

INFLUENCIA DE LA NALORFINA SOBRE EL METABOLISMO DE LA MORFINA (*)

Influence of nalorphine on morphine metabolism.

ANA PENNA-HERREROS, LUTSKE TAMPIER y JORGE MARDONES

Instituto de Farmacología, Escuela de Medicina de la Universidad de Chile, Casilla 12967, Santiago, Chile.

Recibido para su publicación el 24 de Febrero de 1965.

RESUMEN

Se ha estudiado mediante un procedimiento semicuantitativo de separación cromatográfica, la normorfina formada durante la incubación de morfina, de nalorfina o de ambos alcaloides juntos en presencia de homogeneizados de hígado de ratas, así como en el hígado de ratas que han recibido estos alcaloides por vía intraperitoneal.

Los resultados mostraron que la cantidad de normorfina formada en presencia de ambos alcaloides fue significativamente superior a la que sería de esperar según los resultados obtenidos con cada alcaloide aisladamente, tanto en los experimentos de incubación como los realizados en ratas.

La cantidad de nalorfina recuperada fue superior cuando se incubó en presencia de morfina y cuando se inyectó junto con morfina, que cuando se incubó o se inyectó sola.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho establecido que la morfina sufre en el organismo un proceso de desmetilación que da lugar a normorfina. March y Elliot (1) encontraron $C^{14}O_2$ en el aire espirado de ratas que habían recibido morfina marcada en el metilo y Elliot *et al.* (2) confirmaron estos resultados en seres humanos. Axelrod (3) pudo aislar normorfina en un incubado de morfina en presencia de microsomas del hígado de rata. Penna *et al.* (4) observaron que durante la incubación de morfina en presencia de homogeneizados de hígado y de cerebro de ratas aparecían dos sustancias diferentes de la morfina separables mediante cromatografía en papel, que dan reacción positiva con ninhidrina y yodoplatinato de potasio. Asimismo encontraron sustancias con las mismas características de migración cromatográfica en extractos de hígado y de cerebro de ratas que recibieron morfina por vía subcutánea. Una de estas sustancias tiene las

características cromatográficas de la normorfina (5). Misra, Mulé y Woods (6) encontraron normorfina en la orina de ratas que habían recibido morfina. Milthers pudo reconocer normorfina en las heces de ratas que habían recibido dosis crecientes de morfina por vía subcutánea (7) y en el cerebro de ratas a las cuales se había administrado morfina por vía venosa (8).

El hecho de que la formación de normorfina a partir de morfina en preparaciones de microsomas de hígado sea concomitante con liberación de formaldehído, y la forma en que se desmetilan otras drogas y hormonas ha hecho pensar (9, 10) que el mecanismo por el cual se forma la normorfina comienza con la oxidación del grupo amino terciario hasta aminóxido, sigue con la formación de un derivado carbinólico, el cual por hidrólisis posterior da origen a la amina secundaria y a formaldehído. Sin embargo, es posible que el metilo de la morfina sea también intercambiable con otros metilos. En efecto, Rapoport (citado por Way y Adler, 11), ha observado que la actividad específica de la morfina con C^{14} en el metilo, que administrada a seres hu-

(*) Esta investigación fue financiada por la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Proyecto Nº 59-2) y la Fundación Rockefeller (Grant Nº 63015) en un programa conjunto.

manos se recuperó en la orina, correspondía sólo a un 92% de la actividad específica de la inyectada, lo que indica que el 8% de las moléculas había intercambiado su metilo. Como no se dispone de una prueba cuantitativa que muestre que el aldehído fórmico liberado corresponde exactamente a la cantidad de morfina que se ha desmetilado, no es posible excluir a priori la existencia de otra vía de desmetilación.

Por otra parte, es un hecho demostrado que la nalorfina es desalquilada en el organismo (8, 12, 14) dando lugar a normorfina. El proceso metabólico de este fenómeno es desconocido y, según lo que nosotros sabemos, no existe un modelo semejante de desalilación de otras sustancias que permita imaginar el mecanismo probable de este proceso.

Ahora bien, Axelrod y Cochin (12) y Elison *et al.* (13) han observado que si se incuban en conjunto morfina y nalorfina, la cantidad de formaldehído que aparece durante el proceso de incubación es significativamente inferior a la que se produce cuando la morfina se incuba sola en presencia del mismo sistema enzimático. Esto significa que la nalorfina produciría una inhibición de la desmetilación oxidativa de la morfina, siempre que la velocidad con que ésta se produce estuviera traducida fielmente por la cantidad de aldehído fórmico liberada. Sin embargo, March y Elliot (1) han encontrado que si se incuba morfina marcada con C^{14} en el metilo, en presencia de cortes de hígado de ratas, no se observa diferencia en la actividad recuperada en el CO_2 en presencia o en ausencia de nalorfina.

Esta discrepancia nos ha movido a estudiar la cantidad de normorfina que se recupera en experimentos *in vitro* en que se incubaba morfina sola, nalorfina sola o ambos alcaloides juntos, en presencia de homogeneizados de hígado, así como a investigar la cantidad de normorfina que se consigue recuperar del hígado de animales que han recibido uno de estos alcaloides o ambos por vía intraperitoneal.

MATERIAL Y MÉTODO

Experimentos de incubación

Los experimentos *in vitro* se realizaron incubando homogeneizados de hígado de rata (diluidos con solución de NaCl al

0,9% hasta 5 ml por gramo de hígado) en presencia de clorhidrato de morfina (300 μ g en 20 ml) o de nalorfina (300 μ g en 20 ml) o de ambos alcaloides juntos (cada uno de ellos en la misma concentración). Para preparar los homogeneizados se utilizó un aparato de Potter Elvehjem, manteniendo el tubo sumergido en baño de hielo fundente. Antes de iniciar el experimento se burbujeó oxígeno durante 2 minutos y los tubos fueron cerrados herméticamente con tapa esmerilada. Cada muestra se dividió en 5 tubos, cada uno de 20 ml de homogeneizado, de los cuales 4 se incubaron en baño a 37°C, con agitación constante. El primer tubo fue testigo no incubado, y los siguientes fueron retirados de la incubación a los 15, 30, 60 y 120 minutos. El tiempo que medió entre la puesta en contacto del alcaloide con el homogeneizado y la iniciación de la incubación fue aproximadamente 5 minutos. La incubación se detuvo agregando 2 ml de ácido tricloroacético al 40% por cada 20 ml de homogeneizado. El precipitado se separó por centrifugación y el líquido sobrenadante se trató con 20 ml de éter de petróleo, se agitó durante 15 minutos en un agitador mecánico de muñeca y se eliminó la fracción éter de petróleo. El residuo acuoso se llevó a pH 9,6 con amoníaco concentrado, y se extrajo en dos oportunidades sucesivas con 15 ml de cloroformo-isopropanol en una proporción de 3:1. En este extracto se encuentran la morfina, la nalorfina y aproximadamente las dos terceras partes de la normorfina (15). Para extraer el resto de la normorfina se trató el residuo acuoso con 15 ml de una mezcla de alcohol isoamílico con dicloroetano en la proporción 1:4. Los extractos se evaporaron a sequedad en una corriente de aire frío y los residuos se tomaron con gotas del mismo solvente y se colocaron en papel Whatman N° 1, en dos puntos que recibían cada uno de ellos la mitad del extracto. Como solvente para correr la cromatografía se utilizó la mezcla piridina-acetato de etilo-agua en la proporción 23:76:16,5 que, de acuerdo con los resultados de Penna-Herreros (16), separan bien morfina, nalorfina y normorfina. Una vez terminada de correr la cromatografía (alrededor de 6 horas), los cromatogramas se dejaron secar hasta eliminar todo rastro de piridina. Se observaron después a la luz ultravioleta; uno

de ellos se reveló con yodoplatinato de potasio que da reacción azul con las aminas secundarias y terciarias, y el otro con ninhidrina al 0,5% en acetona que da reacción positiva con las aminas primarias y secundarias.

La determinación semicuantitativa se practicó mediante un densitómetro Kēlab A-B tipo 3-KP-52. en las manchas reveladas con yodoplatinato de potasio y hechas transparentes por sumersión en aceite de parafina. Se empleó un filtro color naranja. En cada caso se comparó la densidad de las manchas con los alcaloides correspondientes a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, y 300 μg . en cromatogramas paralelos, interpolando linealmente.

Experimentos en ratas.

En los experimentos in vivo se utilizaron ratas blancas machos adultas de la colonia del Instituto, que recibieron clorhidrato de morfina en dosis de 200 mg/kg o clorhidrato de nalorfina en la misma dosis o ambas drogas juntas (cada una en igual dosis) por vía intraperitoneal. A los animales tratados con morfina o nalorfina sola se les dió muerte a los 15 o a los 60 minutos. Algunas de las ratas que recibieron la asociación de alcaloides murieron espontáneamente, en estado convulsivo, entre 15 y 35 minutos después de la inyección. Inmediatamente después de muerto el animal se extrajo el hígado y se homogeneizó en la forma señalada para los experimentos de incubación. La extracción de los alcaloides, la separación cromatográfica y la determinación semi-

cuantitativa se realizó en la forma antes señalada.

Las drogas utilizadas fueron del siguiente origen: Normorfina Hemimetanolato y Nalorfina Clorhidrato, Merck Sharp and Dohme, y Morfina Clorhidrato, May and Baker.

RESULTADOS

1. *Experimentos de incubación.*

Las cantidades de alcaloides originales recuperados durante la incubación en presencia de homogeneizados de hígado, aparecen resumidas en la Tabla I. En ella puede apreciarse que se recuperó en general alrededor de 1/4 de la cantidad agregada y que la proporción recuperada no se modificó significativamente durante la incubación, salvo los experimentos con ambos alcaloides, donde la nalorfina recuperada en el momento inicial fue notablemente mayor que la recuperada en los distintos momentos de la incubación.

En la Tabla II aparece la normorfina encontrada en los distintos tiempos de incubación para cada experimento, expresada en porcentaje del alcaloide original agregado. En ella se observa que la cantidad de normorfina que se consiguió extraer cuando se incubaron homogeneizados de hígado en presencia de morfina fue bastante escasa y varió entre el 0 y el 8%, y que no se observó una modificación significativa durante la incubación.

Llama la atención que en algunos experimentos se ha encontrado normorfina antes de iniciarse la incubación, pero conviene aclarar que transcurren aproximadamente 5 minutos entre la agregación

TABLA I

Porcentaje de alcaloides recuperados durante la incubación de morfina, nalorfina o ambas en presencia de homogeneizados de hígado de rata (cada cifra representa la media aritmética de 3 experimentos \pm su error típico).

Alcaloide agregado	Alcaloide recuperado	Tiempo de incubación (minutos)				
		0	15	30	60	120
Morfina	Morfina	35 \pm 7	28 \pm 4	39 \pm 9	35 \pm 6	32 \pm 7
Nalorfina	Nalorfina	35 \pm 14	28 \pm 11	45 \pm 9	30 \pm 4	41 \pm 7
Morfina	Morfina	22 \pm 1	35 \pm 4	28 \pm 7	40 \pm 8	37 \pm 0
+ Nalorfina	Nalorfina	48 \pm 5	22 \pm 7	23 \pm 7	23 \pm 4	24 \pm 7

TABLA II

Normorfina obtenida durante la incubación de morfina, nalorfina o de ambos alcaloides en presencia de homogeneizados de hígado de rata, en porcentaje del alcaloide o suma de alcaloides agregados.

Tiempo de incubación minutos	Exp. Nº	Morfina	Nalorfina	Morfina + Nalorfina
0	1	1	1	1
	2	0	0	1
	3	4	4	2
15	1	3	3	9
	2	0	3	2
	3	0	1	1
30	1	0	11	12
	2	0	9	14
	3	1	13	9
60	1	1	2	12
	2	8	3	7
	3	1	8	7
120	1	0	8	13
	2	1	1	12
	3	0	2	7

de los alcaloides al homogeneizado y el momento de iniciar la incubación y que durante este lapso el medio se encuentra a una temperatura que corresponde a la que se obtiene cuando el homogeneizado de hígado se extrae del baño de hielo.

Las cantidades de normorfina recuperadas durante la incubación de nalorfina aparecen mayores que las recuperadas en los experimentos en que se incubó morfina, observándose una cúspide alrededor de los 30 minutos y una tendencia posterior a disminuir.

La proporción de normorfina encontrada en los experimentos en que se incu-

baron homogeneizados de hígado en presencia de morfina y nalorfina juntos, no difirió en los primeros 30 minutos de la que se encontró en los experimentos en que se incubó nalorfina; pero hubo diferencias entre los 60 y 120 minutos de incubación, período en el cual la cantidad de normorfina encontrada en los incubados de ambos alcaloides juntos se mantuvo elevada, mientras que había descendido en los experimentos en que se incubó sólo nalorfina. El estudio de la significación de esta diferencia mediante la prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon (17), que se empleó teniendo en cuenta que el procedimiento utilizado para determinar la normorfina fue sólo semicuantitativo, mostró las cifras correspondientes a la proporción de normorfina encontrada cuando se incubó un solo alcaloide, sea morfina o nalorfina, por una parte, y las correspondientes a los experimentos con los dos alcaloides juntos, por la otra, ocuparon rangos significativamente diferentes ($2P < 0,01$).

2. Experimentos en ratas.

La proporción de los alcaloides administrados a las ratas, que se obtuvo del hígado, aparece resumida en la Tabla III. En ella puede apreciarse que la proporción de morfina obtenida 15 minutos después de la inyección, varió entre 9 y 38 por mil, mientras que a los 60 minutos fue inferior al 2 por mil. En el caso de la nalorfina sucedió algo semejante, aún cuando en 2 casos en que el animal fue muerto a los 15 minutos no se obtuvo nalorfina y la proporción que se recuperó en los experimentos en que se dió muerte

TABLA III

Alcaloides encontrados en el hígado de ratas que recibieron morfina, nalorfina o ambas, por vía intraperitoneal en diversos lapsos después de la inyección (en μg por mg administrado).

Alcaloide administrado	Alcaloide recuperado	M u e r t e Número de casos	M u e r t e p r o v o c a d a		Muerte espontánea *			
			A los 15 min. (margen)	Número de casos 60 min. (margen)	15 min.	20 min.	35 min.	
Morfina	Morfina	4	9 — 38	3	0,1 — 1,6			
Nalorfina	Nalorfina	4	0 — 3	3	0 — 0,1			
Nalorfina +	Nalorfina + Morfina	3	0 — 9			20	19	8
Morfina		3	0 — 4			30	40	19

* Mueren espontáneamente en convulsiones en los tiempos que se indican.

al animal a los 60 minutos fue despreciable.

Cuando se administró simultáneamente morfina y nalorfina por vía intraperitoneal y las ratas se sacrificaron 15 minutos después, la proporción de morfina y de nalorfina recuperada no difirió de la obtenida cuando se inyectó un solo alcaloide. Tampoco en las ratas que murieron en medio de convulsiones 15, 20 ó 35 minutos después de la inyección, la proporción de morfina recuperada difirió de la obtenida cuando se administró morfina sola, mientras que la de morfina obtenida fue claramente mayor. La aplicación de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon en la forma antes señalada mostró que el valor de $2P$ en la comparación de morfina recuperada de ratas que recibieron este alcaloide solo o con nalorfina, fue $> 0,1$ y el correspondiente a la nalorfina recuperada de las ratas que la recibieron sola o acompañada de morfina fue $< 0,1$.

En la Tabla IV, aparecen las proporciones de alcaloides administradas que se encontraron como normorfina en el hígado. En ella puede apreciarse que cuando se administró morfina o nalorfina solas, la proporción recuperada como normorfina correspondió a menos de 2 μg por cada

mg de alcaloide inyectado, sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos a los cuales se dió muerte 15 ó 60 minutos después de la inyección. La proporción recuperada como normorfina en los casos en que se administraron morfina y nalorfina juntos, fue superior a la correspondiente a los experimentos en que se administró uno solo de estos alcaloides. La prueba de la suma de los rangos de Wilcoxon mostró que esta diferencia es significativa con $2P < 0,1$.

DISCUSIÓN

Los resultados representan una confirmación de que se forma normorfina a partir de morfina y de nalorfina tanto en la rata entera como en experimentos de incubación de homogeneizados de hígado en presencia de estos alcaloides. En este sentido nuestros resultados difieren algo de los observados por March y Elliot (1) quienes no encontraron $C^{14}O_2$ cuando incubaron morfina marcada con C^{14} en el metilo en presencia de homogeneizados de hígado, pero sí la encontraron cuando esta incubación se hacía en presencia de cortes de este órgano. Es posible que la diferencia entre nuestros resultados y los de March y Elliot se deba a que los homogeneizados de hígado no son capaces de llevar el HCHO hasta CO_2 , lo que estaría de acuerdo con la observación de Axelrod y Cochin (12) quienes consiguieron detener la reacción al estado de formaldehído, incubando morfina en presencia de microsomas de hígado.

Nuestros resultados confirman también que el hígado es capaz de desalquilar la nalorfina. La observación de Johannesson y Milthers (18) de que se encontró mayor cantidad de normorfina en el cerebro de ratas que recibieron simultáneamente dosis altas de nalorfina y de morfina que cuando se administraron los mismos alcaloides aisladamente, es concordante con nuestros resultados obtenidos tanto en los experimentos de incubación, como en los extractos de hígado de ratas que habían recibido estos alcaloides por vía intraperitoneal. La mayor proporción recuperada como normorfina en este caso podría ser explicada si se acepta que los sistemas enzimáticos de desalquilación de uno y de otro alcaloide son diferentes y que, por otra parte, morfina y nalorfina compiten por un receptor común. En estas

TABLA IV

Normorfina encontrada en el hígado de ratas que han recibido morfina, nalorfina o ambos alcaloides por vía intraperitoneal, en diversos lapsos después de la inyección (en μg por mg de alcaloide o suma de alcaloides administrados). Cada cifra corresponde a un experimento diferente.

	Morfina	Nalorfina	Morfina + Nalorfina
Muerte provocada			
a los 15 minutos	0,05	0,05	0,4
	0,05	0,8	1,0
	0,07	1,0	1,3
	1,00	1,2	—
a los 60 minutos	0,05	0,2	—
	0,05	0,5	—
	0,8	0,7	—
Muerte espontánea *			
a los 15 minutos	—	—	2,0
a los 20 minutos	—	—	3,3
a los 35 minutos	—	—	3,2

* Mueren espontáneamente en convulsiones.

circunstancias sería de esperar que estando ambos alcaloides juntos, la cantidad disponible de cada uno de ellos para los sistemas de desalquilación sería mayor. En favor de esta idea puede aducirse el hecho de que la recuperación de la nalorfina por los métodos de extracción que nosotros hemos utilizado fue mayor en el hígado de las ratas que habían recibido nalorfina y morfina que en aquellas que recibieron nalorfina en cantidades equivalentes. Estos resultados concuerdan con lo observado por Johannesson y Milthers (18) y por Johannesson (19) en el cerebro de ratas.

No puede eliminarse a priori la posibilidad de que la presencia de morfina inhiba las etapas siguientes del metabolismo de la normorfina y, por consiguiente, la cantidad acumulada para una misma velocidad de formación fuera mayor. En este sentido hablaría el hecho de que la concentración de normorfina que se encontró a los 120 minutos de incubación fue significativamente más alta cuando se incubó en presencia de morfina y nalorfina que cuando estaba presente sólo morfina o nalorfina.

Conviene señalar que nuestros experimentos no nos permiten saber si la mayor cantidad de normorfina formada en presencia de ambos alcaloides proviene del aumento de la formación a partir de uno o de otro o de ambos.

Es evidente que todas estas consideraciones son válidas en cuanto aceptemos que es realmente normorfina la sustancia que tiene el mismo Rf que ella en el solvente utilizado y da reacción positiva con yodoplatinato y con ninhidrina.

Es difícil conciliar nuestros resultados con la observación de Axelrod (12) y de Elison (13) que la presencia de nalorfina inhibe la formación de formaldehído a partir de la morfina, si se tiene en cuenta que el sistema enzimático que desalquila a la nalorfina se encuentra también en esa preparación. Sin embargo, estos resultados parecerían concordantes si se aceptara que la normorfina formada en las circunstancias de nuestros experimentos proviene fundamentalmente de la nalorfina y que el efecto de la morfina en este proceso sería el de inhibir alguna etapa metabólica de la normorfina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Laboratorios Merck Sharp and Dohme Inc. por haber proporcionado la Normorfina y Nalorfina utilizada en este trabajo.

SUMMARY

The amount of normorphine appearing during the incubation of morphine, nalorphine, or both alkaloids, in the presence of rat liver homogenates, was studied.

Normorphine was estimated by a semi-quantitative method as follows: extraction with chloroform : isopropyl alcohol (3:1) pH 9.6 and ethylene dichloride : isoamyl alcohol (1:4) pH 9.6. Chromatographic separation in Whatman paper N° 1 with pyridine : ethyl acetate : water (23:76:16.5); development by spraying potassium iodoplatinate and densitometric reading of the spots. Normorphine was identified by the Rf 0.60 and the positive reaction with iodoplatinate and ninhydrin. Morphine and nalorphine spots (Rf 0.74 and 0.86 resp.) were estimated also densitometrically in the same chromatograms.

Since the method employed for the estimation of the alkaloids was only semi-quantitative, the statistical analysis of the results was performed by the Wilcoxon's ranking sum test.

The experiments showed that normorphine resulting during the incubation of morphine and nalorphine together, after 60 and 120 minutes, was significantly higher ($2P < 0.01$) than the expected for each single alkaloid (Table II).

No significant changes in the recovering of morphine or nalorphine during incubation, were observed (Table I).

In other experimental series the amount of normorphine obtained from the liver of rats receiving morphine, nalorphine or both alkaloids, was estimated 15 to 60 minutes after the injection. The same method was employed for the estimation of alkaloids. The amount of normorphine found in the liver was significantly higher ($2 < 0.01$) when both alkaloids were administered together, than the expected for each single alkaloid (Table IV).

The amounts of recovered morphine and nalorphine decreased with the time elapsed between the injection and the extrac-

tion of the liver. The proportion of nalorphine was higher ($2P < 0.1$) when both alkaloids were administered together than when only nalorphine was injected.

REFERENCIAS

- 1.—MARCH, C. H. y ELLIOT, H. W. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **86**:494, 1954.
- 2.—ELLIOT, H. W., TOLBERT, B. M., ADLER, T. K. y ANDERSON, H. H. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **85**:77, 1954.
- 3.—AXELROD, J. — J. Pharmacol. Exptl. Therap. **117**: 322, 1956.
- 4.—PENNA, A., ARÉVALO, L., FERNÁNDEZ, I., NAVIA, E. y MARDONES, J. — XXI Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas, Resúmenes de comunicaciones, Buenos Aires, 1959, pág. 209.
- 5.—PENNA-HERREROS, A. — (Datos no publicados).
- 6.—MISRA, A. L., MULÉ, S. J. y WOODS, S. A. — J. Pharmacol. Exptl. Therap. **132**:317, 1961.
- 7.—MILTHERS, K. — Acta pharmacol. toxicol. **19**:149, 1962.
- 8.—MILTHERS, K. — Acta pharmacol. toxicol. **19**:235, 1962.
- 9.—FISH, M. S., JOHNSON, N. M., LAWRENCE, E. P. y HORNING, E. C. — Biochim. biophys. Acta **18**:564, 1955.
- 10.—FISH, M. S., SWEELEY, C. C. JOHNSON, N. M., LAWRENCE, E. P. y HORNING, E. C. — Biochim. biophys. Acta **21**:196, 1956.
- 11.—RAPOPORT, citado por WAY, E. L. y ADLER, T. K. — Pharmacol. Rev. **12**:383, 1960.
- 12.—AXELROD, J. y COCHIN, J. — J. Pharmacol. Exptl. Therap. **121**:107, 1957.
- 13.—ELISON, C., ELLIOTT, H. W., LOCCK, M. y RAPOPORT, H. — J. Med. Chem. **6**:237, 1963.
- 14.—PENNA-HERREROS, A., MORAGA, E. y MARDONES, J. — IV Reunión Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Ribeirão Preto, Brasil, Resúmenes de trabajos, 1961, pág. 62.
- 15.—MILTHERS, K. — Acta pharmacol. toxicol. **18**:199, 1961.
- 16.—PENNA-HERREROS, A. — J. Chromatog. **14**: 536, 1964.
- 17.—WILCOXON, F. — Biometrics **1**:80, 1945.
- 18.—JÓHANNESSEN, T. y MILTHERS, K. — Acta pharmacol. toxicol. **20**:80, 1963.
- 19.—JÓHANNESSEN, T. — Acta pharmacol. toxicol. **20**:281, 1963.