

## Estudios de farmacología cuantitativa

### I. - Curvas de la toxicidad de la dolantina

Por MANUEL LITTER y ALBERTO TORINO

(TRABAJO EFECTUADO EN EL INSTITUTO BACTERIOLÓGICO « DR. CARLOS G. MALBRÁN »)

La evolución actual de la Farmacología, que ya ha permitido reunir una serie de conocimientos en lo que respecta a la acción de los fármacos desde el punto de vista cualitativo, tiende hacia el aspecto cuantitativo.

Si bien es cierto que los métodos de análisis físico, químico y físico-químico, han permitido realizar un gran adelanto en este sentido, existe sin embargo una gran cantidad de sustancias que, por no constituir especies químicas definidas o porque no son susceptibles de ser analizadas por algunos de estos métodos en ese sentido cuantitativo, deben necesariamente ser objeto de investigaciones especiales que se involucren dentro de los métodos biológicos.

Toda sustancia, al actuar sobre el organismo o un órgano aislado, provoca una reacción que es la respuesta adecuada a su actividad farmacodinámica. En general se puede aceptar que tal respuesta es proporcional en su intensidad a la dosis de la droga actuante.

Es sabido que las reacciones biológicas se pueden dividir en dos grandes grupos: *a*) las cuantitativas que son aquellas en las que el efecto puede ser objeto de una mensuración; *b*) las cualitativas que comprenden aquellas en las que el efecto se reduce a una respuesta o a la ausencia de la misma, es decir respuesta todo o nada, también calificada por Gaddum (1933), como respuesta « cuantitativa »; este criterio se aplica con mucha frecuencia en las curvas de mortalidad de una droga determinada, en las que el porcentaje de animales muertos se relaciona con las distintas dosis suministradas.

Trean (1927) ha demostrado que para cada sustancia y para cada especie animal existe una curva característica de mortalidad,

cuando se relaciona la mortalidad observada con las dosis suministradas, y qué dicha curva afecta la forma de una S. Además estableció qué la dosis mortal (o letal) 50 % (DL 50), que corresponde a la parte de la curva que tiene mayor pendiente, es la más adecuada por su exactitud para indicar la toxicidad de una substancia y servir para efectuar deducciones comparativas.

Gaddum (1933) sostiene que la curva característica de Trevan (1927) no es más que una curva de distribución de frecuencia integrada y si se consideran los logaritmos de las dosis individuales, en vez de las dosis mismas, dichos logaritmos están distribuidos normalmente con respecto al correspondiente a la dosis mortal 50 % (DL 50). Este autor ha utilizado la transformación de los valores correspondientes a la curva normal de frecuencia integrada en los de la curva de distribución normal de frecuencia, tomando como unidad la desviación standard de dicha distribución. En esta forma, si se inscriben los resultados en un sistema de coordenadas en el que la abscisa representa el logaritmo de la dosis y la ordenada la *desviación equivalente normal*, se obtiene una línea que se aproxima mucho a la recta. Esta línea recta puede también calcularse algebraicamente y se llama *línea de regresión*.

En un trabajo anterior (Torino y Litter, 1941), al ocuparnos de la toxicidad comparativa del salicilato de sodio extractivo y sintético, hemos establecido la curva característica de dicha especie química en ratones blancos por vía intravenosa, y calculado la línea de regresión.

Nos ocuparemos en el presente trabajo de la toxicidad de la Dolantina (éster etílico del ácido 1-metil-4-fenil-piperidin-4-carboxílico); esta substancia fue descubierta por Eisleb y Schaumann (1939) en el año citado y se utiliza ampliamente en terapéutica por sus acciones antiespasmódica y analgésica. Los trabajos que estudian su acción farmacológica no son muy numerosos y en general se limitan al reconocimiento de los efectos sobre los diversos aparatos de la economía, pasando un poco por alto lo que respecta a su toxicidad en animales.

Así Eisleb y Schaumann (1939) fijan la « dosis letal » (sin especificar el alcance de esta designación) en los ratones, por inyección subcutánea, en 150 mg. por Kg. de peso. Schaumann (1940) no especifica cual es la dosis mortal para el ratón, pero del examen de sus datos se deduce que la dosis mortal 50 % (DL 50), cuando se inyecta la droga por vía intravenosa, es algo superior a 60 mg

por Kg. de peso, mientras que por vía subcutánea es de 150 mg. por Kg.

Gruber, Ross Hart y Gruber (1941) indican la dosis mortal 50 %, para el ratón y por vía intraperitoneal y bucal 147 y 221 mg. por Kg. de peso, respectivamente.

Por su parte Carratalá, Loyarte y Vucetich (1942) determinaron la dosis mínima mortal en ratones por vía intraperitoneal y subcutánea, fijándola en 152 y 160 mg. por Kg., respectivamente.

Hacemos notar que en la bibliografía mencionada, existen otros datos referentes a la toxicidad en otras especies animales (conejos, cobayos, ratas, perros) que no transcribimos, ya que en el estudio nos ocuparemos solamente de la toxicidad en ratones.

Como puede verse en las publicaciones aludidas, los datos experimentales se refieren a escasa cantidad de animales utilizados y en muchos casos se expresa la toxicidad referida a « dosis mortal » o « dosis mínima mortal », que carecen de significación farmacológica, según ya ha sido establecido por Trévan (1927), Gaddum (1933) y Burn (1937), quienes han demostrado que la dosis mortal 50 % (DL 50) es la que posee mayor significado y es la que utilizan la mayoría de los farmacólogos actuales.

Este trabajo tiene por objeto construir la curva característica de mortalidad de la Dolantina para el ratón blanco, calcular la línea de regresión estableciendo además la dosis mortal 50 % (DL 50), acumulando así material experimental obtenido con gran número de animales y en condiciones suficientemente constantes como para servir de base a estudios estadísticos relativos a reacciones cualitativas.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado ratones blancos provenientes del criadero del Instituto sometidos a la alimentación corriente utilizada en el mismo (Torino, Litter y Litter, 1940), sin ayuno previo. Las inyecciones se hicieron por vía intravenosa según la técnica indicada en un trabajo anterior (Torino y Litter, 1941), empleando una jeringa de tuberculina de 0,5 ml de capacidad, muy bien calibrada. El tiempo de inyección se mantuvo prácticamente constante, 10 segundos aproximadamente.

Se empleó una solución acuosa de Dolantina al 4 ‰, preparada con la droga pura, en el momento de cada experiencia; todo el material de medida utilizado, fue el mismo en todos los ensayos.

La concentración de la solución de Dolantina, se mantuvo constante en todas las experiencias, variándose la dosis de acuerdo con el peso de los ratones, estimado con un error de  $\pm 1$  g, dicho peso varió entre 11 y 20 gramos.

Como experiencia preliminar se inyectaron dosis crecientes de Dolantina (de 5 a 70 mg por kg de peso), para determinar aproximadamente aquellas que convenía utilizar; en este ensayo se utilizaron 5 ratones por dosis (11 lotes).

Con dosis de 5 y 10 mg no se observaron efectos visibles; las dosis de 20 y 30 mg, produjeron casi inmediatamente una intensa excitación motora y el fenómeno caudal de Straub; dosis mayores produjeron convulsiones tónico-clónicas, y dosis más elevadas aún, la muerte. En esta forma se pudieron localizar aproximadamente las dosis mortales 0 y 100 % entre 30 y 60 mg, respectivamente.

Se determinó luego en 4 días distintos, la mortalidad obtenida inyectando por vía intravenosa, las dosis siguientes: 35, 40, 45, 50, 55 y 60 mg por kg; en la cuarta experiencia se agregó la dosis 30 mg por kg. Se observó la mortalidad inmediata (dentro de los 5 minutos), a la media hora, 1, 2, 24 y 48 horas subsiguientes a la inyección. Para los cálculos, se tomó en consideración la mortalidad a la hora, porque los resultados no variaron sensiblemente después de este lapso. Cada lote constaba de 30 animales, cifra que según demostró Trevan (1927), es suficiente en ensayos cualitativos, para un grado de exactitud satisfactorio. En total se inyectaron 805 ratones.

En todas las experiencias, la temperatura ambiente varió dentro de límites muy escasos (22 a 26°C), aún cuando la experiencia preliminar se realizó en el mes de marzo, las dos siguientes en abril, la 4ª en mayo y la 5ª en julio, es decir en otoño las primeras y en invierno las últimas.

## RESULTADOS

A) CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA CARACTERÍSTICA DE TOXICIDAD DE LA DOLANTINA. — La tabla I, muestra la mortalidad obtenida con las diversas dosis en las condiciones antes establecidas y expresadas en porcentajes de mortalidad.

TABLA I

Dosis por kg de ratón mg	Porcentaje de mortalidad			
	1er. día	2º día	3er. día	4º día
30	—	—	—	6,7
35	10,0	13,3	13,3	33,3
40	3,3	6,7	33,3	50,0
45	40,0	46,7	66,7	50,0
50	43,3	56,6	76,7	73,3
55	63,3	80,0	83,3	63,3
60	66,7	76,6	100,0	80,0

Con estas cifras se han construido las curvas individuales (figura 1), determinando luego la dosis mortal 50 % (DL 50), correspondientes a cada día, hallándose las siguientes cifras.

1er. día (10- IV-42): DL 50 = 50,0 mg/Kg

2º día (29- IV-42): DL 50 = 47,5 mg/Kg

3er. día (15- V-42): DL 50 = 42,5 mg/Kg

4º día (17-VII-42): DL 50 = 43,0 mg/Kg

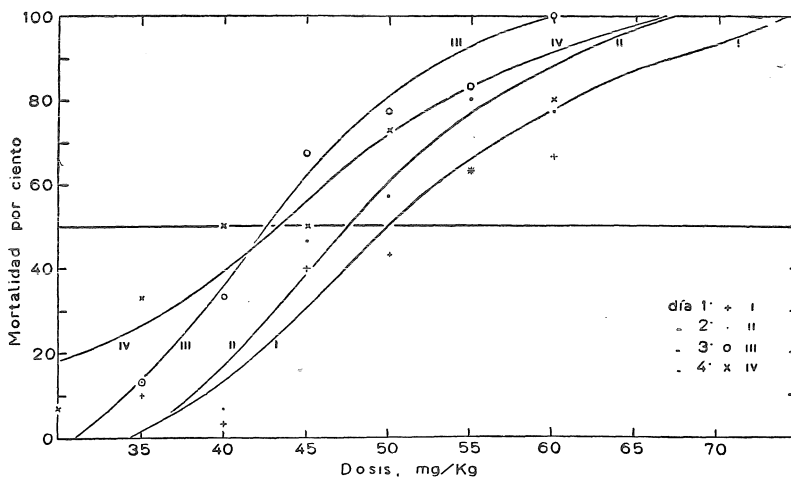


FIG. 1. — Curvas individuales de mortalidad.

Siguiendo a Burn (1937), se han recalculado las dosis que producen las mortalidades de la tabla I, en relación a la dosis mortal 50 %, que se toma como igual a 1.00. Estos datos están consignados en la tabla II.

TABLA II

1er. día DL 50 = 50,0		2º día DL 50 = 47,5		3er. día DL 50 = 42,5		4º día DL 50 = 43,0	
Dosis	Mortalidad	Dosis	Mortalidad	Dosis	Mortalidad	Dosis	Mortalidad
—	—	—	—	—	—	0,70	6,7
0,70	10,0	0,74	13,3	0,82	13,3	0,81	33,3
0,80	3,3	0,84	6,7	0,94	33,3	0,93	50,0
0,90	40,0	0,95	46,7	1,06	66,7	1,05	50,0
1,00	43,3	1,05	56,6	1,18	76,7	1,16	73,3
1,10	63,3	1,16	80,0	1,27	83,3	1,28	63,3
1,20	66,7	1,26	76,6	1,41	100,0	1,40	80,0

Con estos datos se ha construido la curva de la figura 2, que es la curva característica de toxicidad de la dolantina para el ratón blanco.

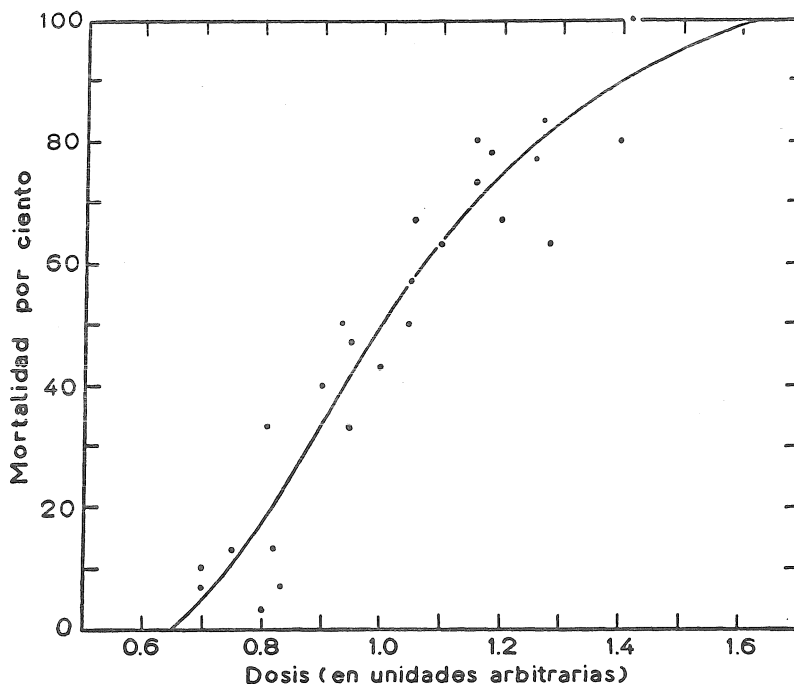


Fig. 2. — Curva característica de toxicidad de la Dolantina

B) LÍNEA DE REGRESIÓN. — 1º *Determinación gráfica.* — La tabla III muestra las desviaciones equivalentes normales (D.E.N.), correspondientes a los porcentajes de mortalidad, referidas a los

TABLA III

Dosis × kg de peso mg	Logaritmo de la dosis	1er. día			2º día			3er. día			4º día		
		Mort. %	D. E. N.	Ponderación (B)	Mort. %	D. E. N.	Ponderación (B)	Mort. %	D. E. N.	Ponderación (B)	Mort. %	D. E. N.	Ponderación (B)
30	1,47712	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,7	— 1,50	0,26
35	1,54407	10,0	— 1,28	0,34	13,3	— 1,09	0,40	13,3	— 1,09	0,40	33,3	— 0,43	0,60
40	1,60206	3,3	— 1,84	0,16	6,7	— 1,50	0,26	33,3	— 0,43	0,60	50,0	0,00	0,64
45	1,65321	40,0	— 0,26	0,62	46,7	— 0,08	0,64	66,7	0,43	0,60	50,0	0,00	0,64
50	1,69897	43,3	— 0,16	0,63	56,6	0,17	0,63	76,7	0,73	0,53	73,3	0,62	0,55
55	1,74036	63,3	0,34	0,62	80,0	0,84	0,49	83,3	0,98	0,45	63,3	0,34	0,61
60	1,77815	66,7	0,43	0,60	76,7	0,73	0,53	100,0	3,00	0,00	80,0	0,84	0,49

logaritmos de las dosis respectivas. Las desviaciones equivalentes normales, han sido obtenidas con el nomograma de Gaddum (1933). Además en columna separada, figura la ponderación B, sobre cuyo significado volveremos más adelante.

Con estos valores se han trazado las líneas de regresión individuales (figura 3). Se ha determinado en cada caso  $\lambda$  (designación

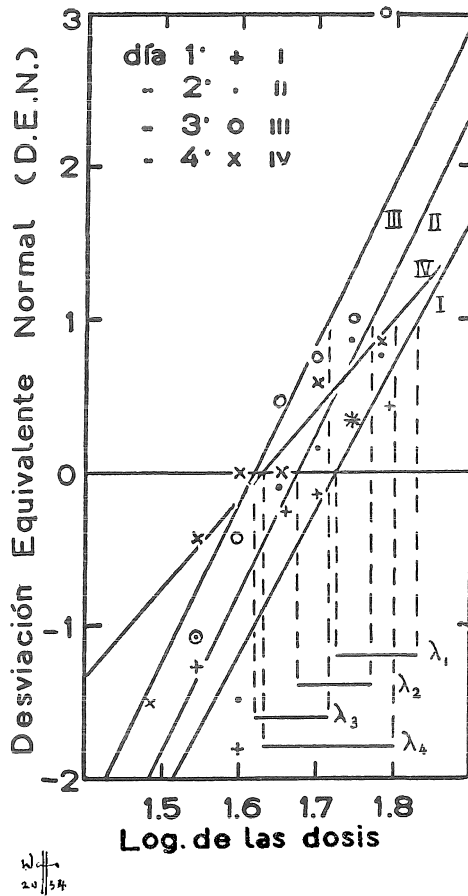


Fig. 3. — Líneas de regresión individuales.

usada por Gaddum, 1933) que es el segmento de la abscisa correspondiente a la ordenada 1,0, hasta su intersección con la línea de regresión; la pendiente  $b$  de cada línea de regresión (la inversa de  $\lambda$ ), es la relación entre la ordenada 1,0 y dicho segmento de abscisa; la ecuación correspondiente a las líneas inscriptas, se ha determinado de acuerdo a los métodos corrientes (Daniels 1934);



por último se determinó por la inspección directa de cada gráfica los logaritmos de las dosis correspondientes a las desviaciones equivalentes normales 0.0 (mortalidad 50 %); las dosis mortales 50 % (DL 50), son los antilogaritmos respectivos. Con estos valores se ha confeccionado la tabla IV.

TABLA IV

	$\lambda$	$b$	Línea de regresión	Log. DL 50	DL 50 mg/kg
1er. día .....	0,105	9,52	$y = 9,52 x - 16,37$	1,723	55,3
2º día .....	0,105	9,52	$y = 9,52 x - 16,37$	1,675	44,7
3er. día .....	0,093	10,75	$y = 10,75 x - 17,41$	1,620	44,2
4º día .....	0,150	6,67	$y = 6,67 x - 10,89$	1,632	44,3

Hemos recalculado las dosis expresadas en logaritmos, que producen las respectivas mortalidades (expresadas como desviación equivalente normal), en relación al logaritmo de la dosis mortal 50 % que se toma igual a 1,0 (tabla V).

TABLA V

1er. día Log DL 50 = 1,723		2º día Log. DL 50 = 1,675		3er. día Log DL 50 = 1,620		4º día Log DL 50 = 1,632	
Log dosis	D. E. N.	Log dosis	D. E. N.	Log dosis	D. E. N.	Log dosis	D. E. N.
Log DL 50		Log DL 50		Log DL 50		Log DL 50	
—	—	—	—	—	—	0,91	—1,50
0,89	—1,28	0,92	—1,09	0,95	—1,09	0,95	—0,43
0,93	—1,84	0,96	—1,50	0,99	—0,43	0,98	0,00
0,96	—0,26	0,99	—0,08	1,02	0,43	1,01	0,00
0,99	—0,16	1,01	0,17	1,05	0,73	1,04	0,62
1,01	0,34	1,04	0,84	1,07	0,98	1,07	0,34
1,03	0,43	1,06	0,73	1,10	3,00	1,09	0,84

Con estos datos se ha determinado la posición de la línea de la figura 4, que es la línea de regresión característica de la toxicidad de la dolantina para el ratón blanco.

2º Cálculo de las líneas de regresión. — Se basa en los datos de la tabla III. El cálculo de la línea de regresión se ha efectuado

de acuerdo a las fórmulas establecidas por Gaddum (1933) y que son:

$$\bar{y} = \frac{S(Bny')}{S(Bn)} ; \bar{x} = \frac{S(Bnx')}{S(Bn)} ; b = \frac{S(Bny'(x' - \bar{x}))}{S(Bn(x' - \bar{x})^2)}$$

En las que  $B$  es el factor de ponderación (factor establecido matemáticamente por Gaddum (1933), para significar el grado de error del porcentaje que se considera, y que se ha tomado del no-

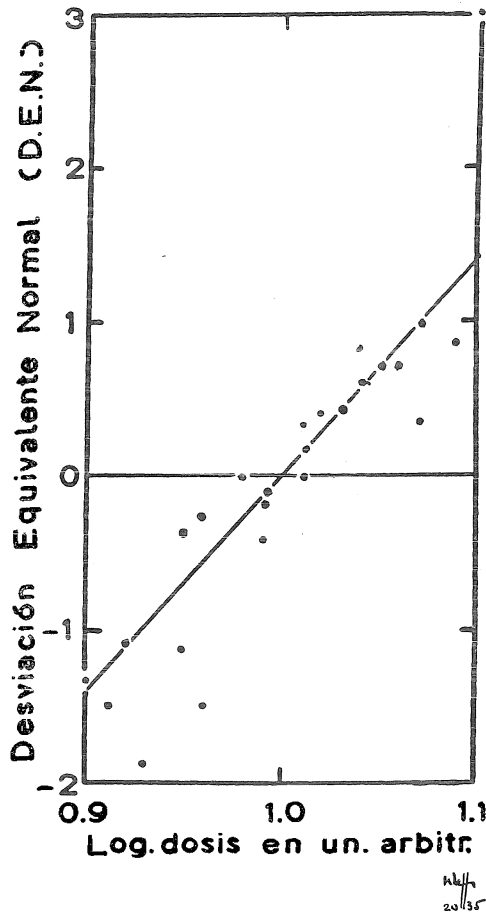


Fig. 4. — Línea de regresión característica de la toxicidad de la Dolantina.

mograma del citado autor);  $n$ , el número animales;  $y'$ , la desviación equivalente normal correspondiente a cada porcentaje de mortalidad;  $x'$ , el logaritmo de la dosis;  $\bar{y}$  y  $\bar{x}$ , son las medias ponderadas de  $y'$  y  $x'$  respectivamente, y  $b$ , es la pendiente de la línea de re-

gresión. No entraremos a detallar estos cálculos, ya que un ejemplo de la forma de realizarlos, se ha dado en un trabajo anterior (Torino y Litter, 1941).

La línea de r egresi on, se determina así:

$$y = bx - b\bar{x} + \bar{y}$$

haciendo  $-b\bar{x} + \bar{y} = -a$  tenemos que

$$y = bx - a$$

Una vez determinadas las fórmulas de las líneas de r egresi on, se han calculado las dosis mortales 50 %, haciendo primero  $y = 0,0$  (D.E.N. correspondiente a la mortalidad 50 %), determinando  $x$  (logaritmo de dichas dosis) y buscando los antilogaritmos correspondientes; se ha calculado también  $\lambda$  que es la inversa de  $b$ . Estos datos están consignados en la tabla VI.

TABLA VI

	Líneas de r�egresi�on	$b$	$\lambda$	Log DL 50	DL 50 mg/kg
1er. día . . . . .	$y = 9,18 x - 15,71$	9,18	0,109	1,7113	55,14
2�o día . . . . .	$y = 9,42 x - 15,82$	9,42	0,106	1,6794	44,78
3er día . . . . .	$y = 10,96 x - 17,93$	10,96	0,091	1,6360	44,32
4�o día . . . . .	$y = 6,01 x - 9,84$	6,01	0,166	1,6374	44,34

C) RESUMEN. — En la Tabla VII están consignadas las dosis mortales 50 % (DL 50), establecidas por los distintos métodos.

TABLA VII

<i>Dosis mortal 50 % (DL 50) en mg/kg</i>			
	Método de Trevan (1927)	Método de Gaddum (Línea de r�egresi�on (1933))	
		Proc. gráfico	Por cálculo
1er. día . . . . .	50,0	55,3	55,1
2�o día . . . . .	47,5	44,7	44,8
3er. día . . . . .	42,5	44,2	44,3
4�o día . . . . .	43,0	44,3	44,3

## DISCUSIÓN

En la Tabla VII, se puede observar que los valores de la dosis mortal 50 % oscilan dentro de ciertos límites, de acuerdo con el método que se ha empleado para el cálculo. Es interesante hacer notar que las dificultades en la interpretación de los resultados obtenidos con dosis diversas, y que figuran en la Tabla I, no existen cuando se analizan las cifras por los métodos antes indicados. Las discordancias que se observan aparentemente, se atenúan notablemente cuando se consideran las dosis que producen la mortalidad del 50 %, ya que la variabilidad de dicha dosis mortal no excede de los límites aceptables en una determinación biológica de este carácter. Sin embargo, hay que hacer constar que la dosis mortal 50 %, no es una constante, aún cuando se calcule, empleando resultados obtenidos en experiencias realizadas con gran número de animales.

Confirmamos una vez más que la combinación de los datos individuales obtenidos en los cuatro días de experiencias (Fig. 1), permiten la construcción de una curva característica de forma sigmoidea (Fig. 2), cuando el cálculo se efectúa por el método de Trevan (1927) y en forma de línea recta (Fig. 4), cuando se combinan las líneas de regresión correspondientes a esos cuatro días (Fig. 3) y determinadas gráficamente según Gaddum (1933). Este autor, sostiene que los logaritmos de las dosis individuales, están distribuidos habitualmente en forma normal, como ya lo hemos dicho. Este hecho se traduce porque la inscripción de los resultados expresando el efecto como desviación equivalente normal en relación con el logaritmo de la dosis, da una línea recta.

Como puede verse, las curvas individuales de las Figs. 1 y 3, muestran pendientes muy similares, salvo las correspondientes al 4º día, cuya pendiente es menor. Este mismo hecho se observa en las fórmulas de la línea de regresión calculadas algebraicamente (Tabla VI, 3ª columna). Relacionamos esta particularidad con el hecho de que dicha experiencia fue realizada en el mes de Julio, es decir, en pleno invierno, mientras que las restantes, fueron hechas en los meses de Abril y Mayo, por consiguiente, en otoño. Podría pues tratarse de una variación estacional de la sensibilidad de los animales. A pesar de ello, la dosis mortal 50 % correspondiente al 4º día varía poco con respecto a las demás, lo que muestra

una vez más la conveniencia de establecē la toxicidad característica de una sustancia, como la dosis correspondiente al 50 % de mortalidad.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

1° — Se ha estudiado la toxicidad de la dolantina para el ratón blanco y por vía intravenosa, empleando en total 805 animales.

2° — Se ha construido la curva característica de toxicidad y la línea de rēgresi3n; esta 3ltima tambi3n se ha obtenido por c3lculo.

3° — La dosis mortal 50 % (DL 50) oscila entre 42,5 y 50,0 mg/kg (m3todo de Trevan, 1929), 3ntre 44,2 y 55,3 mg/kg (m3todo gr3fico de Gaddum, 1933) y 3ntre 44,3 y 55,1 mg/kg (c3lculo por el m3todo de Gaddum, 1933).

4° — Nuestros resultados est3n de acuerdo con lo establecido por Gaddum (1933), a saber, qu3 los logaritmos de las dosis mortales individuales est3n distribuidos en forma aproximadamente normal.

5° — La dosis mortal 50 % (DL 50), no r3presenta una constante biol3gica, sino que varía a3n empleando en las experiencias un gran n3mero de animales.

#### BIBLIOGRAFIA

- BURN, J. H. — *Biological Standardization*, Biological University Press, London, 1937.
- CARRATAL3, R. E.; LOYARTE, R. G., y VUCETICH, D. — *Rev. de Psiquiatría y Criminología*, 1942, 7, 42, *Prensa Med. Argent.*, 1942, 29, 1599.
- DANIELS, F. — *Preparaci3n matem3tica para la química fíisica*, trad. cast. Edit. Labor, S. A., Barcelona, 1934.
- EISLJEB, O., und SCHAUMANN, O. — *Deutsche Med. Wochnschr.*, 1939, 65, 967.
- GADDUM, H. H. — *Reports on Biological Standards. III. Methods of Biological Assay Depending on a Quantal Response*, Medical Research Council, Special Report Series N° 183, His Majesty's Stationary Office, London, 1933.
- GRUBER, CH. M.; ROSS HART, E., and GRUBER, CH. M. — *J. Pharmacol. and Exper. Therap.*, 1941, 73, 319.
- SCHAUMANN, O. — *Arch. f. Exper. Path. und Pharmacol.*, 1940, 196, 109.
- TORINO, A., y LITTER, M. — *Semana Méd.*, 1941, 2, 807; *Rev. d. Inst. Bact.*, 1941, 10, 101.
- TORINO, A.; LITTER, M., y LITTER, D. K. DE. — *Semana Méd.*, 1940, 1, 1087; *Rev. d. Inst. Bact.*, 1940, 9, 329.
- TREVAN, J. W. — *Proc. Roy. Soc. Series B.*, 1927, 101, 483.

El se3or Jorge Ricardo Valotta nos ha prestado su colaboraci3n t3cnica en la realizaci3n del presente trabajo; nos complace expresar nuestro reconocimiento.