expresadas en molaridad, a fin de obtener la potencia inhibidora 50 (PI 50) por interpolación en curvas donde colocamos porcentajes de inhibición contra diluciones (23).

Para los cálculos estadísticos seguimos las indicaciones de Lacey (24).

RESULTADOS

Efecto de los distintos fármacos sobre la hidrólisis de la acetilcolina por enzimos de distinto origen. Los fármacos estudiados se agrupan en cinco órdenes:

1.—El pentobarbital, barbitúrico que experimentalmente se utiliza como anestésico general y que poseería un efecto depresor cortical.

2.—En otro grupo colocamos los analgésicos propiamente tales, como metadona, morfina y meperidina, de acción probable sobre el hipotálamo.

3.—El tercer grupo está formado por clorpromazina, procaína y mefenesina, fármacos que actuarían a un nivel más bajo en el Sistema Nervioso Central.

4.—El cuarto grupo formado por derivados salicílicos cuya acción para nosotros sería periférica, y finalmente;

5.—Tres fármacos cuya acción sobre el Sistema Nervioso Central es probablemente estimulante: estricnina, eserina y prostigmina.

Los resultados obtenidos se presentan en los gráficos siguientes:

Gráfico Nº 1

Efecto de los diversos fármacos sobre la acetilcolinoesterasa de homogenizado de cerebro.

Los resultados sobre la acetilcolinoesterasa de homogenizado de cerebro parecen indicar cuatro tipos de fármacos:

1.—Acción colinosterásica sumamente débil, como derivados salicílico con un PI_{50} del orden de 0.2M a 0.6M.

2.—Fármacos poco activos, como el pentobarbital, morfina, amidona, etc., con un PI_{50} de 0.02 M a 0.0096 M.

3.—Un fármaco ya claramente anticolinoesterásico, la estricnina, con un PI_{50} del orden de 0.000,028,2 M.

4.—Dos fármacos extremadamente activos, como la eserina y la prostigmina con un PI_{50} del orden de 0.000,000,14 M a 0.000,000,48 M.

Gráfico Nº 2

Efecto de los distintos fármacos sobre la acetilcolinoesterasa de hemolizado de eritrocitos.

Gráfico Nº 3

Efecto de los distintos fármacos sobre la pseudocolinoesterasa del suero sanguíneo.

En cuanto a los resultados con acetilcolinoesterasa de hemolizado de eritrocitos, éstos son sensiblemente semejantes a los anteriores porque los derivados salicílicos dan un PI_{50} entre 0.1 M y 0.07 M, los depresores nerviosos entre 0.02 M y 0.0035 M, la estricnina bajó su PI_{50}, 0.000,264 M manteniéndose aproximadamente los PI_{50} para eserina y prostigmina.

Finalmente, los resultados con pseudocolinoesterasa de suero de perro no permiten una neta separación entre los derivados salicílicos y los analgésicos típicos, agrupándose los primeros entre 0.1 M y 0.83 M. La estricnina disminuyó a un PI 50 de 0.0000,285 M.

No se modificó mayormente los PI_{50} de la eserina y prostigmina.

GRAFICO Nº 1

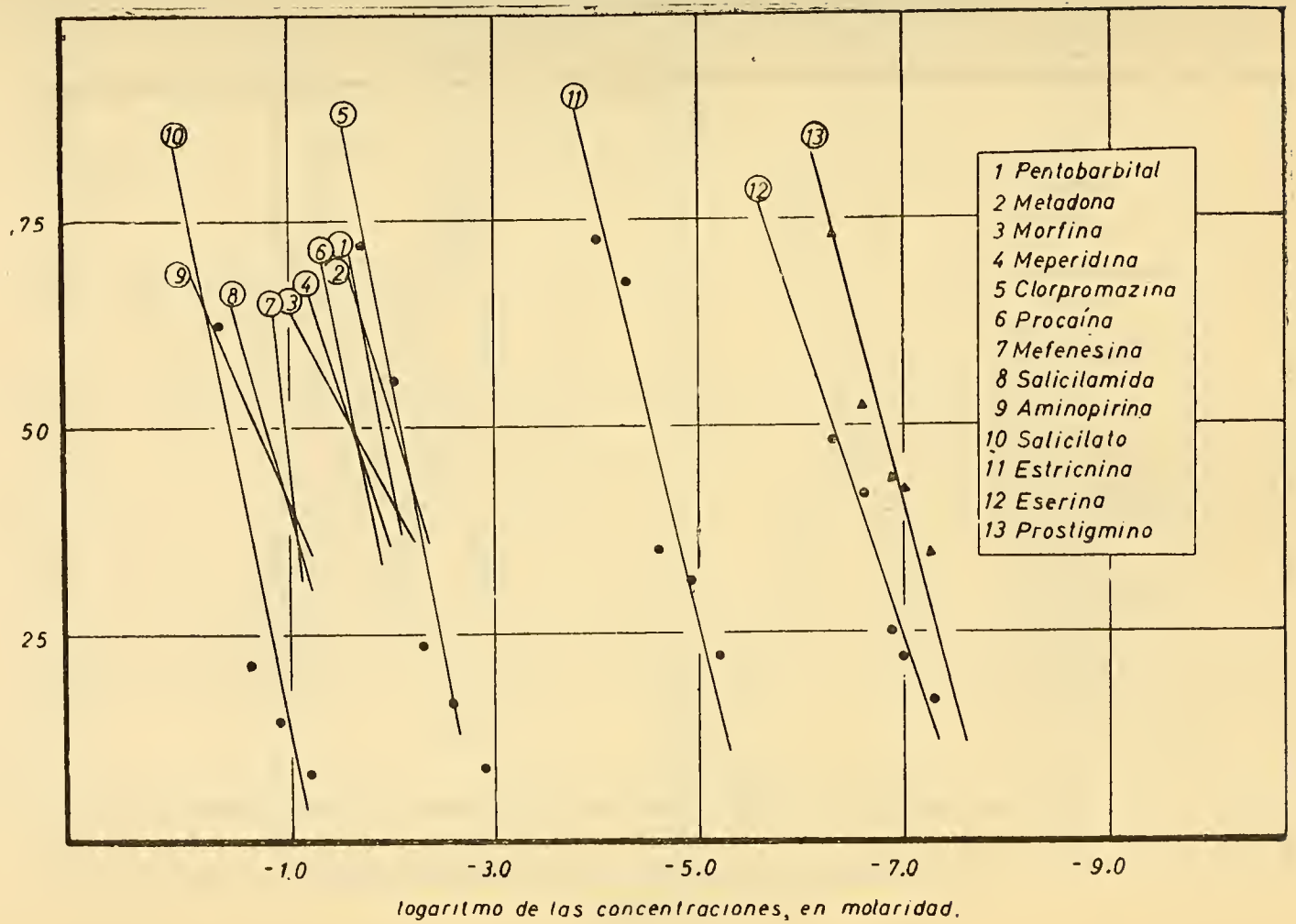
Inhibición de la hidrólisis en %
75
50
25
-1.0
-3.0
-5.0
-7.0
-9.0
logaritmo de las concentraciones, en molaridad.
1 Pentobarbital
2 Metadona
3 Morfina
4 Meperidina
5 Clorpromazina
6 Procaína
7 Mefenesina
8 Salicilamida
9 Aminopirina
10 Salicilato
11 Estricnina
12 Eserina
13 Prostigmina

GRAFICO Nº 2

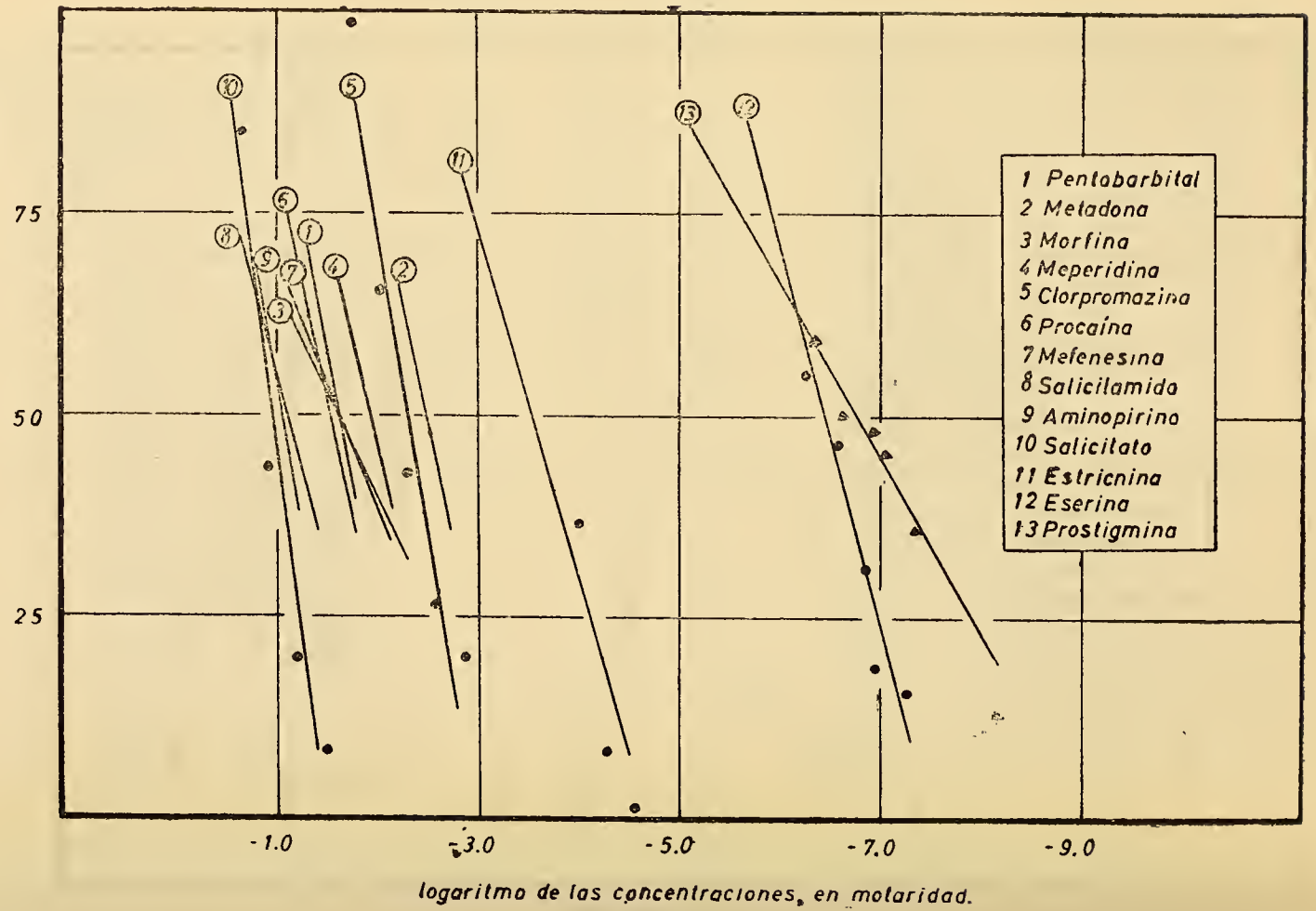
75
50
25
-1.0
-3.0
-5.0
-7.0
-9.0
logaritmo de las concentraciones, en molaridad.
Inhibición de la hidrólisis en %
1 Pentobarbital
2 Metadona
3 Morfina
4 Meperidina
5 Clorpromazina
6 Procaína
7 Mefenesina
8 Salicilamida
9 Aminopirina
10 Salicilato
11 Estricnina
12 Eserina
13 Prostigmina

GRAFICO Nº 3

Inhibición de la hidrólisis en %.

TABLA Nº 1

Comparación entre la DE 50 y la PI 50 correspondientes a las concentraciones "in vivo" e "in vitro", para homogenizado de cerebro, hemolizado de eritrocitos y suero sanguíneo.

FARMACO (1)	DE 50 (2)	PI 50 para homogenizado, hemolizado y suero (3)	Orden de relación in vivo - in vitro (4)
1) Pentobarbital sódico	0.000,36 M	0.011 M	1 : 30
		0.025 M	1 : 70
		0.02 M	1 : 55
2) Meperidina	0.000,045,8 M	0.025 M	1 : 545
		0.0125 M	1 : 270
		0.0125 M	1 : 270
3) Metadona	0.000,008,4 M	0.0096 M	1 : 1.140
		0.0035 M	1 : 420
		0.0019 M	1 : 225
4) Morfina	0.000,011 M	0.02 M	1 : 1.820
		0.026 M	1 : 2.360
		0.35 M	1 : 31.820
5) Mefenesina	0.000,5 M	0.0125 M	1 : 25
		0.0232 M	1 : 46
		0.0125 M	1 : 25
6) Clorpromazina	0.000,005,6 M	0.0083 M	1 : 1.480
		0.0055 M	1 : 980
		0.005 M	1 : 890
7) Salicil-amida	0.000,071 M	0.6 M	1 : 8.450
		0.0715 M	1 : 1.050
		0.1 M	1 : 1.410
8) Salicilato sódico	0.000,41 M	0.41 M	1 : 1.000
		0.106 M	1 : 250
		0.83 M	1 : 2.020
9) Aminopirina	0.000,285 M	0.2 M	1 : 700
		0.1 M	1 : 350
		0.13 M	1 : 460
10) Procaína	0.000,212 M	0.025 M	1 : 110
		0.033 M	1 : 150
		0.0125 M	1 : 60
11) Estricnina +	0.000,004 M	0.000.028.2 M	1 : 7
		0.000.264 M	1 : 66
		0.000.285 M	1 : 70
12) Eserina ++	0.000,099 M	0.000.000.48 M	1 : 0.0048
		0.000000.33 M	1 : 0.0033
		0.000.000.31 M	1 : 0.0031
13) Prostigmina ++	0.000.12 M	0.000.000.14 M	1 : 0.0011
		0.000.000.16 M	1 : 0.0013
		0.000.000.16 M	1 : 0.0013

\+ Dosis mínima mortal de estricnina en ratas (Farmacología Experimental - Guerra).

++ Eserina y Prostigmina corresponden a las dosis asociadas por nosotros a la Morfina en estudios analgesiométricos.

Con el objeto de agregar mayor información a los resultados anteriores, realizamos algunos controles del efecto anticolinoesterásico "in vivo" de Morfina, Prostigmina y Eserina. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

TABLA Nº 2

Estudio de la inhibición de la actividad colinoesterásica "in vivo" por la administración de MORFINA, PROSTIGMINA y ESERINA.

DROGA (1)	ENZIMO (2)	ORIGEN (3)	Inhibición (4)	DOSIS (5)
Morfina (23) *	Acetilcolinoesterasa	Homog. Cerebro Ratón	(—)	1, 2 y 4 DE 50
Morfina (15)	Pseudocolinoesterasa	Suero Perro	(—)	2 DE 50
Morfina (15)	Acetilcolinoesterasa	Hemolizado Eritr. Perro	(—)	2 DE 50
Morfina (15)	Acetilcolinoesterasa	Hemolizado Eritr. Cuy	(—)	2 DE 50
Morfina (15)	Pseudocolinoesterasa	Suero Cuy	(—)	2 DE 50
Prostigmina (17)	Acetilcolinoesterasa	Homog. Cerebro Ratón	(—)	1, 2 y 4 dosis asociadas (**)
Prostigmina (17)	Acetilcolinoesterasa	Hemolizodo Eritr. Perro	(—)	1 dosis asociada
Prostigmina (17)	Pseudocolinoesterasa	Suero Perro	(+)	1 dosis asociada
Eserina (6)	Acetilcolinoesterasa	Homog. Cerebro Ratón	(—)	I y 2 dosis asociadas
Eserina (18)	Acetilcolinoesterasa	Hemolizado Eritr. Perro	(—)	1 y 2 dosis asociadas
Eserina (18)	Pseudocolinoesterasa	Suero Perro	(—)	1 y 2 dosis asociadas

(*) Los números colocados entre paréntesis junto a los fármacos indican el número de experiencias realizadas.

(**) DOSIS ASOCIADAS fueron las dosis de Eserina y Prostigmina utilizadas en combinación con Morfina en nuestros trabajos analgesiométricos, e igual a 0.01 de la dosis de la Morfina.

DISCUSION DE RESULTADOS

Nos pareció conveniente antes de comenzar el estudio comparativo de la acción anticolinoesterásica de los fármacos analgésicos, establecer las condiciones óptimas para el estudio de los efectos inhibitorios, ya que no era posible asimilar los trabajos extranjeros, por estar éstos realizados en condiciones extremadamente variables.

Las comparaciones entre las potencias inhibitorias 50 (P. I. 50), determinadas por nosotros, se hicieron con las concentraciones teóricas que resultarían al diluír una dosis analgésica en un peso igual de suero fisiológico al del animal utilizado, estimación relativa, pues no tomamos en cuenta problemas de absorción, eliminación ni fijación y destrucción hepática.

En el caso de la estricnina se empleó la dosis letal mínima como referencia.

Nos parece importante discutir la falta de relación entre las concentraciones activas "in vitro" y las concentraciones máximas teóricas, que podrían alcanzarse "in vivo" a las dosis analgésicas.

Indudablemente, no pueden considerarse los analgésicos como substancias anticolinoesterásicas muy activas, ya que tenemos PI 50 para la morfina y amidona, del orden de 0.2 M a 0.01 M y 0.001 a 0.009 M, respectivamente, concentraciones sumamente altas si se las compara con las obtenidas para la eserina y prostigmina del orden de 0.000.000.3 y 0.000.000.1 M, respectivamente, substancias que son por lo tanto, 10.000 a 100.000 veces más activas que los analgésicos mencionados y desprovistos de acción analgésica.

Incluso un exicitante, la estricnina, es de 100 a 1.000 veces más activa, de modo que difícilmente podemos aceptar la escasa actividad anticolinoesterásica de estos fármacos como explicación de su acción analgésica. Por el contrario es más aceptable suponer que algunos síntomas de excitación, más o menos enmascarados por la acción depresora principal, que se observa al administrar algunos de estos analgésicos, se podrían atribuír a esta débil acción anticolinoesterásica.

Así mismo, es notorio que los fármacos realmente anticolinoesterásicos, como la prostigmina y la eserina, tienen una relación "in vivo - in vitro" de tipo 1 : 0.001 a 1 : 0.004 contra la relación 1 : 225 a 1 : 31.800 para la metadona y la morfina, hecho que destaca la diferencia de orden de acción anticolinoesterásica de ambos tipos de fármacos.

Hicimos algunos controles de la actividad anticolinoesterásica "in vivo" y sólo al inyectar prostigmina obtuvimos cierto grado de inhibición de la pseudocolinoesterasa sérica en el perro.

Estas experiencias nos invitan a dar por terminada esta investigación, pues nos parece que no existe correlación entre la acción analgésica y anticolinoesterásica de estos fármacos hecho que nos lleva a investigar la acción de los analgésicos sobre otros sistemas enzimáticos que permitan quizás explicar el mecanismo de acción de estos fármacos.

RESUMEN

Se determinan las condiciones óptimas de inhibición de las colinoesterasas, empleando eserina y prostigmina 10^{-7} M.

Se determina el PI 50 de un grupo de fármacos analgésicos y además de la estricnina.

Se establecen las relaciones entre la actividad "in vivo" e "in vitro".

No existe relación entre la actividad analgésica y anticolinoesterásica de los fármacos estudiados.

SUMMARY

The optimal conditions of inhibition for cholinoesterases are determined using eserine and prostigmine 10^{-7} M.

The PI 50 of a group of analgesic drugs and estricnine is determined.

Relation between "in vivo" and "in vitro" activity are stablished.

There is no relation between analgesic and anticholinoesterasic activity of the drugs we have studied.

BIBLIOGRAFIA

1.—LECANNELIER, R. S., BARDISA, U. L., TAMAYO, R. L., ABARCA, B. F.—Bol. Soc. Biol. de Concepción (Chile) *28:* 73, 1953.

2.—LECANNELIER, R. S., BARDISA, U. L., TAMAYO, R. L., GAME, G. I. REYES, R. R. Bol. Soc. Biol. de Concepción (Chile) *29:* 39 (1954).

3.—LECANNELIER, R. S., BARDISA, U. L., TAMAYO, R. L., AGUAYO, Y. U.—Bol. Soc. Biol. de Concepción (Chile) *30:* 3, 1955.

4.—BERGERET, R. I.—Tesis Químico Farmacéutico. Universidad de Concepción, 1952.

5.—LECANNELIER, R. S., BARDISA, U. L., TAMAYO, R. L., ORMEÑO, V. S.—Bol. Soc. Biol. de Concepción (Chile) - 30 : 19, 1955.

6.—JARA, R. H.—Tesis Químico Farmacéutico. Universidad de Concepción, 1956.

7.—CID, C. E.—Tesis Químico Farmacéutico. Universidad de Concepción, 1956. (en desarrollo).

8.—THOMPSON, R. H. S.—Brit. Med. Bull. *9:* 1953.

9.—AUGUSTINSSON, K.—Acta Physiol. Scand., 15: Sup. 52. 6 - 20 - 33 (1948).

10.—KOPPANYI, T., KARCZMAN, A., SCHEATZ, C.—J. Pharmacol. Ex. Therap. *107:* 482 - 500, 1953.

11.—KAMIJO, K., KOELLE, G. B.—J. Pharmacol. Ex. Therap. *105:* 349, 1953.

12.—WILSON, I., NACHMANSOHN, D.—Ion transport across membranes. 56-60, 1954.

13.—ORD, M. G., THOMPSON, R. H. S.—Biochem. J. - 51: 245 (1952).

14.—HYDE, J., BECKETT, S., CELEHORN, E.—Fed. Proc. *6:* 133, 1947.

15.—EADIE, G. S., BERNHEIM, F.—J. Biol. Chem. *146:* 85-93, 1942.

16.—BRAUER, R. W.—J. Pharmacol. Ex. Therap. *92:* 162-172, 1948.

17.—BERNHEIM, F., BERNHEIM, M. L. C.—J. Pharmacol. Ex. Therap. 57: 427-436, 1946.

18.—WRIGHT, C. I., SABINE, J. C.—Pharmacol. Ex. Therap. - *78:* 373-385, 1943.

19.—WIKLER, A.—J. Pharmacol. Ex. Therap. 100: 153, 1950.

20.—QUASTEL, D. H.—Brit. Med. Bull. - 9: 142, 1943.

21.—GOODMAN, L., GILMAN, A.—The Pharmacological Basis of Therapeutics. The Mac Millan Co., II Ed. 332, 1955.

22.—UMBREIT, W. W., Burris, R. H., STAUFFER, J. P.—Manometric techniques and tissues metabolism. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 136-1951.

23.—LEVIN, A., JANDORF, B.—J. Pharmacol. Exp. Therap. *113:* 206 (1955).

24.—LACEY, L. L.—Statiscal Methods in Experimentation. Mac Millan Co. N. Y. (1953).