



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS DOCTORAL:

**EFFECTO DEL MALATO DE PIZOTIFENO
SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO DE
CEREBRO DE RATA "IN VITRO"**

Presentada por Sara García Catalina para
optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Alfonso Velasco Martín

1. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

En 1970 se inicia en el departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense una línea de investigación que se ocupa de estudiar el efecto de los fármacos psicotrópicos sobre el metabolismo oxidativo del tejido cerebral de rata “in vitro”, que da lugar a la publicación de una serie de trabajos en revistas nacionales e internacionales de reconocido prestigio (Velasco y col., 1972, 1973, 1974; Rabadán y col., 1976). Esta línea de investigación se continúa en la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba (González y col., 1977, 1978, 1979, 1980; Velasco y col., 1977, 1978; Saiz y col., 1978) y posteriormente en Valladolid (Dueñas y col., 1983; García y col., 1983, 1985; Álvarez y col., 1984; Velasco y col., 1989, 1991).

Una variante de esta línea de investigación se inició en Córdoba en 1979 con la Tesis Doctoral de María Adela Sánchez García leída en la Universidad Complutense en Julio de 1979. En este trabajo se analizó el efecto de agentes simpaticomiméticos de acción directa e indirecta y sus antagonistas sobre el metabolismo oxidativo del cerebro de rata “in vitro”, y fue publicado en inglés en la edición científica de la revista “Il Fármaco”.

Ya en Valladolid se estudió el efecto de histamina, serotonina y sus antagonistas sobre el metabolismo oxidativo de cerebro de rata “in vitro” (Velasco y col., 1981, 1984, 1992).

El malato de pizotifeno es un fármaco antihistamínico H_1 , antiserotonínico, antidepressivo, antiarrítmico y manifiesta un notable isosterismo con los fármacos antidepressivos tricíclicos estudiados previamente en nuestro Laboratorio (Velasco, 1995) más detalles sobre su farmacología sistemática se proporcionan en el capítulo de “Estado actual del problema”; por ello, en este trabajo se va a estudiar el efecto del malato de pizotifeno sobre el metabolismo oxidativo de cerebro de rata “in vitro”.

El consumo de oxígeno (QO_2) se determina en cortes, homogeneizados y mitocondrias de cerebro de rata “in vitro” mediante la técnica manométrica directa de Warburg (Umbreit y col., 1972). Se emplearan cortes, homogeneizados y mitocondrias.

La utilización la homogeneizados tiene como finalidad determinar el papel que desempeña la membrana celular intacta. Los cortes de cerebro de rata se incuban en solución Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10mM, Krebs con potasio 105mM con o sin calcio y Krebs en el que se ha sustituido el cloruro de sodio por cloruro de colina.

El homogeneizado al 10% se incuba con piruvato, malato, iones magnesio y adenosin trifosfato (ATP) en sacarosa 0,15 M.

El efecto del malato de pizotifeno sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial de cerebro de rata “in vitro” se estudia mediante el proceder de Velasco y col. (1985).

Se determina el efecto del malato de pizotifeno sobre la actividad ATPasa de homogeneizados de corteza cerebral “in vitro” mediante la técnica de Wu y Phillis (1979, 1981).

En este trabajo también se estudian las interacciones del malato de pizotifeno sobre las modificaciones del metabolismo oxidativo cerebral inducidas “in vitro” por dopamina, histamina y serotonina.

Teniendo en cuenta que la glucosa es el principal sustrato del tejido cerebral, se ha procedido al estudio de las modificaciones que en su consumo pudiera inducir el malato de pizotifeno, empleando el método de la glucosa-oxidasa (Sols y de la Fuente, 1957).

Los resultados se expresan mediante tablas y ocasionalmente gráficas como valores medios \pm E.S.M.; el contraste estadístico se realiza mediante un test para datos no apareados.

El desarrollo de esta Tesis Doctoral es como sigue:

- 1- Introducción, justificación e hipótesis del trabajo.
- 2- Estado actual del problema: Farmacología sistemática del pizotifeno.
- 3- Objetivos.
- 4- Material y Métodos.
- 5- Resultados y Discusión
- 6- Conclusiones.
- 7- Resumen.
- 8- Bibliografía ordenada alfabéticamente.

Valladolid a 14 de Noviembre de 2011

Fdº Sara García Catalina

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA: FARMACOLOGÍA SISTEMÁTICA DEL PIZOTIFENO

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA: FARMACOLOGÍA SISTEMÁTICA DEL PIZOTIFENO

El malato de pizotifeno es un fármaco antihistamínico H_1 , antiserotonínico, débilmente anticolinérgico y aperitivo. Se emplea fundamentalmente en la profilaxis de la jaqueca o migraña.

2.1. Origen y química

El pizotifeno o pizotilina es un fármaco de origen sintético. Químicamente es el 9,10-dihidro-4-(1-metilpiperidil-4-iliden)-4H-benzo (4,5) ciclohepta (1,2b) tiofen hidrógeno malato. Su fórmula empírica es $C_{19}H_{21}NS \cdot C_4H_6O_5$ con un peso molecular de 429.5, es un derivado benzocicloheptatieno, con gran similitud estructural con la ciproheptadina y los antidepresivos tricíclicos. Se presenta en forma de polvo blanco-amarillento, cristalino, inodoro que funde con descomposición a 261-263° C. Es muy poco soluble en agua, poco soluble en alcohol, conviene protegerlo de la luz. Su pK_a es de 7. Su fórmula desarrollada se presenta en la figura 1.

2.2. Farmacocinética

El pizotifeno posee una buena absorción oral, alcanzando sus niveles plasmáticos máximos a las cinco-siete horas de su administración oral. Se une a las proteínas plasmáticas el 95%.

El pizotifeno tiene una semivida plasmática de 26 horas, eliminándose principalmente por vía renal (70%) y en menor grado por heces (30%), aunque en tratamientos crónicos se incrementa la eliminación digestiva. Se biotransforma por conjugación con ácido glucurónico (Speight y Avery, 1972).

2.3. Farmacodinamia

El pizotifeno es una sustancia anticolinérgica, antihistamínica H_1 , y antiserotonínica con efecto agonista parcial de receptores serotoninicos, no interfiere con las cininas o con sus liberadores y carece de efecto bloqueante de adrenoceptores alfa y no es hipotensor (Diener, 2003; Speight y Avery, 1972).

El pizotifeno posee un efecto sedante y antidepresivo, al igual que la ciproheptadina con la que presenta notable isosterismo, es estimulante del apetito. Tiene gran semejanza estructural con los fármacos antidepresivos tricíclicos.

Al igual que la quinidina manifiesta efecto antiarrítmico en los animales de experimentación (Ahmad y Achari, 1969; Speight y Avery, 1972), este efecto se explica porque el pizotifeno tiene una gran semejanza estructural con los antidepresivos tricíclicos que son estabilizadores inespecíficos de membrana al bloquear los canales de sodio-dependientes de voltaje (Tamargo, 1995; Velasco, 2003).

2.4. Efectos no deseados. Toxicidad. Contraindicaciones. Precauciones e interacciones.

El pizotifeno puede provocar somnolencia, cefaleas, mareos, rubor facial, dolores osteomusculares, pesadez de piernas, alteraciones gastrointestinales, retención hídrica, disminución de la libido, desencadenamiento de crisis convulsivas e incremento del apetito con aumento de peso (Peet, 1977).

En relación con la toxicología experimental, la Dosis Letal₅₀ (LD₅₀) en el ratón es de $43 \pm 1,8$ mg/kg por vía intravenosa y 880 ± 102 mg/kg por vía oral. Los valores de LD₅₀ en rata y conejo eran de $17 \pm 1,1$ y $19 \pm 2,2$ mg/kg respectivamente por vía intravenosa y 1500 ± 330 mg/kg y 700 ± 252 mg/kg respectivamente por vía oral (Speight y Avery, 1972).

El pizotifeno no debe asociarse al etanol, ni a otros depresores del Sistema Nervioso Central porque potencia sus efectos sedantes, ni a los fármacos antihipertensivos bloqueantes neuronales adrenérgicos porque al estar relacionado estructuralmente con los antidepresivos tricíclicos bloquea su incorporación a la terminación nerviosa noradrenérgica (Bailey, 1976).

Se ha descrito un caso de posible hepatitis fulminante (Elouni y col., 2010) y de síndrome confusional por terapia con pizotifeno (Martínez Vicente, 2007)

2.5 Aplicaciones terapéuticas

El pizotifeno está indicado para el tratamiento profiláctico de las cefaleas vasculares recurrentes, provocando una reducción en la frecuencia y severidad de los ataques en un 60% de los pacientes, no siendo efectivo en el tratamiento de ataques agudos (Silcocks y col., 2010; Stark y col., 2007; Pierangeli y col., 2006; Cuvellier y col., 2004; Weydert y col., 2003; Pradalier y col., 2003; Goebel y Heinze, 2003; Goebel y col., 2002; Snow y col., 2002; Friedman, 2002; Diener y Limmroth, 2001; Bellavance y Meloche, 1990; Symon, 1992; Hockaday, 1992; Worawattanakul, 1999; Symon y Russell, 1986 y 1995; Speight y Avery, 1972).

En el tratamiento de cefaleas de origen neurítico y postraumáticas es menos efectivo que la metisergida, siendo muy poco eficaz en cefaleas de origen inflamatorio y en la neuralgia del trigémino (Geraud y col., 2003; Goadsby, 2003; Vasconcellos, 2003; Goebel, 2003; Becker, 1999).

El pizotifeno supone una alternativa a los derivados ergotamínicos cuando éstos no son efectivos o están contraindicados (enfermedad coronaria) (Silberstein, 2004; Rahimtoola y col., 2003; Ducros y Bousser, 2003; García del Pozo y col., 2003; Marano y col., 2003; Massiou, 2000).

El pizotifeno es también eficaz en el tratamiento de la anorexia, en pacientes con déficit ponderal como complementos del tratamiento de la enfermedad subyacente, con el fin de romper el círculo vicioso consistente en falta de apetito, insuficiente ingesta de alimentos de origen endógeno (Briars y col., 2008; Pierangeli y col., 2006; Maggioni y col., 2005). El pizotifeno es eficaz en el tratamiento de la anorexia, tanto de origen orgánico (enfermedades infecciosas y parasitarias, diarrea, durante las convalecencias, etc.) como psicógeno (anorexia nerviosa, anorexia en pacientes seniles). Debe darse la máxima prioridad a la identificación y tratamiento de la causa subyacente.

El pizotifeno se ha mostrado eficaz en la profilaxis del dolor abdominal en niños con migraña abdominal (d'Onofrio y col., 2006; Weydert y col., 2003; Russell y col., 2002; Huertas-Ceballos y col., 2002).

El pizotifeno también se ha utilizado para el tratamiento sintomático del síndrome carcinoide, enfermedad de Cushing, síndrome depresivo y cuadros alérgicos. También parece ser eficaz en el tratamiento de sobredosis por éxtasis (Young y col., 2005).

2.6. Preparados, vías de administración. Posología.

El pizotifeno se presenta en grageas de 0,5 mg y en solución, 5 ml contienen 0,25 mg de pizotifeno.

Como terapéutica profiláctica de la migraña se utiliza entre 0,5-1,5 mg diarios repartidos en tres tomas. Pudiéndose llegar hasta una dosis máxima de 4 mg/día. Debe comenzarse con dosis mínimas e ir incrementándolas paulatinamente. El efecto beneficioso se consigue al cabo de 10 a 20 días de comenzado el tratamiento.

El pizotifeno se emplea como estimulante del apetito a la dosis de 0,5 mg tres veces al día durante cuatro semanas.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Siguiendo la línea de nuestro Departamento el presente estudio pretende completar el perfil farmacodinámico del malato de pizotifeno, derivado tricíclico con efecto antihistamínico H_1 y antiserotonínico, con estructura tricíclica que presenta un notable isosterismo con la ciproheptadina y los antidepresivos tricíclicos. Se van a investigar sus efectos sobre el metabolismo oxidativo cerebral (consumo de oxígeno, consumo de glucosa, fosforilación oxidativa mitocondrial y actividad ATPasa cerebral) y su interacción con dopamina, histamina y serotonina en cortes de cerebro en rata "in vitro". Se tratará de establecer, en la medida de lo posible el tipo de antagonismo existente entre pizotifeno y dopamina sobre el consumo de oxígeno cerebral y determinar si es posible parámetros cuantitativos.

El consumo de oxígeno se determina en cortes, homogenizados y mitocondrias de cerebro de rata con objeto de establecer el papel de la membrana celular. Se determina también el consumo de oxígeno ligado a la actividad ATPasa de membrana sodio-potasio dependiente de acuerdo con el proceder de Gubitz y col. (1977), la actividad ATPasa, la fosforilación oxidativa mitocondrial y el consumo de glucosa.

Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos por otros derivados tricíclicos estudiados previamente en nuestro Laboratorio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

I- Determinación del consumo del oxígeno

Para realizar esta determinación se ha recurrido a la técnica manométrica (Umbreit y col., 1972) utilizando un aparato de Warburg Brown a 37°C con oscilación constante de 100/minuto, realizando las lecturas por el método directo, cada 15 minutos durante una hora. En el pocillo central de cada frasquito de Warburg se añadieron 0,2 ml de NaOH al 40% con objeto de absorber el CO₂ desprendido y para aumentar la superficie de absorción se introdujo un papel de filtro plegado. La cantidad de líquido en el frasquito fue de 2,5 ml, que junto con el volumen de hidróxido sódico añadido hace un volumen total de 2,7 ml. Cada manómetro corresponde a los dos frasquitos de un número de cada una de las series, (cada uno de los frasquitos fue calibrado con el manómetro correspondiente) siendo las constantes de calibración empleadas por nosotros, las que se relacionan a continuación.

Constantes de los frasquitos de Warburg		
Número	Serie A	Serie B
1	1.7484	1.8588
2	1.0556	1.0889
3	1.8718	1.8440
4	1.8825	1.8469
5	1.8018	1.6477
6	1.7710	1.7394
7	1.7652	1.7644
8	1.7580	1.6909
9	1.8194	1.8672
10	1.7103	1.8193
11	1.8151	1.7347
12	1.3622	1.8897
13	1.8638	1.6959
14	1.1202	1.1028

Por esta constante, resultante de la calibración, se multiplicó cada una de las lecturas, una vez restadas de la lectura inicial y realizada la corrección del manómetro utilizado como termobarómetro, de lo que resulta el consumo de oxígeno expresado en microlitros / 100 mg de tejido fresco. En ocasiones se expresará en microlitros / 100 mg de proteína o en microátomos / 100 mg de proteína.

En todas las experiencias se pusieron 14 manómetros con los frasquitos correspondientes y el tejido a estudiar, un manómetro solo con el medio de incubación, para recoger las variaciones de presión y temperatura que modifican la columna barométrica (termobarómetro).

Tras un periodo de calentamiento de 10 minutos para que el contenido del frasquito tome la temperatura del baño, se pone a 150 la columna de la rama del manómetro que comunica con el frasquito, realizándose las lecturas posteriores cada 15 minutos.

Se ha utilizado el líquido manométrico de Brodie. La fase gaseosa ha sido aire y oxígeno.

a)- Homogeneizado de cerebro de rata.

Se han utilizado órganos procedentes de ratas machos, de 150 a 200 gr de peso, muertas por decapitación.

Se ha homogeneizado con un aparato de Potter-Elvehjen entre 2 a 4°, utilizando como medio de suspensión sacarosa 0,25 molar, tamponada con buffer de fosfatos 0,1M a pH 7,4 (Romo y col., 1969).

Se han realizado experimentos de determinación del consumo de oxígeno del homogeneizado añadiendo diferentes sustratos (piruvato, malato) y cofactores (ATP, iones Mg).

Cuando se emplearon homogeneizados con sustratos y adición de cofactores, las concentraciones finales de los distintos reactivos en los frasquitos de Warburg fueron las siguientes:

Sacarosa	0,15 M
Buffer de fosfatos pH 7,4	0,012 M
Malato sódico	0,002 M
Piruvato sódico	0,002 M
Cloruro magnésico	0,0048 M
ATP sódico	0,0012 M

La molaridad, hasta límites fisiológicos, se completó con sacarosa 0,5 M. De suspensión de homogeneizado al 10% se pusieron 0,4 ml en cada frasco.

Las concentraciones de fármaco estudiadas se exponen en el capítulo de resultados, y se expresa el consumo en μ l/100mg de tejido fresco.

b)- Cortes de cerebro de rata.

Los cortes se han obtenido utilizando la técnica de McIlwain and Buddle (1953), eliminando los núcleos basales y la sustancia blanca.

El peso de los cortes osciló entre 80 y 120 mg. Se ha empleado como medio de incubación la solución de Krebs-Ringer fosfato, pH de 7,4 con glucosa 10^{-2} M.

El pH del medio de incubación se ha controlado siempre. Los fármacos y sus concentraciones finales aparecen en el capítulo de resultados.

II- Técnica de aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata.

La obtención de mitocondrias se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Umbreit y col. (1972), empleando como medio de suspensión sacarosa 0,25 M que contiene EDTA 1 mM (Kadenbach and Lühr, 1961).

III- Fosforilación oxidativa en mitocondrias de cerebro de rata.

La fosforilación oxidativa se determinó de acuerdo con la técnica de Brody y Bain (1952), incubando durante 30 minutos en fase aire.

Las concentraciones finales de los distintos reactivos en los frasquitos de Warburg, fueron los siguientes:

Buffer de fosfatos	0,016 M
Piruvato sódico	0,006 M
Malato sódico	0,006 M
Buffer de tricina	0,012 M
Fluoruro sódico	0,012 M
ATP sódico	0,0024 M
Sulfato magnésico	0,0004 M
Sacarosa 0,25 M	0,05 M
Hexoquinasa	0,02 mg
Glucosa	0,02 M
Citocromo C	$1,2 \times 10^{-5}$ M

El consumo de fosfato inorgánico se determinó al cabo de 30 minutos, mediante el método de Fiske y Subbarow (1925).

La cantidad de proteínas que se ponen en cada frasquito se determina por medio de la reacción de Biuret (Gornall y Bardawill, 1949). El consumo de oxígeno se calculó mediante la técnica manométrica.

Los resultados se expresan así:

El consumo de oxígeno, en microátomos/100 mg de proteína.

El consumo de fósforo, en micromoles/100 mg de proteína.

Además, se determina la relación P:O (cociente de micromoles de fosfato inorgánico esterificado a microátomos de oxígeno consumido).

IV- Determinación de la actividad ATPasa

a) determinación del consumo de oxígeno correspondiente a la actividad ATPasa (Na-K) dependiente, en cortes de cerebro de rata “in vitro”.

El consumo de oxígeno se determina por el método manométrico directo en cortes de cerebro de rata incubados en:

- Krebs-Ringer fosfato (Na-K) conteniendo: ClNa a 131,8 mM; ClK a 105,4 mM; SO₄Mg a 1,3 mM; buffer fosfato sódico (pH 7,4) a 20 mM y glucosa 12,8 mM como concentraciones finales.
- Krebs-Ringer fosfato sin sodio, con las mismas concentraciones finales, sustituyendo el ClNa por cloruro de colina, y el buffer de fosfato sódico por buffer de fosfato potásico.

El consumo de oxígeno se expresa en $\mu\text{l}/100\text{mg}/60\text{minutos}$ en ambos medios, y se calcula la diferencia entre ellos: Krebs-Ringer fosfato (Na-K) menos Krebs-Ringer fosfato sin sodio; que representa el consumo de oxígeno (QO₂) del tejido, correspondiente a la actividad ATPasa (NaK) de membrana (Gubitzy y col., 1977).

b) determinación de la actividad ATPasa (NaK) dependiente en homogeneizado de cerebro de rata “in vitro” (Phillis y Wu, 1979).

El homogeneizado de corteza cerebral de rata se realizó en un aparato Potter-Elvehjem entre 0 y 4°C, con 50 volúmenes de agua destilada, tamponada a pH 7,5, dando 10 golpes en 2 minutos a 1.000 revoluciones por minuto.

En cada uno de los tubos de incubación se disponen 50 μl de homogeneizado (1 mg de tejido). Se preparan dos series de tubos: serie A para determinar la actividad ATPasa total, y serie B para calcular la actividad ATPasa Mg⁺²-dependiente, no sensible a ouabaína. En los tubos de la serie A, el medio de incubación contiene, como concentraciones finales: Tris ClH a 75 mM, ClNa a 100 mM, ClK a 5 mM, ClMg a 5 mM. En los tubos de la serie B el medio de incubación contiene, como concentraciones finales, Tris ClH a 150 mM, ClMg a 5 mM, ouabaína a 1 mM. El volumen final de ambas series es de 1 ml, los fármacos se añaden, a las

concentraciones adecuadas, en el medio de incubación, como se indica en el apartado de resultados.

La incubación se realiza a 37° C, con agitación constante. Existe un periodo de preincubación de 10 minutos, al cabo de los cuales se añade el sustrato, ATP sódico (Sigma grado 1) a una concentración final de 4 mM. La reacción se detiene al cabo de 10 minutos por adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 12% helado en un baño de hielo.

En experimentos previos se comprobó la linealidad de la reacción en los primeros 15 minutos de incubación.

La actividad ATPasa en los tubos se estima a partir de la concentración de fosfato inorgánico en el sobrenadante, que se mide por el método colorimétrico de Fiske y Subbarow (1925), expresándose en μ moles por hora y por miligramos de proteína.

La estimación de la actividad ATPasa (NaK) dependiente se obtiene de la diferencia de actividad de la ATPasa total con respecto de la actividad de la ATPasa no sensible a ouabaína.

V- Determinación del consumo de glucosa

El consumo de glucosa se determinó por el método de la glucosa-oxidasa (Sols y de la Fuente, 1957), basado en la oxidación de la glucosa a delta gluconolactona, se desprende peróxido de hidrógeno que al reaccionar con el colorante forma un compuesto inestable de color verde con una banda de absorción máxima entre 510 y 550 nanómetros.

Se determinó la concentración de glucosa en el medio de incubación al principio y al final de la misma expresándose el resultado en mg/100 mg de tejido fresco/hora.

VI- Fármacos utilizados

Los fármacos empleados han sido: malato sódico (Merck), piruvato sódico (Merck), ATP sódico (Sigma), malato de pizotifeno (Sandoz), histamina diclorhidrato (Merck), oubaína octahidrato (Sigma), clorhidrato de dopamina (Sigma), clorhidrato de 5-hidroxitriptamina (Sigma).

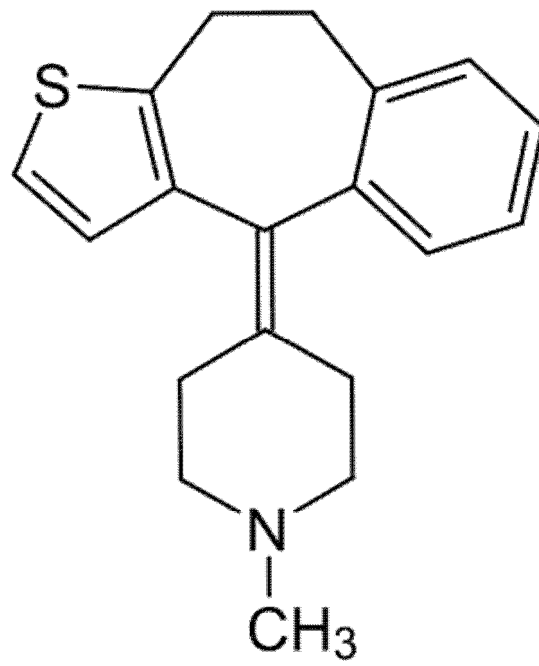


Figura 1. Pizotifeno

VII- Contraste estadístico de los resultados

Se ha realizado el análisis de significación de promedios en todos los tiempos de la totalidad de las concentraciones, empleando la t de Student, comparando testigos y experimentales (Tamarit, 1942; Lamotte, 1965; Snedecor, 1964; Fisher and Yates, 1963). Con los valores medios \pm E.S.M. (error standard de la media) se han confeccionado las tablas y la representación gráfica.

Las fórmulas utilizadas en los diversos cálculos han sido las siguientes:

▪ **Media aritmética:**

$$\bar{x} = \sum x/n$$

siendo la suma de los $\sum x$ la suma de los valores y n el número de datos de la población o muestra.

▪ **Desviación estándar (s):**

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \sum x\bar{x}}{n-1}}$$

Siendo $\sum x^2$ la suma de los cuadrados de cada uno de los valores, $\sum x$ la suma de los valores, \bar{x} la media aritmética y n el número de datos.

▪ **Error standard de la media (E.S.M.):**

$$\text{E.S.M.} = s / \sqrt{x}$$

▪ **Diferencia de medias:**

$$d = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$$

▪ **Error standard de la diferencia de medias (S_d):**

$$S_d = S_c \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$$

• Desviación standard común a las dos muestras (S_c):

$$S_c = \sqrt{\frac{(\sum x_1^2 - \sum x_1 \bar{x}) + \sum x_2^2 - \sum x_2 \bar{x}_2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

t de Student

$$t = d / sd$$

Los valores límites de t se leen en la tabla correspondiente para unos grados de libertad $v = n_1 + n_2 - 2$, obteniéndose unos valores con una significación de 95 o 99 %.

El cálculo de la Dosis Eficaz₅₀ (DE₅₀) Molar y de la Concentración Inhibitoria₅₀ (CI₅₀) se calculará de acuerdo con el proceder Litchfield y Wilcoxon (1949).

VIII- Elaboración de bibliografía

Las referencias bibliográficas que aparecen en el texto se citan mediante el sistema nombre-año, llamado también sistema Harvard (Day, 1990, Comité Internacional de Revistas Médicas, 1991). El apartado Bibliografía recoge una relación de referencias completas ordenadas alfabéticamente.

Para completar y actualizar las referencias, se ha realizado una búsqueda bibliográfica automatizada en la base de datos MEDLINE CD-ROM (1985-2011) con el descriptor pizotifeno.

XIV- Soporte informático

La redacción y composición del texto se ha realizado con el programa de tratamiento de textos LOTUS-AMIPRO, con licencia de propietario.

La representación gráfica de los resultados se ha obtenido con el programa SIGMAPLOT 4.02 con licencia de usuario.

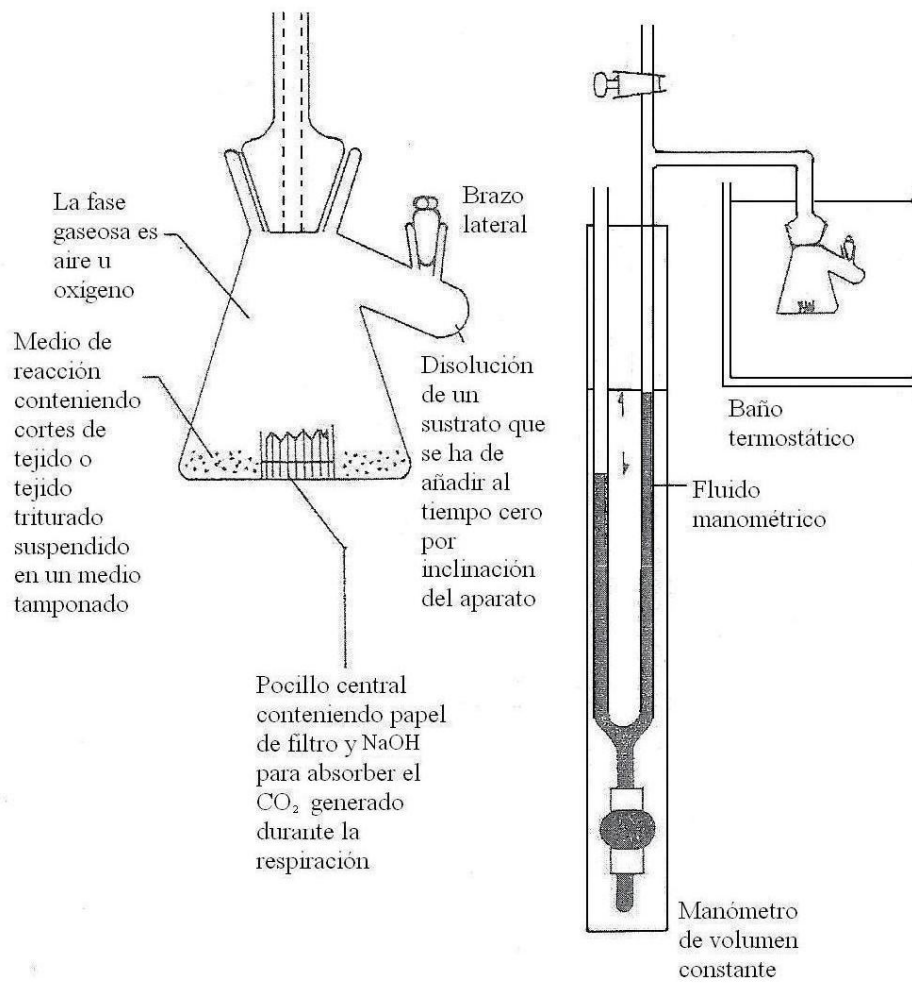


Figura 2. Aparato de Warburg

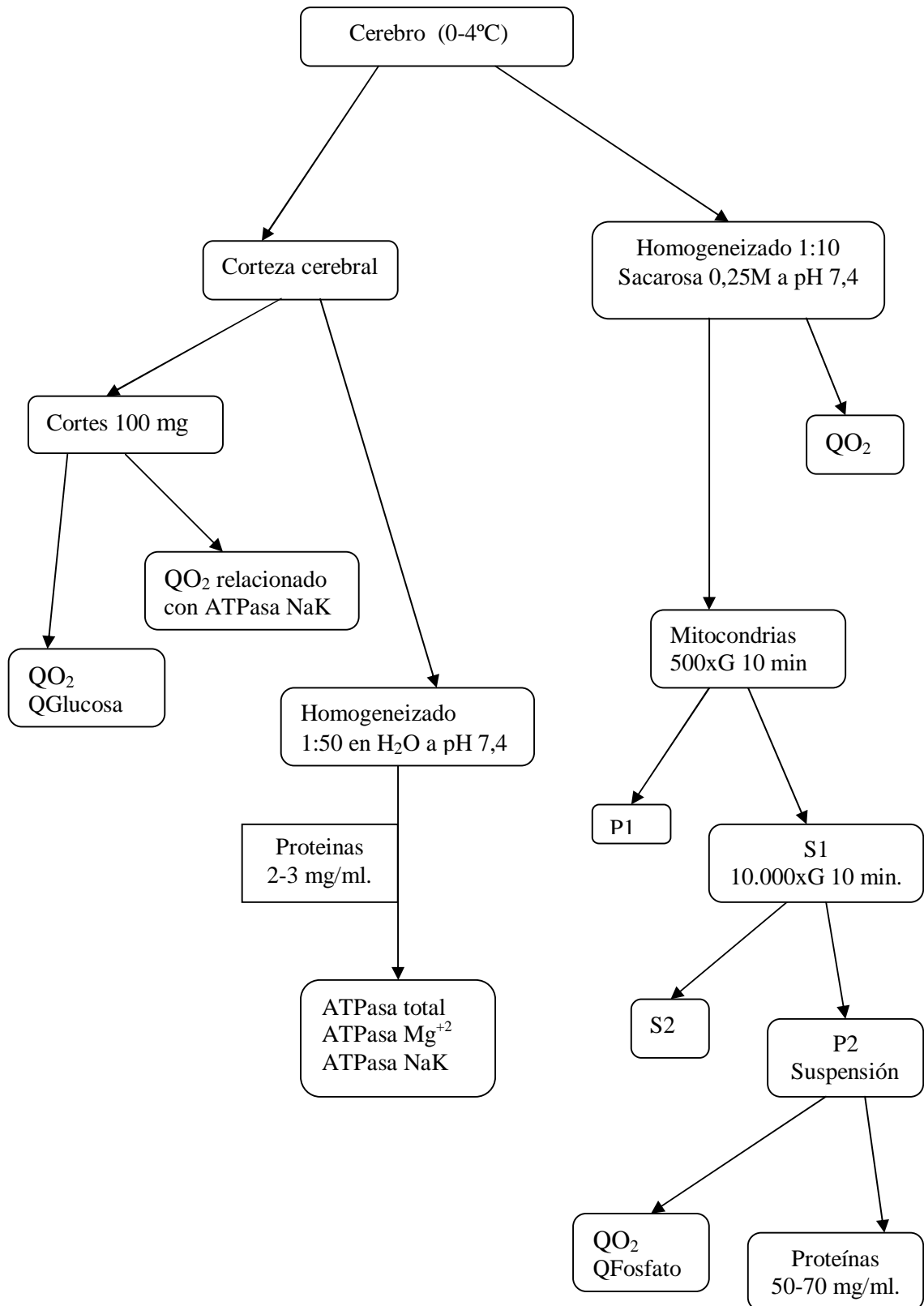


Figura 3. Diseño de los experimentos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados de los experimentos por medio de tablas y gráficas. En cada una de ellas se indica la concentración de fármaco empleado, el número de experimentos realizados y los valores medios \pm E.S.M. (error standard de la media) a los 15, 30, 45 y 60 minutos; se expresa la significación estadística de los valores obtenidos con el tratamiento de los distintos fármacos comparando con los valores controles. En los experimentos de estimación directa de la actividad ATPasa en preparaciones de homogenizado de corteza cerebral de rata los valores se expresan en micromoles de fosfato inorgánico liberado/hora/mg de proteína. En el encabezamiento de cada tabla se indica el fármaco empleado, el tipo de preparación y el medio de incubación.

5.1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN IÓNICA DEL MEDIO DE INCUBACIÓN SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE CEREBRO DE RATA “IN VITRO”

En la Tabla I se presenta el efecto de la variación de la composición iónica del medio de incubación sobre el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro”. El incremento de la concentración de potasio hasta 105 mM, o la sustracción de calcio del medio, así como la combinación de las dos posibilidades anteriores incrementa significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata, sin embargo, cuando en un medio con exceso de potasio, carente de calcio se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina, no se observan diferencias significativas de consumo de oxígeno en relación con los valores controles incubados en Krebs-Ringer fosfato con glucosa 10 mM.

En la Tabla II se presenta una curva dosis respuesta que relaciona concentración de potasio en el medio de incubación con el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro”, observándose que a partir de una concentración de potasio 20 mM se incrementa significativamente el consumo de oxígeno de la preparación. En la Fig. 5 se representa gráficamente esta curva dosis respuesta. Siendo la Dosis Eficaz₅₀ (DE₅₀) 37,5 mM.

En la Tabla III se observa el efecto de ouabaína sobre el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en Krebs-Ringer fosfato con potasio 5 mM y glucosa 10 mM, comprobándose que este inhibidor de la actividad ATPasa de membrana sodio-

potasio dependiente no modifica significativamente el consumo de oxígeno cerebral; sin embargo cuando el medio de incubación contiene potasio 105 mM la ouabaína a la concentración de 10^{-4} M inhibe significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” (tabla IV).

Los resultados obtenidos en cortes de cerebro de rata incubados en Krebs-Ringer fosfato con glucosa 10 mM utilizando oxígeno como fase gaseosa proporcionan unos valores de consumo de oxígeno homogéneos y concordantes con los descritos en la literatura en situaciones experimentales similares (Skolnik y col., 1966). Los consumos de oxígeno son superiores a los descritos utilizando aire como fase gaseosa en el mismo medio de incubación (Velasco y col., 1972; Arévalo y col., 1970). Cuando en la solución de Krebs-Ringer fosfato con glucosa 10 mM se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina disminuye significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” (Hertz y Schou, 1962), ya que la ausencia de sodio anula la actividad ATPasa de membrana sodio-potasio dependiente.

En cortes de cerebro de rata, la adición de un exceso de potasio al medio de incubación incrementa el consumo de oxígeno; este efecto es específico y no se debe a la hipertonia de la solución; confirmando los resultados de Ashford y Dixon (1935); Dickens y Greville (1935); Tamarit y Méndez (1963); Tamarit (1959) y Velasco y González (1978). La ausencia de calcio en el medio de incubación conduce a resultados similares que concuerdan con los hallazgos de Buchel (1953). Estos incrementos de consumo de oxígeno cerebral obtenidos por cambios en la composición iónica del medio de incubación, denominados estimulación catiónica, se atribuyeron inicialmente a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Rossiter, 1957; Ghosh y Quastel, 1954; Bassi y Bernelli-Zazzera, 1960); posteriormente, gracias a los trabajos de Hertz y Schou (1962) el incremento de consumo de oxígeno inducido por el exceso de potasio o el déficit de calcio se supuso debido a un incremento de la actividad de la enzima ATPasa de membrana sodio-potasio dependiente, siendo este efecto abolido por la ouabaína, conocido inhibidor de dicha enzima (Nakazawa y Quastel, 1968; Gubitz y col., 1977). El ion calcio es un conocido inhibidor de la actividad de membrana sodio-potasio dependiente (Hertz y Schou, 1962; Whittam y Blond, 1964; Tobin y col., 1973; Gubitz y col., 1973) han estimado que aproximadamente el 40 por ciento de la respiración cerebral está asociado a la actividad ATPasa de membrana de sodio-potasio dependiente y que esta actividad puede estimarse muy exactamente determinado la diferencia entre la respiración de cortes de cerebro incubados en un medio carente en

calcio con un alto contenido en potasio (105 mM) y un medio carente de sodio con un contenido en potasio normal o elevado (Gubitz y col., 1977; Akera y col., 1979; Quastel, 1975).

En esta situación experimental, el efecto de los fármacos inhibidores de la actividad ATPasa de membrana de sodio-potasio dependiente es muy evidente, deprimen el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en un medio carente en calcio con un alto contenido en potasio y no modifican dicho consumo cuando en este medio de incubación se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina (Dueñas, 1981; García Roldán, 1981; Velasco y González, 1982) y estos resultados se correlacionan estrictamente con las estimaciones de la actividad ATPasa de membrana sodio-potasio dependiente determinada en preparaciones de homogenizado de corteza de rata mediante el proceder de Wu y Phillis (1979,1981).

Cuando se trabaja con homogenizados se pueden realizar dos tipos de experimentos:

1. Determinación del consumo de oxígeno de homogeneizados de cerebro incubados en sacarosa 0.25 M tamponada a pH 7,4 para evitar aglutinaciones de mitocondrias (Umbreit y col., 1972).

2. Determinación del consumo de oxígeno de homogeneizados de cerebro de rata incubados en sacarosa tamponada a pH 7,4 con sustratos y cofactores.

En ambos tipos de experimentos la fase gaseosa ha sido siempre aire, ya que como demostró Mardomingo en su Tesis Doctoral en 1974, los consumo de oxígeno de homogeneizados empleando oxígeno como fase gaseosa son menores que los obtenidos empleando aire como fase gaseosa, siendo difícil explicar el por qué. La adición de sustratos y cofactores incrementa de forma considerable el consumo de oxígeno de homogeneizados confirmando estos resultados los obtenidos por Velasco y González en 1978, por ello basados en esta experiencia previa del Laboratorio, en nuestra Tesis Doctoral se han realizado únicamente experimentos de homogeneizados añadiendo al medio de incubación sustratos y cofactores.

5.2. EFECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO Y LA ACTIVIDAD ATPasa DE CEREBRO DE RATA “IN VITRO”

El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M disminuye significativamente el consumo de oxígeno de homogeneizado de cerebro de rata incubado en sacarosa pH 7,4 con sustratos y cofactores (tabla V). Este fármaco disminuye significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM (tabla VI). El malato de pizotifeno disminuye el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM y carente en calcio (tabla VII), sin embargo no modifica el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata cuando el medio de incubación carece de sodio (tabla VIII). El malato de pizotifeno incrementa a la concentración de 10^{-6} M la actividad ATPasa total y la actividad ATPasa no sensible a ouabaína, pero no modifica la actividad ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dependiente de membrana (tabla IX).

En mitocondrias de cerebro de rata “in vitro”, el malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M disminuye la relación P/O (Figura 6).

5.3. INTERACCIÓN DE PIZOTIFENO CON DOPAMINA, HISTAMINA Y SEROTONINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE CORTES DE CEREBRO DE RATA “IN VITRO”.

La dopamina incrementa el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM, siendo mayor este incremento de consumo de oxígeno a los 30 minutos de incubación, por lo que éste será el valor que se utilizará para establecer la relación dosis-efecto concentración molar de dopamina-incremento de consumo de oxígeno en cortes de cerebro de rata “in vitro” (tabla X). La dosis eficaz de dopamina es $1,99 \times 10^{-8}$ M con un intervalo de confianza del 95% comprendido entre $1,32\text{-}2,62 \times 10^{-8}$ M. La tabla recoge el efecto de la dopamina sobre el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata.

El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M, concentración a la que no modifica el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro”, antagoniza el

incremento de consumo de oxígeno inducido por dopamina en cortes de cerebro de rata “in vitro” (Figura 7).

El diclorhidrato de histamina no modifica el consumo de oxígeno de homogenizados de cerebro de rata “in vitro” (Tabla XI), pero a la concentración de 10^{-8} y 10^{-7} M incrementa significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” a los 30 minutos de incubación (Tablas XII y XIII). El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M mantiene el incremento de consumo de oxígeno inducido por el diclorhidrato de histamina a la concentración de 10^{-7} M (Tabla XIII).

El clorhidrato de serotonina a ninguna de las concentraciones ensayadas modifica significativamente el consumo de oxígeno de homogeneizados y cortes de cerebro de rata (Tablas XIV y XV), pero en presencia de malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M produce un significativo incremento de consumo de oxígeno con una concentración de serotonina de 10^{-8} M en los treinta primeros minutos de incubación (Tabla XVI).

5.4. EFECTO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE CORTES DE CEREBRO DE RATA “IN VITRO”.

El malato de pizotifeno a las concentraciones ensayadas no modifica el consumo de glucosa de cortes de cerebro de rata incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato con glucosa 10 mM (Tabla XVII), Krebs con exceso de potasio (Tabla XVIII) y Krebs carente en calcio (Tabla XIX). El comportamiento del malato de pizotifeno sobre el consumo de glucosa en cortes de cerebro de rata es muy semejante al obtenido con otros psicótrópos estudiados previamente en nuestro Laboratorio (Velasco y col., 1973; Velasco y col., 1985; García y col., 1985; Velasco, 1995).

El comportamiento del malato de pizotifeno sobre el consumo de oxígeno de cortes y homogeneizados de cerebro de rata “in vitro” es muy semejantes al de otros fármacos psicotrópicos estudiados previamente en nuestro Laboratorio (perfenacina, trifluoperacina, haloperidol, sulpirida, pipotiaccina, pimocida, tiaprida, clozapina, clotiapina, droperidol, tiotixeno, loxapina, clordiacepóxido, diazepam, medacepam, meprobamato, alprazolam, dibencepina, maprotilina, nomifensina, mianserina, viloxacina, trazodona, doxepina, amoxapina, meclocualona, hemineurina, clonacepam, carbamazepina).

Hay numerosas referencias, pero se van a recoger dos que tienen un carácter panorámico y recogen resultados a lo largo de un periodo dilatado de tiempo. (Velasco y col., 1989 y Velasco, 1995).

El efecto de malato de pizotifeno sobre la relación P/O en mitocondrias de cerebro de rata “in vitro” es muy semejante al obtenido con algunos neurolépticos y antidepresivos heterocíclicos como clorpromazina, loxapina, tiotixeno, dibencepina, maprotilina, trazodona, doxepina, amoxapina (Velasco y col., 1980, 1978, 1977, 1985 y 1995). En un apartado posterior se insistirá en el isosterismo existente entre el pizotifeno y muchos fármacos neurolépticos y antidepresivos tricíclicos (ver figura 4).

El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M, a la que no modifica el consumo de oxígeno y glucosa de cortes de cerebro de rata “in vitro”, antagoniza el incremento de consumo de oxígeno inducido por dopamina en cortes de cerebro de rata “in vitro”. Como la dopamina es sustrato de la monoamino-oxidasa mitocondrial se ha elegido el incremento de consumo de oxígeno a los treinta minutos de incubación, en que este incremento es máximo (González y col., 1980; Sánchez y col., 1979, 1980; Martín y col., 2006). Los resultados obtenidos con malato de pizotifeno no han permitido calcular la Concentración Inhibitoria₅₀ M (CI₅₀), pero la representación gráfica de la figura 7 sugiere un antagonismo de tipo no competitivo (González y col., 1980, Martín y col., 2006).

El incremento de consumo de oxígeno inducido por la dopamina en cortes de cerebro de rata “in vitro” parece deberse a una activación de la actividad ATPasa sodio-potasio de membrana, ya que es abolido por la ouabaína (Sánchez y col., 1980, González y col., 1980, Velasco y col., 1989; Velasco, 1995; Harris y Sthal, 1978; Hexum, 1978; Velasco, 1997).

Las interacciones de histamina, serotonina, fármacos psicotrópicos sobre el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” han sido analizadas por Velasco y col., en 1992 y son bastante inespecíficas. (Velasco, 1995).

Los fármacos neurolépticos y antidepresivos tricíclicos son estabilizadores inespecíficos de membrana y bloquean los canales de sodio dependientes de voltaje (Seeman, 1972, 1974; Velasco y col., 1989; Palatini, 1977; Weatherall, 1968; Velasco, 1996, 2003; Catterall, 1988; Soria y Ceña, 1998; Tamargo, 1995; Tamargo y col., 1993).

La ciproheptadina y el pizotifeno tienen una estructura tricíclica y presentan notable isosterismo con los neurolépticos y antidepresivos tricíclicos como puede comprobarse examinando la figura 4.

En el estado actual del problema al comentar la farmacodinamia del malato de pizotifeno se insiste en el efecto antiarrítmico de tipo quinidínico del malato del pizotifeno (Speight y Avery, 1972; Ahmad y Achari, 1969). A pesar de este efecto el malato de pizotifeno a las dosis habituales puede decirse que carece de cardiotoxicidad (Speight y Avery, 1972).

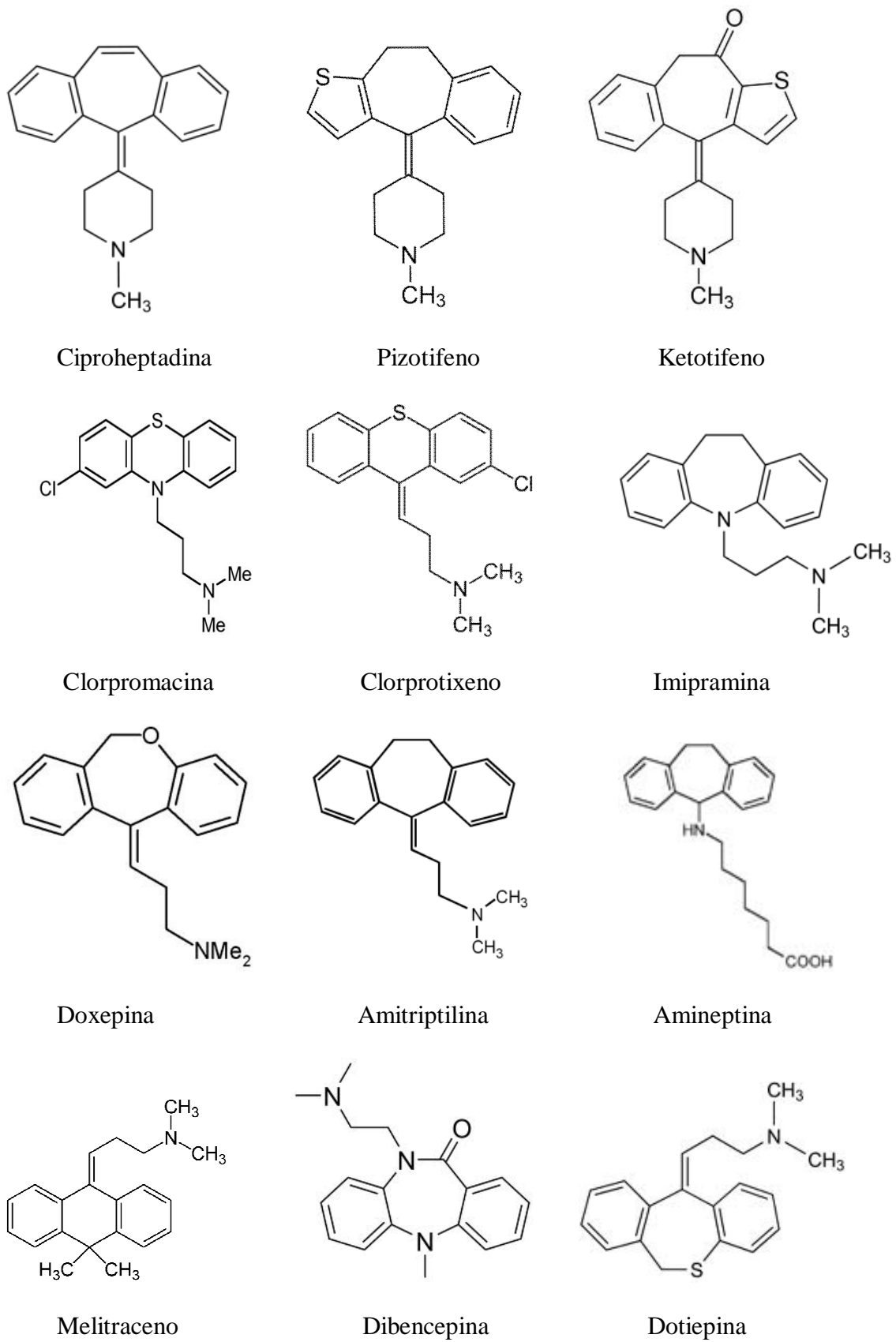


Figura 4.- Isosterismo existente entre ciproheptadina, pizotifeno, ketotifeno, neurolépticos y antidepresivos tricíclicos.

TABLA I

EFEECTO DE LA COMPOSICIÓN IÓNICA DEL MEDIO DE INCUBACIÓN SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA “IN VITRO”.

MEDIO DE INCUBACIÓN	Nº DE CORTES	QO ₂ EN μ l/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Krebs normal	11	39,0 \pm 2,4	73,5 \pm 3,9	111,6 \pm 4,7	147,1 \pm 7,3
Krebs K ⁺ 105 mM	11	53,7 \pm 2,5(a)	111,5 \pm 3,9(a)	162,0 \pm 4,5(a)	215,2 \pm 5,3(a)
Krebs sin calcio	12	48,0 \pm 4,5(b)	91,2 \pm 3,8(b)	127,4 \pm 11,6(b)	178,9 \pm 7,6(b)
Krebs K ⁺ 105 mM sin calcio	12	66,3 \pm 3,6(a)	131,4 \pm 7,7(a)	210,0 \pm 17,7(a)	257,9 \pm 22,7(a)
Krebs K ⁺ 105 mM sin sodio	10	36,8 \pm 5,4	83,1 \pm 5,4	120,5 \pm 10,7	155,2 \pm 12,3

(*) Valores medios \pm Error Standard de la Media.

(a) P < 0,01; (b) P < 0,05

TABLA II

EFEECTO DEL POTASIO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO. (El medio de incubación es solución Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM y concentraciones variables de potasio).

CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
K 5 mM	10	32,8 ± 2,4	71,0 ± 3,8	107,8 ± 5,6	144,6 ± 8,9
K 10 mM	12	36,9 ± 2,9	78,9 ± 4,5	119,0 ± 5,1	156,9 ± 7,0
K 20 mM	13	37,9 ± 2,3	85,0 ± 3,5(a)	131,0 ± 4,7(b)	172,3 ± 6,1(a)
K 50 mM	11	43,7 ± 3,6(a)	98,7 ± 7,6(b)	146,4 ± 10,8(b)	207,2 ± 14,8(b)
K 100 mM	10	50,3 ± 2,9(b)	116,3 ± 5,0(b)	169,7 ± 7,1(b)	225,1 ± 11,6(b)

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media. La Dosis Eficaz₅₀ (DE₅₀) es 37,5 mM

(a) P < 0,05; (b) P < 0,01

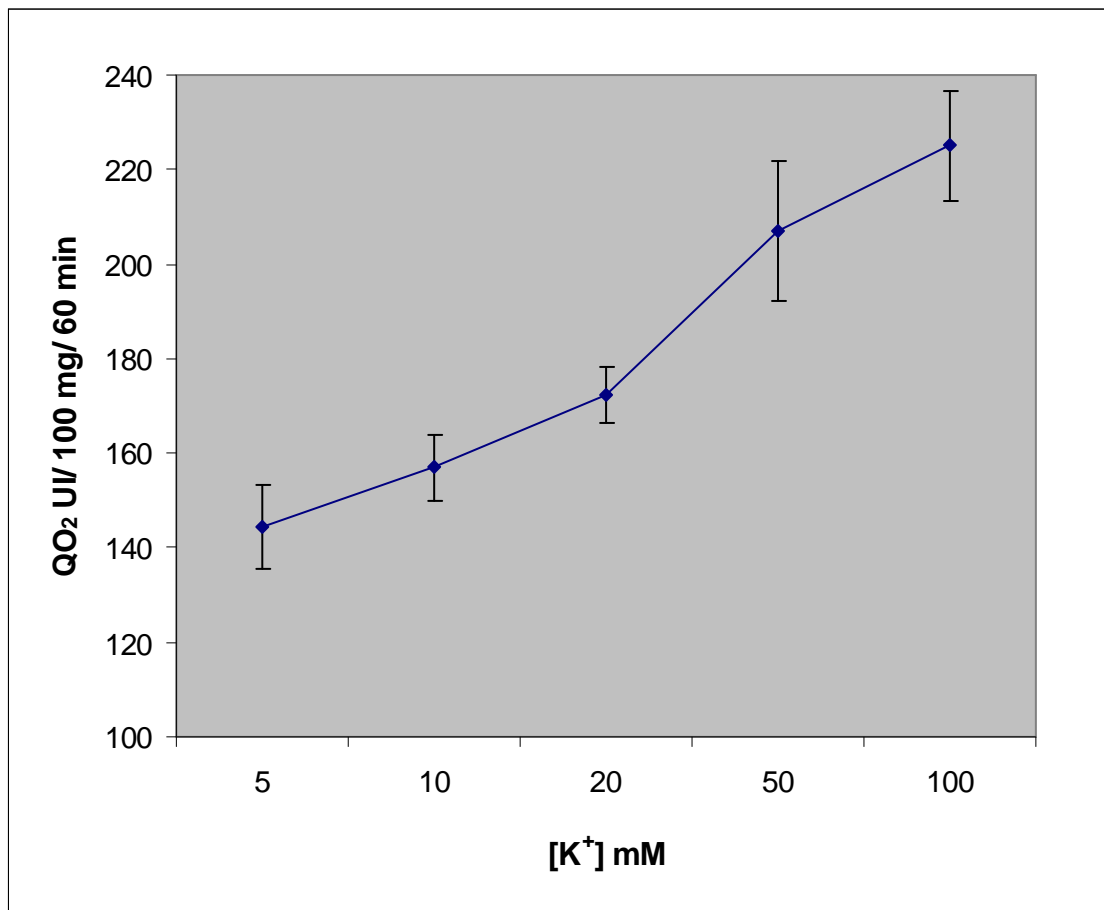


Figura 5. Curva de Dosis-Efecto al ion potasio ($DE_{50}=37,5$ mM)

TABLA III

EFFECTO DE OUABAÍNA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	9	31,44 ± 5,79	83,91 ± 8,45	134,01 ± 13,81	184,50 ± 19,39
10 ⁻⁴	9	37,88 ± 8,44(a)	88,85 ± 11,04	133,39 ± 11,93	177,52 ± 14,90

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P > 0,05 en todos los casos.

TABLA IV

EFFECTO DE OUABAÍNA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO" ESTIMULADO POR POTASIO 10 mM. (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con K⁺ = 105 mM).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	10	68,66 ± 3,28	132,66 ± 4,55	195,91 ± 5,86	255,13 ± 7,67
10 ⁻⁴	13	56,76 ± 4,60	114,44 ± 6,41(a)	170,37 ± 8,42(a)	221,85 ± 9,90(a)

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,05.

TABLA V

EFEECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE HOMOGENEIZADO DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO".

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE EXPERIMENTOS	QO ₂ EN µl/ 100mg DE TEJIDO FRESCO/HORA (MEDIA + E.S.M.)
Control	12	345,9 ± 15,3
10 ⁻³	9	176,8 ± 35,9(a)
10 ⁻⁴	9	357,3 ± 20,2
10 ⁻⁵	10	342,4 ± 12,6
10 ⁻⁶	9	365,2 ± 11,1
10 ⁻⁷	9	355,4 ± 11,4

La composición del medio de incubación es sacarosa tamponada a pH 7,4 con sustratos y cofactores (ver Material y Métodos).

(a) P < 0,01.

TABLA VI

EFEECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	9	35,7 ± 2,8	78,9 ± 3,4	120,1 ± 5,86	162,0 ± 6,7
10 ⁻³	9	27,2 ± 1,9(a)	48,1 ± 2,8(b)	64,5 ± 3,9(b)	70,2 ± 5,0(b)
10 ⁻⁴	9	36,3 ± 2,4	74,5 ± 3,9	115 ± 6,1	148,6 ± 8,2
10 ⁻⁵	9	40,3 ± 2,5	82,5 ± 4,1	123,5 ± 6,3	163,4 ± 8,2
10 ⁻⁶	9	34,1 ± 0,7	72,3 ± 2,0	110,6 ± 2,8	148,3 ± 5,0
10 ⁻⁷	9	35,5 ± 3,2	74,2 ± 3,8	115,3 ± 4,6	155,1 ± 7,6

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,02; (b) P < 0,01.

TABLA VII

EFECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con K⁺ 105 mM sin Ca⁺⁺).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE CORTES	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	8	50,89 ± 8,6	110,70 ± 17,7	149,23 ± 30,9	228,76 ± 33,0
10 ⁻³	7	28,43 ± 1,7(a)	58,0 ± 2,4(a)	80,83 ± 2,7(a)	103,50 ± 2,8(a)
10 ⁻⁴	6	53,33 ± 4,3	102,22 ± 9,11	150,0 ± 13,8	195,60 ± 19,7
10 ⁻⁵	7	53,63 ± 3,2	102,24 ± 6,5	155,40 ± 12,4	195,61 ± 14,0
10 ⁻⁶	9	56,53 ± 5,0	114,93 ± 10,2	180,45 ± 13,5	225,25 ± 21,9

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,01.

TABLA VIII

EFFECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con cloruro de colina, sin Na⁺).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	13	53,49 ± 7,8	97,18 ± 13,0	153,39 ± 19,1	192,1 ± 16,0
10 ⁻³	11	42,22 ± 5,0	77,38 ± 7,4	110,17 ± 9,9	185,32 ± 11,4
10 ⁻⁴	11	50,23 ± 4,3	91,01 ± 7,7	130,86 ± 11,1	167,81 ± 11,7
10 ⁻⁵	12	53,79 ± 6,8	94,63 ± 10,8	130,83 ± 11,7	164,3 ± 13,8
10 ⁻⁶	12	58,47 ± 4,2	99,55 ± 7,3	148,71 ± 13,1	183,36 ± 13,9

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

TABLA IX

EFFECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa DE HOMOGENEIZADO DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO".

ACTIVIDAD	CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO (MOLAR)	Nº DE EXPERIMENTOS	FOSFATO INORGÁNICO LIBERADO EN $\mu\text{mol/hora/mg}$ DE PROTEINA (*)
Actividad total	Control	6	$6,50 \pm 0,28$
	10^{-3} M	6	$8,94 \pm 0,19$ (a)
	10^{-4} M	6	$6,90 \pm 0,30$
	10^{-5} M	6	$6,64 \pm 0,10$
	10^{-6} M	6	$7,65 \pm 0,18$
Actividad ATP-asa Mg dependiente	Control	6	$3,51 \pm 0,13$
	10^{-3} M	6	$6,93 \pm 0,21$ (a)
	10^{-4} M	6	$2,12 \pm 0,14$
	10^{-5} M	6	$2,60 \pm 0,12$
	10^{-6} M	6	$3,83 \pm 0,43$
Actividad ATP-asa Na-K dependiente	Control	6	$2,98 \pm 0,25$
	10^{-3} M	6	$2,00 \pm 0,35$
	10^{-4} M	6	$4,78 \pm 0,35$
	10^{-5} M	6	$3,72 \pm 0,18$
	10^{-6} M	6	$5,73 \pm 0,59$

(*) Valores medios \pm E.S.M., (a) $P < 0,01$

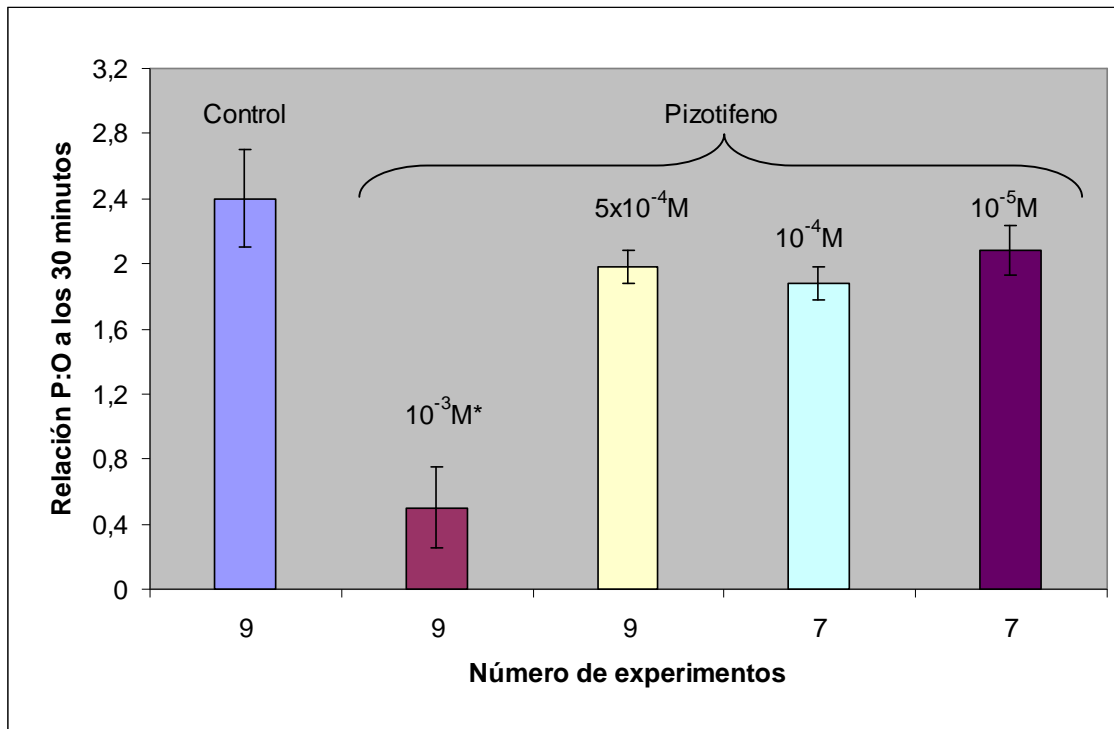


Figura 6. Efecto de malato de pizotifeno sobre la relación P/O en mitocondrias de cerebro de rata “in vitro”. El medio de incubación contiene: sacarosa 0,05 M; ATP sódico 0,0024 M; malato sódico 0,006 M; piruvato sódico 0,006 M; tampón de tricina 0,012 M; tampón de fosfatos 0,016; sulfato de magnesio 0,004 M; fluoruro de sodio 0,012 M; glucosa 0,02 M; citocromo c $1,2 \times 10^{-5}$ M y 0,2 mg de hexoquinasa. 0,5 ml de preparación de mitocondrias contenían aproximadamente 40 mg de proteínas totales. El pocillo central del frasco de Warburg contenía 0,2 ml de NaOH 10M. La fase gaseosa es aire y la temperatura de 30°C. El volumen final de cada frasco es de 2,7 ml.

* P menor de 0,01

TABLA X

EFEECTO DE DOPAMINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	13	62,93 ± 4,19	101,03 ± 6,96	139,44 ± 7,94	178,98 ± 9,96
10 ⁻⁵	10	60,15 ± 3,12	96,80 ± 7,30	142,98 ± 5,70	182,75 ± 7,08
10 ⁻⁶	11	84,77 ± 7,08 (P < 0,02)	132,16 ± 9,64 (P < 0,02)	175,78 ± 10,62 (P < 0,02)	215,88 ± 11,73 (P < 0,05)
10 ⁻⁷	11	85,27 ± 8,56 (P < 0,05)	130,58 ± 7,33 (P < 0,01)	175,21 ± 8,07 (P < 0,01)	221,73 ± 8,59 (P < 0,01)
10 ⁻⁸	11	68,82 ± 5,27	115,10 ± 7,08	157,96 ± 9,57	198,92 ± 11,55

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

P > 0,05 en todos los casos no señalados.

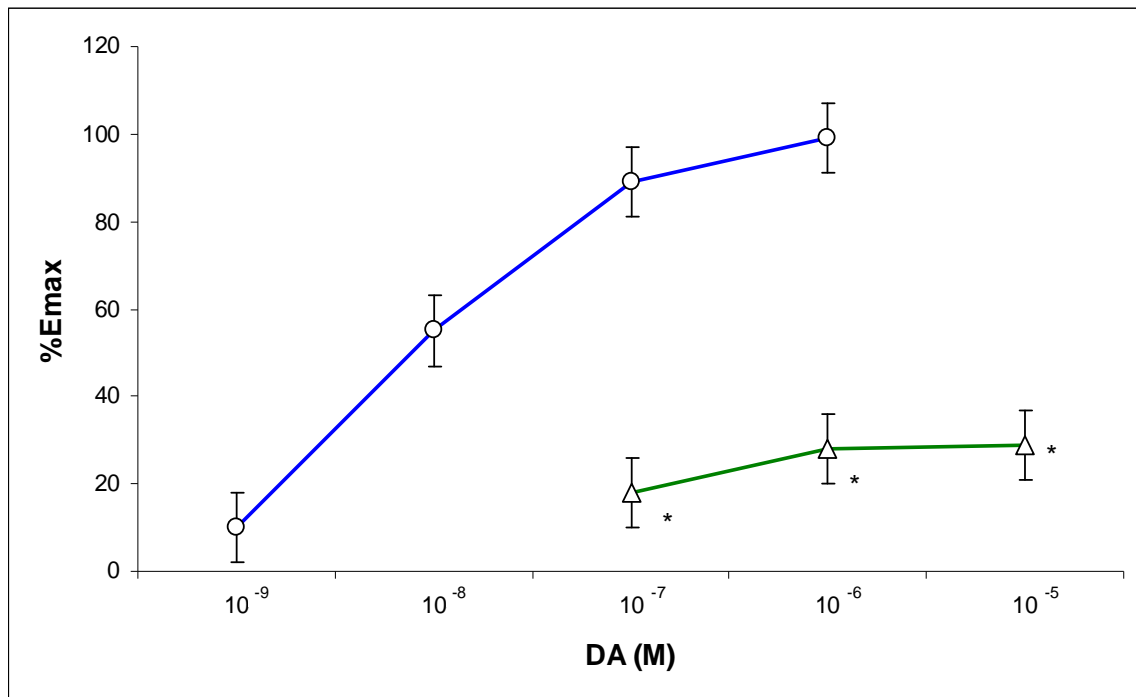


Figura 7. Curva dosis-efecto que relaciona la concentración molar de dopamina (DA) con el porcentaje de incremento de consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” en ausencia y en presencia de malato de pizotifeno a la concentración de 10⁻⁶ M:

- control

- pizotifeno 10⁻⁶ M

* P < 0,01

TABLA XI

EFEECTO DE DICLORHIDRATO DE HISTAMINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE HOMOGENEIZADO DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de sacarosa 0,15 M con sustrato y cofactores).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE EXPERIMENTOS	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	9	21,2 ± 2,7	44,8 ± 3,1	70,8 ± 4,6	90,9 ± 5,2
10 ⁻⁶	9	23,4 ± 3,7 (a)	50,3 ± 4,3	74,6 ± 5,4	96,9 ± 6,3
10 ⁻⁷	9	22,4 ± 3,0	46,6 ± 3,1	73,1 ± 4,5	93,6 ± 5,1
10 ⁻⁸	9	20,5 ± 3,7	43,4 ± 3,5	69,3 ± 5,2	88,7 ± 5,5

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P mayor de 0,05 en todos los casos.

TABLA XII

EFEECTO DE DICLORHIDARATO DE HISTAMINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con glucosa 10 mM).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE CORTES	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	9	31,1 ± 3,5	7,3 ± 2,3	112,5 ± 2,9	156,3 ± 4,2
10 ⁻⁵	9	34,5 ± 5,1	79,8 ± 5,1	116,9 ± 7,3	159,3 ± 3,1
10 ⁻⁶	9	35,1 ± 3,0	80,2 ± 3,1	116,1 ± 4,7	163,1 ± 7,3
10 ⁻⁷	9	35,6 ± 5,3	86,0 ± 5,1 (a)	121,7 ± 8,6	165,4 ± 10,8
10 ⁻⁸	9	41,9 ± 3,5 (a)	90,9 ± 6,1 (a)	119,7 ± 8,5	164,4 ± 9,4
10 ⁻⁹	9	32,0 ± 4,7	79,4 ± 7,3	111,7 ± 5,9	160,5 ± 5,4

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,05.

TABLA XIII

EFEECTO DE DICLORHIDARATO DE HISTAMINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO" EN PRESENCIA DE MALATO DE PIZOTIFENO 10⁻⁶. (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con glucosa 10 mM).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE CORTES	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	10	40,1 ± 4,4	93,1 ± 5,3	136,4 ± 7,8	178,9 ± 8,5
10 ⁻⁶	9	49,0 ± 3,0	98,0 ± 6,6	149,4 ± 4,8	183,5 ± 6,2
10 ⁻⁷	10	51,9 ± 1,9 (a)	109,9 ± 3,5 (a)	156,1 ± 5,2 (b)	199,8 ± 6,2
10 ⁻⁸	10	42,1 ± 4,4	91,9 ± 4,4	144,5 ± 7,6	177,1 ± 5,7

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,02.

(b) P < 0,05.

TABLA XIV

EFFECTO DE CLORHIDRATO DE SEROTONINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE HOMOGENEIZADOS DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de sacarosa 0,15 M con sustrato y cofactores).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE EXPERIMENTOS	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	11	74,0 ± 5,0	118,7 ± 9,6	144,0 ± 10,9	155,3 ± 11,5
10 ⁻⁶	12	73,2 ± 6,4 (a)	117,5 ± 9,1	140,6 ± 11,0	149,1 ± 11,0
10 ⁻⁷	11	100,6 ± 9,3	151,4 ± 13,6	175,7 ± 15,1	179,4 ± 15,0
10 ⁻⁸	11	84,5 ± 7,1	127,5 ± 9,7	155,1 ± 11,5	178,8 ± 13,1

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P mayor de 0,05 en todos los casos.

TABLA XV

EFEECTO DE CLORHIDARATO DE SEROTONINA SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO". (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4 con glucosa 10 mM).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº DE CORTES	QO ₂ EN µl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	10	53,6 ± 2,4	103,9 ± 3,7	148,0 ± 5,0	195,9 ± 6,0
10 ⁻⁵	10	49,8 ± 1,7	98,4 ± 2,5	145,5 ± 2,7	191,9 ± 4,1
10 ⁻⁶	11	50,5 ± 1,7	99,4 ± 4,4	137,9 ± 3,1	185,5 ± 5,2
10 ⁻⁷	11	49,3 ± 3,3	96,1 ± 2,4	143,5 ± 3,1	189,8 ± 4,2
10 ⁻⁸	11	49,8 ± 1,5	94,9 ± 2,6	144,5 ± 2,9	188,4 ± 3,5
10 ⁻⁹	11	45,2 ± 2,9	92,3 ± 3,8	141,4 ± 3,9	184,5 ± 3,7

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

No se observan diferencias significativas con respecto a los controles.

TABLA XVI

EFFECTO DE SEROTONINA SOBRE CONSUMO DE OXÍGENO (QO₂) DE CORTES DE CEREBRO DE RATA "IN VITRO" EN PRESENCIA DE PIZOTIFENO 10⁻⁶ M. (El medio de incubación es solución de Krebs-Ringer fosfato a pH=7,4).

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	N° DE CORTES	QO ₂ EN μl/ 100mg. DE TEJIDO FRESCO (*)			
		15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
Control	10	42,0 ± 1,8	83,9 ± 3,4	131,1 ± 3,8	172,0 ± 4,9
10 ⁻⁶	10	44,8 ± 1,8	88,0 ± 3,4	131,9 ± 5,5	164,8 ± 5,8
10 ⁻⁷	10	47,2 ± 3,1	93,8 ± 5,0	138,3 ± 7,2	179,8 ± 8,6
10 ⁻⁸	10	51,2 ± 2,6 (a)	101,8 ± 4,3 (a)	143,7 ± 61,15	181,5 ± 7,7

(*) Valores medios ± Error Standard de la Media.

(a) P < 0,02

TABLA XVII

EFEECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE CORTES DE CEREBRO DE RATA INCUBADO EN KREBS-RINGER FOSFATO CON GLUCOSA 10mM.

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº de cortes	Consumo de glucosa En μ l/ 100mg de tejido fresco/hora (*)
Control	11	0,59 \pm 0,1
10 ⁻³	11	0,58 \pm 0,04
10 ⁻⁴	9	0,56 \pm 0,09
10 ⁻⁵	10	0,55 \pm 0,08
10 ⁻⁶	10	0,55 \pm 0,05
10 ⁻⁷	10	0,63 \pm 0,08

(*) Valores medios \pm E.S.M.

P mayor de 0,05 en todos los casos

TABLA XVIII

EFEECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE CORTES DE CEREBRO DE RATA INCUBADOS EN KREBS-RINGER FOSFATO CON K^+ 105Mm Y GLUCOSA 10mM.

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº de Cortes	Consumo de glucosa en microlitros/100mg de tejido fresco/hora (*)
Control	10	0,76 ± 0,09
10 ⁻⁴	10	0,69 ± 0,04
10 ⁻⁵	9	0,74 ± 0,06
10 ⁻⁶	9	0,69 ± 0,03

(*) (Valores medios ± E.S.M.)

P mayor de 0,05 en todos los casos

TABLA XIX

EFEECTO DE MALATO DE PIZOTIFENO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE CORTES DE CEREBRO DE RATA INCUBADOS EN KREBS-RINGER FOSFATO CARENTE DE Ca⁺⁺ CON GLUCOSA 10mM.

CONCENTRACIÓN DE FARMACO (Molar)	Nº de cortes	Consumo de glucosa en microlitros/100mg de tejido fresco/hora (*)
Control	8	0,59 ± 0,30
10 ⁻⁴	8	0,55 ± 0,05
10 ⁻⁵	7	0,66 ± 0,04
10 ⁻⁶	7	0,65 ± 0,11

(*) (Valores medios ± E.S.M.)

P mayor de 0,05 en todos los casos

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M disminuye significativamente el consumo de oxígeno de homogenizados de cerebro de rata “in vitro” incubados en sacarosa tamponada a pH 7,4 con sustratos y cofactores.
- 2^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M reduce significativamente la relación P/O en mitocondrias de cerebro de rata “in vitro”, lo que sugiere un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial.
- 3^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M disminuye significativamente el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM.
- 4^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M disminuye el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM, potasio 105 mM y carente en calcio; sin embargo a ninguna de las concentraciones ensayadas modifica el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” cuando en este medio de incubación se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de colina.
- 5^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-3} M incrementa la actividad ATPasa Mg dependiente no sensible a ouabaína, sin modificar la actividad ATPasa sodio-potasio dependiente de membrana en homogeneizados de corteza cerebral de rata “in vitro”.
- 6^a. El malato de pizotifeno a las concentraciones ensayadas no modifica significativamente el consumo de glucosa de cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato con potasio 5 o 105 mM y glucosa 10mM.
- 7^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M antagoniza el incremento de consumo de oxígeno inducido por dopamina en cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10mM, siendo este tipo de antagonismo no competitivo.
- 8^a. El malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-7} M no antagoniza el incremento de consumo de oxígeno inducido por histamina en cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10mM.
- 9^a. La serotonina a la concentración de 10^{-8} M produce un significativo incremento del consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata “in vitro” incubados en solución de

Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10mM en presencia de malato de pizotifeno a la concentración de 10^{-6} M.

10^a. Las modificaciones de consumo de oxígeno de cortes y homogeneizados de cerebro de rata “in vitro” se obtienen a una concentración de malato de pizotifeno muy elevada (10^{-3} M), así como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Las interacciones con dopamina y serotonina se obtienen a una concentración de 10^{-6} M de malato de pizotifeno, lo que sugiere un efecto estabilizador inespecífico de membrana bloqueando los canales dependientes de voltaje de sodio al igual que muchos neurolépticos y antidepresivos tricíclicos estudiados previamente en nuestro Laboratorio. El pizotifeno tiene una estructura tricíclica y presenta isosterismo con muchos neurolépticos y antidepresivos tricíclicos.

7. RESUMEN

7. RESUMEN

El malato de pizotifeno es un fármaco antihistamínico H₁, antiserotonínico, débilmente anticolinérgico y aperitivo. Se emplea fundamentalmente en la profilaxis de la jaqueca o migraña. Presenta un notable isosterismo con la ciproheptadina y con los neurolépticos y antidepresivos tricíclicos, al igual que estas sustancias se comporta como estabilizador inespecífico de membrana bloqueando los canales de sodio dependientes de voltaje.

En el presente trabajo se estudia el efecto del malato de pizotifeno sobre el consumo de oxígeno (QO₂), consumo de glucosa, fosforilación oxidativa mitocondrial, actividad ATPasa y la interacción con diversos neurotransmisores (dopamina, histamina y serotonina) en cortes de corteza cerebral de rata "in vitro".

En relación con el MATERIAL Y MÉTODOS se determinó el consumo de oxígeno en cortes, homogeneizados y mitocondrias de cerebro de rata "in vitro" mediante técnica manométrica. La actividad ATPasa se determinó estimando el fosfato inorgánico liberado a partir del adenosin trifosfato (ATP) en ausencia y en presencia de ouabaína. Se determinó el consumo de glucosa mediante el proceder de la glucosa-oxidasa y también se estudió la fosforilación oxidativa mitocondrial. Para el estudio de las interacciones con los neurotransmisores se recurrió a los cortes de corteza cerebral de rata "in vitro".

El malato de pizotifeno a la concentración de 10⁻³ M disminuye el consumo de oxígeno de cortes y homogeneizados de cerebro de rata "in vitro" y desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial. A la misma concentración incrementa la actividad ATPasa Mg dependiente no sensible a ouabaína.

El malato de pizotifeno a la concentración de 10⁻⁶ M antagoniza el incremento de consumo de oxígeno inducido por dopamina en cortes de cerebro de rata "in vitro" incubados en solución de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 con glucosa 10 mM . La serotonina a la concentración de 10⁻⁸M incrementa el consumo de oxígeno de cortes de cerebro de rata en los treinta minutos de incubación en presencia de pizotifeno a la concentración de 10⁻⁶M.

Estos resultados se han obtenido a concentraciones elevadas y sugieren un efecto tóxico inespecífico estabilizador de membrana, bloqueando canales de sodio dependientes de voltaje; como hemos podido constatar con neurolépticos y antidepresivos tricíclicos estudiados previamente en nuestro Laboratorio sobre metabolismo oxidativo cerebral e interacciones con neurotransmisores en preparaciones de órgano aislado.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

AANPREUNG, P.; VAJARADUL, C.: Cyclic vomiting syndrome in Thai children. *J Med Assoc Thai*, 85 suppl 2:S743-8, 2002.

ABREU, B.E.; LIDDLE, G.W.; BURKS, A.L.; SUTHERLAND, V.; ELLIOT, H.W.; SIMON, A.; MARGOLIS, L.: Influence of amphetamine sulfate on cerebral metabolism and blood flow in man. *J. Amer. pharm. Ass.*, 38:186, 1949.

AKERA, T. ET AL.: Effects of monovalent cations on (Na-K)-ATPase in rat brain slices. *Eur. J. Farmacol.*, 55:281, 1979.

ALEXANDER, S.P.H.; PETERS, J.A.: Receptor and ion channel nomenclature supplement, *Trend in Pharmacological Sciences*, Elsevier North Holland, 1997.

ALLEN, D.O.; HILLMAN, C.C.; ASHMORE, J.: Studies on a biphasic lipolytic response to catecholamines in isolated fat cells. *Biochem. Pharmacol.*, 18:2233, 1969.

AHMAD, M., ACHARI, G.: Antiarrhythmic actions of BC-105, *Japanese Journal of Pharmacology*, 19:19, 1969.

ANGEL, I.: Central receptors and recognition sites mediating the effects of monoamines and anorectic drug on feeding behavior. *Clin. Neuropharmacol.*, 13:361, 1990.

ARÉVALO, L.M.; VELASCO, A.; ROGRÍGUEZ, L.P.; ARMIJO, M.: Efectos de 1-glutamin, pirodoxal y GABA sobre glicolisis y respiración cerebral. *Arch. Ins. Farm. Exp. (Medicina)*, 22:47, 1970.

ASHFORD, C.A.; DIXON, K.C.: Influence of excessive potassium on the brain respiration. *Biochem. J.*, 29:157, 1935.

AXELROD, J.: Pre and Postsynaptic Regulation of catecholamine neurotransmitters, in "Neurotransmitters", advances in Pharmacology and Therapeutics. Proceedings of the 7th International Congress of Pharmacology, Paris (1978) vol. 2 pp 249 Pergamon Press, Oxford, 1979.

BAILEY, R.R.: Antagonism of debrisoquine sulphate by pizotifen (sandomigran). N. Z. Med. F., 1:449, 1976.

BALOTTIN, U.; TERMINE, C.: Recommendations for the management of migraine in paediatric patients. Expert Opin Pharmacother, 8(6):731-44, 2007.

BARNES, N. P.; JAMES, E. K.: Migraine headache in children. Clin Evid (online), 13,pii: 0318, 2009.

BARNES, N.; MILLMAN, G.: Do pizotifen or propranolol reduce the frequency of migraine headache? www.archdischild.com : 684-685, 2004

BASSI, M.; BERNELLI-ZAZZERA, A.: Effects of Potassium ions in brain Respiration and aminoacids incorporation into Brain Proteins "in vitro". Experientia, 16:430, 1960.

BECKER, W.J.: Evidence based migraine prophylactic drug therapy. Can. J. Neurol. Sci., 26/Supl. 3:1317-1671, 1999.

BELLAVANCE, A.J.; MELOCHE, J.P.: A comparative study of naproxen sodium, pizotyline and placebo in migraine prophylaxis. Headache. 30(11):710-5, 1990.

BERNTMAN, L.; CARLSSON, C.; HAGERDAL, M.; SIESJO, B.K.: Circulatory and metabolic effects on the brain induced anphetamine sulphate. Acta physiol. scand., 102:310, 1969.

BESSER, R.E.; STERN, C.M.: Raynaud phenomena and migraine in two children: inclusion within a family of related disorders. Acta paediatr, 94(12):1860-2, 2005.

BLUNDELL, J.: Pharmacological approaches to appetite supresión, Trends. Pharmacol. Sci. 12:147, 1991.

BOGDANSKI, D.F.; BRODIE, B.B.: The effects of inorganic ions on the storage and uptake of H3 norepinephrine by rat heart slices. J. Pharmacol. exp. Ther., 165:181, 1969.

BRIARS, G.L. ET AL.: Weight gain with pizotifen therapy. Arch Dis Child., 93(7):590-3, 2008.

BRODY, T.M.; BAIN, J.A.: A mitochondrial preparation from mammalian brain. J. Biol. Chem. 195: 685-696, 1952.

BUHEL, L.: Influence of calcium on brain respiration. Anesth. Analg. 10:1, 1953.

BUCOURT, R.; BUENDIA, J.; DERAEDT, R.; Prostaglandis. En Actualites Pharmacologiques, 31:47, 1979.

CARLSSON, C.; HAGERDAL, M.; SIESJO, B.K.: Influence of amphetamine sulphate on cerebral Blood flow and Metabolism. Acta physiol. scand., 94:128, 1975.

CASAS, M.; PRAT, G.: Relevancia del sistema dopaminérgico en la génesis y mantenimiento de las conductas adictivas. En Avances en Psicofarmacología, M. Gutierrez, J. Escurra y P. Pichot (Editores), Citrán, Barcelona, pag. 135, 1984.

CATTERALL, W. A.: Structure and function of voltaje sensitive ion channels, Science, 842: 50, 1988.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K.: Bioquímica fundamental. El. Limusa, Mejico, 1976.

CONSTANTINESCU, CS.: Migraine and Raynaud phenomenon: possible late complications of Kawasaki disease. Headache. 42(3):227-9, 2002.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.: The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 7th Edition, Oxford University Press, New York, Oxford, 1996.

CUATRECASAS, P.: Hormone receptors; their function in cell membranes and some problems related to methodology. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 5:79, 1975.

CUVELLIER, J.C. ET AL.: Drug treatment of migraine in children: state of the art. *Arch Pediatric*, 11(5), 449-55, 2004.

CSERNANSKY, J.G. (Editors): Antipsychotic drugs. *Hand. Exp. Pharm Exp.*, 120:539, 1996.

DALLMAN, M. (Editor): Neural and endocrine regulation of ingestive behavior. A symposium *Federal Proc.*, 45:1381, 1986.

DESAIAH, D.; HO, L.K.: Kinetics of catecholamine sensitive Na⁺ K⁺ ATP-ase activity in mouse brain synaptosomes. *Biochem. Pharmac.*, 26:2929, 1977.

DICKENS, C.; GREVILLE, G.D.: Effect of potassium ions on oxygen uptake by rat tissue "in vitro". *Biochem. J.*, 29:1168, 1935.

DIENER, H. CH.; LIMMROTH, V.: Advances in pharmacological treatment of migraine. *Expert. Opin. Invest. Drugs.*, 10:1831-1845, 2001.

DIENER H-CH.: Pharmacological approaches to migraine. *Journal of Neural Transmission*, 64:35-63, 2003.

D'ONOFRIO, F. ET AL.: Adult abdominal migraine: a new syndrome or sporadic feature of migraine headache? A case report. *Eur J Neurol*, 13(1):85-8, 2006.

DUCROS, A.; BOUSSER, M.G.: Cluster headache. *Ann. Med. Interne*, 154/7:468-474, 2003.

DUEÑAS, S.; GARCÍA, J.L.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Effect of mianserin hydrochloride on oxidative metabolism of rat brain “in vitro”. *Il Farmaco Ed. Prat.*, 38:235, 1983.

DUEÑAS, S.; GARCÍA, J.L.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Effect of etomidate on oxidative metabolism of rat brain “in vitro”. *RCS Med. Sci.*, 17:1155, 1984.

DUNCAN, C.J.: Properties of the Ca^{++} ATPase activity of mammalian synaptic membrane preparations. *J. Neurochem.*, 27:1277, 1976.

EILAND, L.S.; ET AL.: Pediatric migraine: pharmacologic agents for prophylaxis. *Ann Pharmacother*, Jul;41(7):1181-90, 2007.

EDITORIAL: Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International classification of headache disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 2004; 24 (suppl 1): 9 – 160.

ELLINWOOD, E.W.; KILBAY, M.M.: Cocaine and other stimulants. Plenum Press, New York, 1977.

ESCORIAL, C.: Efecto de algunos agonistas alfa y dopaminérgicos sobre la actividad oxidativa de cerebro de rata “in vitro”. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. 1981. Resumen publicado en *Arch. Fac Med. Madrid*, 40:8, 1981.

ESCORIAL, C.; GONZÁLEZ, J.L.; MARAÑÓN, A. y VELASCO, A.: Efecto de algunos agonistas alfa y dopaminérgico sobre la actividad oxidativa de cerebro de rata “in vitro”. *Arch. de Farmacol. y Toxicol.* 8:123, 1982.

ESTLER, C.J.: Effect of amphetamine type psychostimulants on brain metabolism. *Advances in Psychopharmacology and Chemotherapy*, 13:305 Academic Press, New York, 1975.

ELOUNI, B. ET AL.: Fulminant hepatitis possibly related by pizotifen therapy. *Ann Pharmacother.* 44(7-8):1348-9, 2010.

FELDBERG, W.; SHERWOOD, S.L.: Injections of Drugs into lateral ventricles of the cat. *J.Physiol.*, (Lond)., 123:148, 1954.

FERNÁNDEZ, A.; de ANDRÉS-TRELLES, F.: Introducción a la farmacología del Sistema Nervioso Central. Señales químicas (mediadores) modificadas por los fármacos, en Velázquez, B.L. *Farmacología*, 16ª Edición: 276 Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993.

FISHER, R.A.; YATES, F.: *Tablas Estadísticas para investigadores*. Editorial Aguilar, 3ª Edición, Madrid, 1963.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, J.: Determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, J.: Estimation of Phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 81:629, 1929.

FRIEDMAN, G.: Advances in paediatric migraine. *Paediatr. Child. Health.*, 7:239-244, 2002.

GARCÍA-MÉNDEZ, P., GALA F. De, VELASCO, A.: Tratamiento de las migrañas y otras cefaleas en *Farmacología Clínica y Terapéutica Médica*, dirigida por A. Velasco pags 533-535, Mc Graw-Hill/ Interamericana, Madrid 2004.

GARCÍA, C. (Editor): *Nuevos antipsicóticos atípicos*. Masson S.A., Barcelona, 1996.

GARCÍA, J.L.; DUEÑAS, A.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Effect of clothiapine on oxidative metabolism of rat brain "in vitro". *Il Farmaco Ed Sci.*, 38:243, 1983.

GARCÍA, J.L.; GONZÁLEZ, J.L.; DUEÑAS, A.; VELASCO, A.: Efecto del clorhidrato de doxepina sobre el metabolismo oxidativo de cerebro de rata "in vitro", *Rev. Farmacol. Clin. Exp.*, 2: 47, 1985.

GARCÍA DEL POZO, J.; CARVAJAL, A.; GRAJAL, C.; VERA, E.; DEL PINO, A.: Antimigraine drug consumption in Spain. *Acta. Neurol. Scand*, 107/2:158-160, 2003.

GÉRAUD, G. ET AL.: French guidelines for the diagnosis and management of migraine in adults and children. *Clin Ther*, 26(8) :1305-18, 2004.

GÉRAUD, G. ET AL.: Diagnosis and treatment of migraine in adults and children. Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la migraine chez l'adulte et chez l'enfant. *Revue Neurologique*, 159(1):126-135, 2003.

GHOSH, J.J.; QUASTEL, J.H.: Narcotics and Brain respiration. *Nature (Lond)*, 174:28, 1954.

GIBERT, J.: Nuevos antipsicóticos. *Rev. Farm. Clin. Exp.*, nº especial: 53, 1993.

GINGRICH, J.A.; CARON, M.G.: Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16:231, 1993.

GLYNN, I.M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmacol. Rev.*, 16:381, 1964.

GOADSBY, P.J.: Migraine: diagnosis and Management. *Intern. Med. J.*, 33/9 y 10-436:442, 2003.

GOEBEL, H.: Treatment of migraine. *MMW. Fortschr. Med.*, 145/suppl. 2:72-78, 2003.

GOEBEL, H.; GRAF-BAUMANN, T.; ZENZ, M.: Prophylactic drug Management of migraine. *Schmerz*, 16:223-240, 2002.

GOEBEL, H.; HEINZE, A.: Prophylactic drug Management of migraine. *Nervenarzt* 74:915-934, 2003.

GONZÁLEZ, J. L.: Efecto de los inhibidores de monoamino-oxidasa sobre consumo de oxígeno, glucosa y fosforilización oxidativa de tejido cerebral de rata "in vitro". Arch. Fac. Med. Madrid, 30:251, 1976.

GONZÁLEZ, J. L.; SAIZ, I.; VELASCO, A.: Effect of Maprotiline hydrochloride on oxygen and glucose uptake and on oxidative phosphorylation of rat brain "in vitro". Il Farmaco Ed. Pr., 33:183, 1978.

GONZÁLEZ, J. L.; SAIZ, I.; VELASCO, A.: Efecto del sulfato de d-anfetamina sobre consumo de oxígeno, glucosa y fosforilización de cerebro de rata "in vitro". Arch de Farmacol. y Toxicol., 3:177, 1977.

GONZÁLEZ, J. L.; SAIZ, I.; VELASCO, A.: Interaction reserpine amphetamine on the oxygen uptake of rat brain "in vitro": its modification by cationic stimulation. Proc. 7th int. Congr. Pharmac. Abstr. 1568, Pergamon Press London 1978.

GONZÁLEZ, J. L.; SÁNCHEZ, A.; SAIZ, J.; VELASCO A.: Efecto de anfetamina y tiramina sobre el metabolismo oxidativo de cerebro de rata "in vitro". Arch, de Farmacol. y Toxicol., 5:284, 1979.

GONZÁLEZ, J. L.; SÁNCHEZ, A.; SAIZ, J.; VELASCO A.: Effect of Amphetamine and dopamine on oxygen uptake of rat brain slices "in vitro". Il Farmaco Ed. Sci., 35:868, 1980.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177(2):751-766, 1949.

GRAY, R.N.; ET AL.: Drug Treatments for the Prevention of Migraine Headache. Rockville (MD): Agency for Health Care Policy and Research (US), 1999.

GUBITZ, R.H.; AKERA, T.; BRODY, T.M.: Control of brain slices respiration by (Na^+K^+) activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors. Biochimica et Biophysica acta, 459:263, 1977.

HARRIS, W.S.; SCHOENFELD, C.D.; BROOKS, R.H.; WEISLER, A.M.: Receptor mechanism for the metabolic and circulatory action for epinephrine in man. *J. clin. Invest.*, 44:1058, 1965.

HARRIS, W.S.; STAHL, W.L.: Interactions of adrenergic compounds with brain membrane constituents. *Biochem. Pharmacol.*, 27:2015, 1978.

HERTZ, L.; SCHOU, M.: Univalent Cations and the respiration of brain cortex slices. *Biochem. J.*, 85:93, 1962.

HEUSLER, G.: Clonidine induced inhibition of sympathetic nervous activity: no indication for a central presynaptic or an indirect sympathetic mode of action. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 286:97, 1974.

HEXUM, T.D.: The effect catecholamines on transport (Na^+K^+) adenosine triphosphatase. *Biochem. Pharmacol.*, 26:1221, 1977.

HEXUM, T.D.: Studies on the reaction catalyzed by transport (Na^+K^+) adenosine triphosphatase II. *Biochem. Pharmacol.*, 27:2109, 1978.

HIMS-HAGEN, J.: Sympathetic regulation of Metabolism. *Pharmacol. Rev.* 19:376, 1967.

HIMS-HAGEN, J.: Effects of catecholamines on Metabolism, en "Catecholamines". *Handbook of Experimental Pharmacology.* 33:363, 1972.

HINKLE, P.C.; McCARTY, R.E.: ¿Cómo fabrican ATP las células?. *Investigación y Ciencia.* 20:58, 1078.

HOCKADAY, M.: Is there a place for "abdominal migraine" as a separate entity in the IHS classification? No! *Cephalalgia*, 12:346-348. 1992.

HUDA, K.: Pizotifen relieves acute migraine symptoms. *Lybian J Med.*, 3(1):7, 2008.

HUERTAS-CEBALLOS, A.; LOGAN, S.; BENNETT, C.; MACARTHUR, C.: Pharmacological interventions for recurrent abdominal pain (RAP) and irritable bowel syndrome (IBS) in childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* 23;(1):CD003017, 2008.

HUERTAS-CEBALLOS, A.; MACARTHUR, C.; LOGAN, S.: Pharmacological interventions for recurrent abdominal pain (RAP) in childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* (1):CD003017, 2002.

IVERSEN, L.L.; HORN, A.S.; MILLER, R.J.: Structure-activity relationships for agonist, and antagonist drugs, at pre and postsynaptic dopamine receptor sites in rat brain, in pre and postsynaptic receptors. Edited by Usdin, E. and Bumme Jr. W. e. pag 207, Marcel Dekker Inc. New York, 1975.

KADENBACH, B.; LÜRH, W.: Effects of 7-chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxide on mitochondria from rat liver and brain. *Nature* 192: 174-176, 1961

KEBABIAN, J.W.; CALNE, D.B.: Multiple receptors for dopamine. *Nature.* 227:93, 1979.

KERNICK, D. ET AL What happens to new-onset headache in children that present to primary care? A case-cohort study using electronic primary care records. *Cephalalgia*, 29(12):1311-6, 2009.

KUO, J.F.; GREENGARD, P.: Cyclic nucleotide dependent proteinkinases IV: Widespread occurrence of adenosine 3'5' monophosphate dependent proteinkinase on various tissues and phyla of the animal Kingdom. *Proc. Nat. Acad. Sci., (Wash)*, 64: 1349, 1969.

KUSCHINSKY, K.: Psychic dependence on opioids mediated by dopaminergic mechanisms in the striatum?, *Trends Pharmacol, Sci.*, 1:287, 1981.

LAMOTTE, M.: *Estadística Biológica*. Toray Masson, Barcelona, 1965.

LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, 1970.

LEHNINGER, A.L.: Bioenergetica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. Bogota, 1975.

LEVITZI, A.: The mode of coupling of adenylate cyclase to hormones receptors and its modulation by GTP. *Biochem Pharmac.*, 27:2083, 1978.

LEWIS, D. ET AL.: Practice parameter: pharmacological treatment of migraine headache in children and adolescents: report of the American Academy of Neurology Quality Standards Subcommittee and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, 63(12):2215-24, 2004.

LIMROTH, V.; SIENER, H.C.: Headaches: News on pathophysiology and treatment of migreine. *Notf. Med.*, 29/1-2:32-41, 2003.

LITCHFIELD, J.Z.; WILCOXON, F.A.: A simplified method of evaluating dose-effect experiments *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 96:99, 1949.

LORENZO-VELÁZQUEZ; VELASCO, A.: Mecanismo de acción de algunos fármacos depresores del Sistema Nervioso Central en “libro homenaje al Prof. Dr. D. Rafael Vara López”. Pag. 453, Editorial Sever Cuesta, Valladolid. 1975.

MAGGIONI, F. ET AL.: Weight variations in the prophylactic therapy of primary headaches: 6-month follow-up. *J. Headache Pain*, 6:320-322, 2005.

MARANO, E. ET AL.: Focal hypertrophic cranial pachymeningitis associated with temporal arteritis: A new case report. *J. Neurol.* 25/1:98-100, 2003.

MARDOMINGO, M. J.: Efecto de pipotiazina y sus ésteres sobre el consumo de oxígeno y glucosa de cerebro de rata “in vitro”. Tesis Doctoral Facultad de Medicina Universidad Complutense, Madrid 1974.

MARTÍN, R.; ALAMO, C.; VELASCO, A.; RODRÍGUEZ-MAYO, J. C.; CARVAJAL, A.: Análisis de la interacción de dopamina fármacos psicotrópicos sobre el consumo de oxígeno de cerebro de rata “in vitro”. *Revista de Investigaciones Quirúrgicas*, 9: 88, 2006.

MARTÍNEZ VICENTE, S. ET AL.: Confusional syndrome caused by pizotifen. *Farm Hosp.* 31(3):195-6, 2007.

MASSIOU, H.: Prophylactic treatments of migraine. *Rev Neurol.*, 156/suppl. 4 :4s79-4s86, 2000.

McCULLOCH, J.; HARPER, M.: Cerebral circulatory and metabolic changes following amphetamine administration. *Brain. Reserch.*, 121:196, 1977.

McILWAIN, H.; BACHELARD, H.S.: *Biochemistry and the central nervous system.* Churchill-Livingstone, London, 1972.

McILWAIN, H.; BUDDLE, A.H.: *Techniques in tissue metabolism: A mechanical Chopper.* *Biochem. J.*, 53:412, 1953.

NAHORSKI, S.R.; ROGERS, K.S.: “In vivo” effects of amphetamine on metabolites and metabolic rats in brain. *J. Neurochem.*, 21:679, 1973.

NAHORSKI, R.R.; ROGERS, K.J.: The role of catecholamines in the action of amphetamine and L-dopa on cerebral energy metabolism. *Neuropharmacology*, 14:283. 1975.

NAKAZAWA, S.; QUASTEL, J.H.: Effects of inorganic salts and of ouabain on some metabolic responses of rat cerebral cortex slices to cationic and electrical stimulations. *Can. J. Biochem.*, 46:355, 1968.

NENE, K.A.; NENE, R.L. (Editors): *The dopamine receptors.* Humana Press, New York, 1996.

NIEUWENHUYS, R.: Chemoarchitecture of the Brain. Springer Verlag., Berlin, 1985.

O'DOWD, B.F.: Structures of dopamine receptors. *J. Neurochem.*, 60:804, 1993.

PALATINI, P.: Mechanism of inhibition of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase by tricyclic antipsychotics. *Mol. Pharmacol.*, 13:216, 1977.

PALMER, G.M.; CAMERON D.J.: Use of intravenous midazolam and clonidine in cyclical vomiting syndrome: a case report. *Paediatr Anaesth*, 15(1):68-72, 2005.

PEET, K.M.S.: Use of pizotifen in severe migraine: a long-term study *curr. Med. Res Opin.*, 5:192-199, 1977.

PERRY, M.E.; HALES, C.N.: Factors affecting the permeability of isolated gar-cells from the rat to (42 K) potassium and (63 Cl) chloride ions. *Biochem. J.*, 117:615, 1970.

PIERANGELI, G. ET AL.: Which therapy for which patient? *Neurol Sci.* 27 Suppl 2:S153-8, 2006.

PLOTKINE, M.; BOULOU, R.; GUENIAU, G.; HUIDOBRO, H.; ROSSIGNOL, P.: Acción de diversos agonistas dopaminérgicos sobre el PO₂ cerebral del cortex cerebral. *Arch. De Farmacol. y Toxicol.*, 4:69, 1978.

POST, R.L.: *Regulatory Functions of Biological Membranes*, (ed. J. Jarnefelt) Elsevier, Amsterdam pp 163, 1968.

DePOVER, A.; GODFRAIND, T.: Propietes Biochimiques et pharmacologiques of the (Na⁺ K⁺) ATPase, Mises an point de vue pharmacologique 2s serie. Masson et Cie, Paris, 1979.

PRADALIER, A.; BRION, N.; SERRIE, A.; BAUDESSON, G.: Treatment of cluster headache. *Douleurs*, 4(3):141-149, 2003.

PRINGSHEIM MD MSC, T.; ET AL.: Prohylaxis of migraine headache. CMAJ. 182(7): 269-276, 2010.

QUASTEL, J.H.: Metabolic effects of some psychopharmacological agent in brain "in vitro". Principles of Psychopharmacology. ed. by Clark W.G. and Giudice, J. Academic Press, New York, 1970.

QUASTEL, J.H.: Effects of Drug son energy metabolims of the brain and cerebral transport. Handbook of Psychopharmacology, 5:1, 1975.

RABADÁN, F.; MARDOMINGO, M^a.J.; VELASCO, A.; GARCÍA DE JALÓN, P.D.: Effect of melanotonin on the oxygen consumption and cerebral glucose of rat brain "in vitro". Il farmaco Ed prat., 31:238, 1976.

RAHIMTOOLA, H. ET AL.: Incidence and determinants of antidepressants drug use in migraine patients. International Clinical Psychopharmacology, 18/6:331-339, 2003.

RANGARAJ, N.; KALANT, H.: Effects of ethnl withdrawal, stress and amphetamine on rat brain (Na⁺ K⁺) ATPase, Biochem. Pharmac., 27:1139, 1978.

ROBINSON, G.A.; BUTCHER, R.W.; OYE, I.; MORGAN, E.W.: The effect of epinephrine on adenosine 3'5' phosphate levels on isolated perfused rat heart. Molec. Pharmacol. 1:168, 1965.

ROBINSON, G.A.; BUTCHER, R.W.; SUTHERLAND, E.W.: Adenylcyclase as an adrenergic receptor. Ann. N.Y. Acad. Sci., 139:703, 1967.

ROMO, E.; VELASCO, A.; HERREROS, B.; VÁZQUEZ DE PRADA, J.: Efecto de un derivado metIlhidrazínico sobre la respiración celular. R. Esp. Fisiol., 25:61, 1969.

ROMO, E.; VELASCO, A.; VÁZQUEZ DE PRADA, J.: Efecto del tromexano sobre la respiración celular y consumo de glucosa. R. Esp. Fisiol., 25:175, 1969.

ROSSITER, R.: Metabolism of the nervous system. Edited by Ritchter pag 355, Pergamon Press, 1957.

ROUFOGALLIS, B.D.: Comparative studies on membrane actions of depressant drugs: The role of lipophilicity in inhibition of brain sodium and potassium stimulated ATP ase. J. Neurochem., 24:51, 1975.

RUSSELL, G.; ABU-ARAFEH, I.; SYMON, D. N.: Abdominal migraine: evidence for existence and treatment options. Paediatr Drugs, 4(1):1-8, 2002.

RUTLEDGEL, Ch.O.: Effect of metabolic inhibitors and ouabain on amphetamin and potassium induced release of biogenic amines from isolated brain tissue. Biochem. Pharmacol., 27:511, 1978.

SAIZ, J.; SÁNCHEZ, M^a.A.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Effect of clozapine on the oxygen uptake, glucose uptake and oxydative phosphorylation of rat brain “in vitro”. Il Farmaco Ed. Sci., 35:691, 1980.

SÁNCHEZ GARCÍA, A.; SAIZ, J.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Efecto de algunos fármacos simpaticomiméticos de acción directa sobre metabolismo oxidativo de cerebro de rata “in vitro”. Arch, de Farmacol. y Toxicol., 5:287, 1979.

SÁNCHEZ GARCÍA, A.; SAIZ, J.; GONZÁLEZ, J.L.; VELASCO, A.: Efecto de agonistas alfa y beta adrenérgicos sobre el consumo de oxígeno de cerebro de rata “in vitro”. Arch de Farmacol. y Toxicol, 7:253, 1981.

SÁNCHEZ MAYOR, M.J.: Efecto de anfetamina sobre el Metabolismo oxidativo de cerebro e hígado de rata “in vitro”. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Madrid, 1981.

SAWAS,A.H.; GILBERT, J.C.: The effects of dopamine agonists and antagonists on Na⁺, K⁺- ATPase and Mg⁺⁺ ATPase activities of synaptosomes. Biochem. Pharmac., 31:1531, 1982.

SCATTON, B.; ZIVKOVIC, B.; DEDEK, J.: Antidopaminergic properties of yohimbine. *J. Pharmacol.*, 215:494, 1980.

SCHANBERG, S.M.; SCHILDKRAUT, J.J.; KOPIN, I.J.: The effects of psychoactive drugs on norepinephrine 3H metabolism in brain. *Biochem. Pharmacol.*, 16:393, 1967.

SCHÜRKS, M. ET AL.: Update on the prophylaxis of migraine. *Curr Treat Options Neurol.* 10(1):20-9, 2008.

SCHWARTZ, D.: *Statistique Biologique*. Flammarion, Paris, 1961.

SCHWARTZ, A.; LINDENMAYER, G.E.; ALLEN, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase; pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, 27:1, 1975.

SEABROOK, G.: Dopamine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 111:391, 1994.

SEEMAN, P.: The membrane action of anesthetic and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.*, 24:583, 1972.

SEEMAN, P.: Atypical Neuroleptics: Role of multiple receptors, endogenous dopamine and receptor linkage. *Acta Psychiatr. Scand.* 82 (Suppl.358):14, 1990.

SEEMAN, P.; VAN TOL, H.H.M.: The dopamine receptors pharmacology. *Trends Pharmacol, Sci.* 15:264, 1994.

SEEMAN, P.; STAIMAN, A.; LEE, T.; CHAU-WONG, M.: The membrane actions of tranquilizers in tardive discinesia. Phenothizines and structurally related-drugs. Edited by J.S. Forrest C.S. Carrand, E. Usdin Raven Press New York, 1974.

SEIGEL, C.J.; ALBERTS, R.W.; AGRANOFF, B.W.; KATZMAN, R. (Editors): *Basic Neurochemistry*, 3rd Edition, Little Brown Co. Boston, 1981.

SHRIQUI, C.H.L.; NASTALLAH, H.A. (Editores): Aspectos actuales en el tratamiento de la esquizofrenia, EDIMSA, Madrid, 1996.

SIBLEY, D.R.; MONSANA, F.J.: Molecular biology of dopamine receptors. *Trend. Pharmacol. Sci.* 13:61, 1992.

SILBERSTEIN, S.D.: Migraine. *Lancet*, 363:381-391, 2004.

SILCOCKS, P. ET AL.: P3MC : a double blind parallel group randomised placebo controlled trial of Propranolol and Pizotifen in preventing migraine in children. *Trials*, 16 ;11 :71, 2010.

SKOLNIK, K.; TAKACS, L.; SZENDE, E: "In vitro" oxygen consumption of slices from kidney, brain cortex and liver in hipoxia. *Nature (Lond.)*, 209:5020, 1966.

SNEDECOR, G.W.: Métodos Estadísticos. C.E.C.S.A. Mejico D. F., 1964.

SNOW, V. ET AL.: Pharmacologic management of acute attacks of migraine and prevention of migraine headache *Ann. Intern. Med.*, 137:840-849, 2002.

SOKOLOFF, P.; SCHWARTZ, J.C.: Novel dopamine receptors half a decade later, *Trends Pharmacol. Sci.* 16:270, 1995.

SOLS, A.; DE LA FUENTE, G.: Glucosa oxidasa en análisis. *R. Esp. Fisiol.*, 13:231, 1957.

SORIA, B.; CEÑA, V. (EDITORS): *Ion Channel Pharmacology*, Oxford University Press, Oxford, 1998.

SPEIGHT, E.M.; AVERY, G.S.: Pizotifen (BC-105): A review of its pharmacological properties and its therapeutic efficacy in vascular headaches. *Drugs*, 3:159-203, 1972.

SPIRES, D.D.; WEINER, M.W.: Use of an uncoupling agent to distinguish between direct stimulation of metabolism and direct stimulation of transport: investigation of antidiuretic hormone and aldosterone. *J. Pharmacol. Exp Ther.*, 214:507, 1980.

STARK, R. J. ET AL.: Management of migraine in Australian general practise. *Med. J. Aust.*, 6;187(3):142-6, 2007.

STARKE, K.; ALTMAN, K.P.: Inhibition of adrenergic neurotransmission by clonidine: an action on prejunctional alpha receptors. *Neuropharmacology*, 12:339, 1973.

STRANGE, P.: New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem. Int.*, 22:223, 1993.

STANGE, P.G.: Dopamine D4 receptors: curiouser and curiouser, *Trends Pharmacol Sci.* 15:317, 1994.

STANGE, P.G.: Dopamine receptors: studies on structure and function, *Adv. Drug. Res.*, 28:313, 1996.

SUGRUE, M.F.: Do antidepressants possess a common mechanism of action? *Biochem. Pharmacol.*, 23:1811, 1983.

SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W.: The relation of adenosine 3'5' phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.*, 12:265, 1960.

SYMON, D.N.K.: Is there a place for "abdominal migraine" as a separate entity in the IHS classification. *Cephalalgia*, 12:345-346, 1992.

SYMON, D.N.K.; RUSSEL, G.: Double blind placebo controlled trial of pizotifen syrup in the treatment of migraine. *Arch. Dis. Child.*, 72:48-50, 1995.

SYMON, D.N.K.; RUSSELL, G.: Abdominal migraine: a syndrome defined. *Cephalalgia*, 6:223-228, 1986.

TALLARIDA R.; JACOB L.Y.: The dose-response relation in Pharmacology. Springer Verlag New York, Heidelberg, 1979.

TAMARGO, J.L.: Canales de sodio sensibles a voltaje. En "Farmacología de los canales iónicos", monografía Dr. Antonio Esteve, editada por A. G. García, pags. 53-61, Barcelona, 1995.

TAMARIT, J.: Acción del K sobre la respiración de cortes de cerebro. Actas de la V Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, pag 303, 1959.

TAMARIT, J.; SANZ, G.: El método estadístico en Biología. Espasa Calpe, S.A. Madrid, 1942.

TAMARIT, J.; MÉNDEZ, J.: Acción de la imipramina sobre la respiración de cortes de cerebro. Anales del Instituto de Farmacología Española, II:215, 1963.

TOBIN, T.; AKERA, T.: Interaction of ouabain and cassaine with Na^+K^+ ATP ase and its relationships to inotropic actions, in Drug action at the Molecular level. Edited by Roberts, G.C.K. p.: 213 MacMillan Press Ltd London, 1977.

TOBIN, T.; AKERA, T. BASKIN, S.J.; BRODY, T.M.: Calcium ion and sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase: its mechanism of inhibition and identification of the E 1-P intermediate. Mol. Pharmacol, 9:336, 1973.

TYLOR, P.M.: Oxygen consumption in new born rat. J. Physiol. (Lond.) 154:153, 1972.

UMBREIT, W.W.; BURRIS, R. M.; STAUFFER, J.F.: Manometric and Biochemical Techniques. Burgess Publishing Co. 5th Edition Minneapolis, 1972.

USDIN, E.; BUNNEY, Jr. W.E.: Pre and Postsynaptic Receptors. Marcel Dekker, Inc. N.Y., 1975.

VASCONCELLOS, E.: A review of the pharmacologic treatment of migraine in children. Rev. Neurol., 37/3:253-259, 2003.

VELASCO, A.: Mecanismo de acción de los fármacos psicotrópicos. Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina y Cirugía, 17 de noviembre de 1995, Valladolid.

VELASCO, A.: Mecanismo de acción de los neurolépticos. Ponencia presentada al Congreso Internacional de Psicosis. Palencia, abril de 1997.

VELASCO, A.: Farmacología general de los canales iónicos dependientes del voltaje. En Velasco, A.; San Román, L.; Serrano, J.S.; Martínez-Sierra, R.; Calavid, M^o. J.: Farmacología fundamental, 427-437, McGraw Hill, Interamericana, Madrid, 2003.

VELASCO, A.; ÁLVAREZ, F.J.: Compendio de Psiconeurofarmacología. Ediciones Díaz de Santos. Madrid (1988).

VELASCO, A.; ARÉVALO, J.M. Y ARMIJO, M.: Effect of Meclocualone on the oxygen and glucose uptake by rat brain tissue "in vitro". *Experientia*, 28:934, 1972.

VELASCO, A.; ARÉVALO, J.M.; SAN MARTÍN, J.; ARMIJO, M.: Efecto de algunos psicofármacos sobre el consumo de oxígeno y glucosa de cerebro de rata "in vitro". *R. esp. Fisiol.*, 29:672, 1973.

VELASCO, A.; DUEÑAS, A.; ARRANZ, M^a.T.; PÉREZ-ACINO, C.M^a.: Efecto de histamina, serotonina y antagonistas sobre el consumo de oxígeno de cerebro de rata "in vitro". *Rev. Esp. Neurol.*, 7:225, 1992.

VELASCO, A.; DUEÑAS, A.; GARCÍA, J.L.; ARRANZ, M^a.T.: Efecto de serotonina y algunos antagonistas sobre el metabolismo oxidativo cerebral de rata "in vitro". *Anales de la Real Academia de Medicina de Valladolid*. 22:224, 1984.

VELASCO, A.; DUEÑAS, A.; GARCÍA, J.L.: Effects of several neuroleptics antidepressants and moniamine uptake blockers on ATPase activity and related oxygen uptake in rat brain "in vitro" *Meth and find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 11:737, 1989.

VELASCO, A.; GONZÁLEZ, J.L.: Efecto del diclorhidrato de histamina sobre la actividad oxidativa cerebral. *Anales de la Real Academia de Medicina de Valladolid*, 18:207, 1980.

VELASCO, A.; GONZÁLEZ, J.L.: *Compendio de Psicofarmacología en Psiquiatría*. Castilla C director Tomo II 2ª Edición. Pag 435. Alianza Editorial. Madrid, 1992.

VELASCO, A.; HOLGADO, E.R.; GARCÍA, J.L.; DUEÑAS, A.: Effect of loxapine and amoxapine on oxidative metabolism of rat brain "in vitro". *Arch. de Farmacol. y Toxicol.*, 11:117, 1985.

VELASCO, A.; LORENZO, P.; GARCÍA DE JALÓN, P.D.: Effect of sulpiride on oxygen uptake by rat brain tissue "in vitro". *Experientia*, 29:1100, 1973.

VELASCO, A.; PÉREZ, R.; GONZÁLEZ, J.L.; SAIZ, I.; MORENO, A.: Effect of dibenzepin hydrochloride on the oxygen, glucose uptake and oxidative phosphorylation of rat "in vitro". *Il Farmaco Ed. Sci.*, 32:672, 1977.

VELASCO, J.L.; ARÉVALO, J.M.; SAN MARTIN, J.; VELASCO, A.: Efecto del citrato de propaxolina sobre el consumo de oxígeno de algunos tejidos de rata "in vitro". *Acta reumatológica*, 1:41, 1974.

VICTOR S.; RYAN, S.W.: Drugs for preventings migraine headaches in children. *Cochrane Database Syst Rev.*, (4):CD002761, 2003.

WEATHERALL, M.: Drugs and excitable cell membranas. En *Recent Advances in Pharmacology*. Robson, J.M. and Stacey, R.S. (Eds.) 4th Edition, pag. 1-27, Churchill, London, 1968.

WEYDERT, J.A.; BAIL, T.M.; DAVIS, M.F.: Systematic review of treatments for recurrent abdominal pain. *Pediatrics*, 111(1):e1-11, 2003.

WHITTAM, R.; BLOND, D.H.: Respiratory Control by an adenosime triphosphatase involved in active trasportin brain cortex. *Biochem. J.*, 92:174, 1964.

WILDBRANDT, W.: Active transport. In Physiological and Pharmacological Biochemistry, vol 12:113 Butterworth and Co. Ltd. London, 1975.

WORAWATTANAKUL, M.: Abdominal migraine: prophylactic treatment and follow-up. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 28:37-40, 1999.

WU, P.H.; PHILLIS, J.W.: Methergoline antagonism of 5 hydroxytryptamine induced activation of rat cerebral cortical (Na^+ K^+) ATP ase. J. Pharm. Pharmacol., 31:780, 1979.

WU, P.H.; PHILLIS, J.W.: The effect of noradrenalin on Na^+ - K^+ transport in rat cerebral cortical slices. Europ. J. Pharmacol., 69:529, 1981.

YOUNG, R. ET AL.: Pizotyline effectively attenuates the stimulus effects of N-Methyl-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). Pharmacology, Biochemistry and Behaviour, 82:404-410, 2005.