

## ESTADO ACTUAL DE LA BIOQUÍMICA DE LOS NUEVOS MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS \*

Dr. P. PUIG MUSET

Miembro Corresponsal de la Real Academia de Medicina de Barcelona

**L**a terapéutica farmacológica de la tuberculosis está dando, en estos últimos años, unos avances tan considerables que hacen prever que, a no tardar, se lograrán curaciones equiparables a las que ya se obtienen actualmente en muchos procesos infecciosos agudos, pese a que en esta enfermedad el proceso infectivo va condicionado por múltiples otros factores concomitantes de gran trascendencia.

Los hitos que recientemente han marcado la estreptomycinina primero y el PAS y TBI después, señalan una trayectoria que con el más reciente de la hidracida isonicotínica parece que van a conducirnos hacia la droga terapéuticamente adecuada al fin buscado.

Es nuestro deseo, en esta charla, esbozar este camino en vistas a las posibles deducciones que pueden obtenerse. O sea, lo mismo que en el curso de 1949 hicimos, aquí mismo, tomando sólo como punto de referencia la estreptomycinina (1).

Para ello estudiaremos la actual novedad para después relacionarla con los anteriores jalones y ver de presumir las próximas etapas.

Con respecto a la hidracida del ácido isonicotínico, expondremos en primer lugar el proceso de su descubrimiento, ya que sobre el mismo existe algo de confusión y a la par, ello nos conducirá mejor a la comprensión del camino que estamos siguiendo.

El punto de partida fué el deseo de superar la actuación del TBI. Este importante fármaco, descubierto por el investigador alemán DOMAGK,

---

\* El presente escrito corresponde a los conceptos y guión que nos sirvieron de base para la conferencia que pronunciamos en fecha 6 de mayo de 1952; si bien en su texto hemos tenido en cuenta los posteriores datos bibliográficos que apoyan tales conceptos.

Conjuntamente a aquella exposición, iniciamos los estudios experimentales conducentes a obtener un nuevo compuesto químico que superase la acción de la hidracida del ácido isonicotínico, y tras un impropio trabajo de equipo, en el que destacan en primer lugar varios profesores de nuestra Universidad y, posteriormente, prestigiosos clínicos, llegamos a la concepción, obtención y ensayo de la hidracida del ácido cianacético, cuerpo considerablemente diferente al anterior y que manifiesta la superioridad de acción perseguida.

Para su conocimiento nos remitimos a las primeras publicaciones que sobre ellos hemos efectuado.

P. Puig Muset: "Estudio inicial sobre la Hidracida del Acido Cianacético". *Nascencia* V, octubre 1952.

F. García Valdecasas, J. A. Salvá y Puig Muset: "Contribución al estudio de nuevos quimioterápicos antituberculosos: la hidracida del ácido cianacético". *Med. Clín.* 19, 275, 1952 (octubre).

dió lugar a un sin fin de estudios químicos para mejorar y ampliar su actuación. Ello es comprensible, ya que de este producto se señalaba concretamente a una fracción (la tiosemicarbazona) como la que condicionaba su actividad; se buscaba, pues, adicionar a esta fracción activa otra que asimismo lo fuese, y así multiplicar su actuación total. Ello se podía hacer, y se hizo, añadiendo al producto inicial unas nuevas cadenas o funciones, o también substituyendo el ciclo benzénico, que era, al parecer, la fracción inactiva, por otros que tuvieran actuación propia.

Este último procedimiento es el que siguieron LEVADITTI, GIRARD y colaboradores (4), y para la substitución del ciclo benzénico adoptaron el heterociclo piridina, tomando en consideración unos estudios que, en el año 1945, había efectuado el investigador, asimismo francés, CHORINE, con la amida del ácido nicotínico (2).

El anillo piridínico ya se había ensayado asimismo como constituyente de otros fármacos antituberculosos, por varios investigadores, entre ellos por CORPER, COHN y FREY (3) y siempre se abandonó tras los primeros ensayos. Los últimos autores citados indican que sus productos, al inyectarlos, "producían úlceras locales", lo que no era un buen principio para un producto en cuyo cometido debía de haber la mejoría de las lesiones cavernosas o ulcerosas de la lesión tuberculosa.

Pero LEVADITTI (4), como decíamos, tomó en consideración el estudio de CHORINE por su indicación de que la amida isonicotínica, denominada también vitamina PP, tenía una acción bacteriostática sobre el bacilo de Koch. Más adelante, otros investigadores demostraron que tal acción era mínima y de nulo interés terapéutico, ya que, por ejemplo, según MACKENZIE, para lograr efectos perceptibles en el hombre hubieran sido precisas dosis del orden de 125 gr. al día (5).

A pesar de ello, la premisa de LEVADITTI y GIRARD de hacer un cuerpo derivado conjuntamente de la amida nicotínica y la tiosemicarbazona, era aceptable y podía darse el caso de obtener un cuerpo de acción muy superior a la suma de los dos.

Sintetizaron, pues, la nicotinaldehida-tiosemicarbazona, la que designaron con la anotación G-469, y encontraron en su estudio una acción bacteriostática que, tanto "in vivo" como "in vitro", se mostraba superior al TBL. Pero mientras LEVADITTI estaba en el estudio concreto de ese cuerpo, a los investigadores GRUNBERG y LEIWANT (6) se les ocurrió repetir el mismo ensayo, pero ampliando el estudio a los otros isómeros posibles del anillo piridínico. O sea, los siguientes: tiosemicarbazona del nicotinaldehido, del isonicotinaldehido y del picolinaldehido, o sea, los isómeros, o también las substituciones en el carbono 2, 3 y 4, respecto al nitrógeno.

El resultado de este estudio aportó otro paso de gran importancia: la

tiosemicarbazona derivada del aldehídoisonicotínico era muchísimo más activa que la de los otros dos isómeros. Se dejaba, pues, al margen en las futuras investigaciones los derivados nicotínicos y picolínicos y con ellos se desechaban, una vez más, los resultados de CHORINE, pese a que, en un momento dado, habían servido para llegar a las conclusiones siguientes.

El criterio de los bacteriólogos y farmacólogos, pues, había llegado hasta plantear la obtención de la tiosemicarbazona del aldehídoisonicotínico que resultaba fuertemente activa.

Se había encargado de la síntesis de tal cuerpo al prestigioso químico H. H. Fox y éste tuvo que seguir el siguiente proceso químico para llegar al cuerpo deseado (7):

Primera fase: obtención del ácido isonicotínico a partir de la oxidación de la metilpiridina. Segunda fase: obtención de la hidracida del ácido isonicotínico, lo que hizo siguiendo la técnica ya descrita en 1912 por

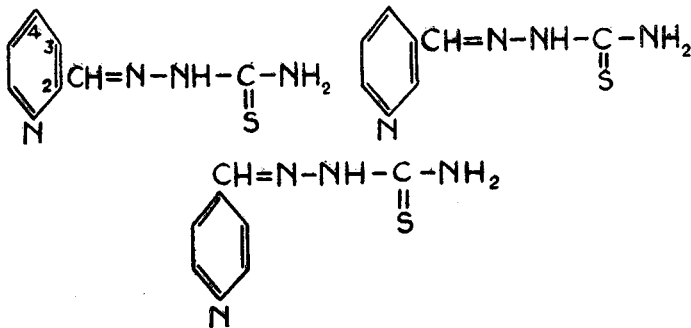


Fig. 1

MEYER y MALLY (8). Tercera fase: tratando a esta hidracida por el  $\text{SO}_2\text{Cl}$  se forma la benzenosulfamilhidrazina. Cuarta fase: según una modificación de la reacción de MAC FADYEN y STEVENS (9), tratando a aquel cuerpo por álcali en presencia de tiosemicarbazida, se forma el aldehídoisonicotínico de la tiosemicarbazona. O sea, el cuerpo que se proponía obtener.

Pues bien, a FOX mismo, según se cree, se le ocurrió ensayar conjuntamente con el cuerpo final los cuerpos intermediarios de las fases segunda y tercera: o sea, la hidracida isonicotínica y la benzenosulfanilhidracida. Y el resultado fué que mientras el último no manifestó la menor actuación, la hidracida del ácido isonicotínico manifestó una actuación muy superior al cuerpo que se habían propuesto obtener.

Se llegó, pues, al cuerpo más activo por una serie de factores al margen de una directriz previamente establecida, ya que cuando los bacteriólogos decidieron ensayar la tiosemicarbazona del isonicotinaldehído no pre-

vieron que para llegar a éste pasarían por los otros cuerpos que acabamos de señalar.

En 1907, EHRLICH decía: "El que quiera hacer quimioterapia tendrá que comprender que el encontrar cualquier substancia que tenga acción contra una infección precisa será cosa siempre de la casualidad". Nosotros no podemos decir que el descubrimiento de la hidracida isonicotínica sea "una simple casualidad", ya que, muy al contrario, en su hallazgo se manifiesta un criterio de observación científica muy elevado, que no deja resquicios sin explorar, pero sí se puede comprobar que en tal descubrimiento han intervenido factores no previstos en el planteamiento de la concepción previa.

Creemos que, con estos antecedentes, se puede perfectamente deducir cómo en la paternidad de la hidracida isonicotínica son varios los que han contribuido en forma decisiva, empezando por DOMAGK, al plantear las primeras tiosemicarbazonas y terminando por FOX al obtenerla como paso de síntesis de nuevas tiosemicarbazonas.

Si otros Laboratorios industriales o de investigación llegaron a este mismo resultado por distintos caminos, ello cabe en lo posible, pero no existe ninguna serie de publicaciones que, como en el caso anterior, permita exponer documentalmente su génesis.

Una vez en posesión de la hidracida isonicotínica, los investigadores de América ensayaron conjuntamente otra serie de hidracidas, viendo cómo la isonicotínica sobresalía en actuación a todas las experimentadas. Estos ensayos conjuntos fueron, sin embargo, un poco superficiales, ya que, por ejemplo, del ensayo de sólo cinco hidracidas alifáticas establecieron que "ninguna hidracida alifática muestra actividad apreciable en el ratón" (10).

A propósito de los derivados alifáticos, hay que hacer constar que en el pasado mes de febrero, cuando la algarabía propagandística irrumpía sobre la hidracida isonicotínica, aparecía en la revista *Journal of Experimental Medicine* un magnífico estudio de HIYCHS y DUBOS (11), describiendo el aislamiento del factor responsable de que en los focos tuberculosos se produzca una inhibición de su desarrollo por destrucción bacilar, o sea, del primer componente de las defensas orgánicas obtenido al estado químicamente puro, y este cuerpo pertenece a la serie alifática, ya que se trata de la espermina, una triamina de cadena lineal de carbonos.

Pero, al margen del anterior estudio, en todas las exposiciones que más adelante se hicieron sobre la hidracida isonicotínica, ya sea en sentido médico, paramédico o simplemente publicitario, incluyendo la exposición oficial que hizo el "American Trudeau Society" (12), se puso de relieve,

en primer término, un parentesco del nuevo fármaco con el ácido nicotínico e isonicotínico, quedando en segundo plano la función hidracida y la configuración geométrica de la molécula total.

En Alemania, por el contrario, fueron más precavidos. Así vimos que, en el primer trabajo de OFFE, SIEFKEN y DOMACK (13), que aluden a la hidracida isonicotínica, presentan asimismo conjuntamente otros cuerpos de este tipo activos, y dicen: "Reconocemos precisamente que la configuración R.CX.  $\text{NH-N}=\text{C.R}_2$ . R1. es una parte integrante de todos los derivados de la hidracina tuberculostáticos, conocidos hasta ahora. Esta fórmula puede cerrarse en anillo por las substituciones R. R1. Y más adelante dicen: "El hecho de que el Neoteben ya es activo como hidrácida libre, puede posiblemente encontrar su explicación en el hecho de que, dentro del organismo, puede reaccionar con unas oxo-combinaciones propias al cuerpo. En pro de esto habla el que son activas no sólo oxo-combinaciones heterogéneas cíclicas como derivadas del Neoteben, sino que, por ejemplo, el derivado de glucosa del Neoteben, contra todas las esperanzas, obra bien".

O sea, dejan completamente de lado el anillo piridínico para fijar su atención sobre la fracción hidracínica y especular sobre su posible metabolismo y actuación.

Y DOMACK, en conferencias posteriores dadas en España, adujo su experiencia de que el ácido isonicotínico aislado actúa precisamente como un factor de crecimiento del bacilo de Koch. Este gran investigador acepta, asimismo, el hecho de que la presencia del azufre no es necesaria para la acción tuberculostática, cosa que anteriormente había sostenido a rajatabla en los primeros estudios sobre el TBI.

Permítasenos aquí mencionar que nosotros, en una nota adicional que hicimos en el capítulo del libro sobre estreptomycin, señalábamos que la tiosemicarbazona, de la que entonces se empezaba a hablar, podía tener cierta semejanza con la agrupación diguanidínica de la estreptomycin, o sea, tomando en consideración sólo las agrupaciones nitrogenadas y dejando aparte el azufre (1).

Pero si dejamos de examinar meticulosamente los criterios personales de quienes expusieron por primera vez la hidracida isonicotínica, y después de darles las gracias por su brillante aportación contemplamos ésta en su estructura química total, veremos como "a posteriori" pueden encontrarse datos en favor de que sea precisamente su estructura altamente activa. Sin entrar en detalles, observemos simplemente como, de todos los cuerpos anteriormente ensayados, los que más sobresalieron y llegaron hasta la clínica, tienen precisamente una estructura "para": recordemos el

TB1 o tiosemicarbazona del aldehído P-acetaminobenzoico, el PAS o ácido para-aminobenzoico, las fenacinas, las pirazinas, y todas las más activas diaminas de la serie aromática, etc.

Y ello es todavía más evidente si en vez de adoptar esta terminología abstracta concretamos que el decir "para" implica decir que dos funciones químicas distan entre sí la distancia de la diagonal que separa los dos carbonos opuestos de un ciclo benzénico, o sea, lo que en realidad es una distancia del orden de 5 Ångstroms.

A este tipo de distancia se encuentran las funciones de algunos constituyentes del bacilo de Koch, tales como el Fticol y posiblemente en las cadenas polipeptídicas de las tubérculo-proteínas en su cadena lineal o en sus agrupaciones elicoidales y globulares existen funciones a este tipo de distancias. Actualmente se admite que si un fármaco posee unas funciones activas a una distancia semejante a la existente en un componente fisiológico o microbiológico, puede producirse una interferencia que conduzca a su bloqueamiento e inactivación.

Veamos un ejemplo que nosotros hemos estudiado anteriormente a fondo. Es conocido que la d-tubocurarina bloquea las sinapsas neuromusculares, produciendo el relajamiento total de su tono.

La estructura molecular de la d-tubocurarina, como puede verse en la fórmula adjunta es extraordinariamente compleja, pero por antecedentes antiguos de que las substancias químicas con nitrógenos cuaternarios tenían una acción más o menos curarizante, se dió primordial importancia en la estructura de la d-tubocurarina a la presencia de los dos nitrógenos cuaternarios en ella existentes. Y la superioridad absoluta de su importancia sobre todas las otras múltiples funciones concomitantes la dieron los investigadores ingleses PATON y ZAIMIS (14), al obtener un cuerpo que sólo tenía los dos nitrógenos unidos entre sí por una simple cadena lineal de 10 carbonos, que daban en total la distancia de la Ångstroms, que es la existente entre los nitrógenos de la d-tubocurarina. Y este cuerpo, tan simplificado, mostraba una actuación curarizante igual a la curarina, mejor dicho, superior a igualdad de peso, ya que en ella no existía el "lastre" de las funciones inactivas.

Estudios de este tipo se conocen respecto a otras funciones fisiológicas y productos farmacológicos, tales como la acetilcolina, respecto al sustrato proteico acetilcolinoesterasa (15), la de algunos inhibidores enzimáticos respecto a las peptidasas y quimiotripsinas (16), en cuyas interferencias se han estudiado y medido el tipo de fuerzas columbianas y de Van der Wals que producen las atracciones y subsiguientes inhibiciones (17).

Es por todos estos datos y muchos más que se podrían aducir, por lo que reiteramos nuestra creencia, que ya expusimos en la conferencia del

pasado mes de marzo, de que las interdistancias nitrogenadas existentes en la hidracida isonicotínica, condicionan en gran parte su manifiesta actividad terapéutica.

Esta actividad farmacológica, como es sabido, se manifiesta en tres eslabones bien deslindados: primero, bacteriológicamente sobre los cultivos de bacilo de Koch; después, en la tuberculosis experimental del cobayo o ratón y, finalmente, en la clínica, que es definitivamente el punto de verdadero interés.

La actuación en el tubo de ensayo es evidente aún a altísimas diluciones, si bien en el título máximo no existe unanimidad de criterios. Así vemos que GRUNBERG y SCHNITZLER (18) dan una inhibición hasta dilu-

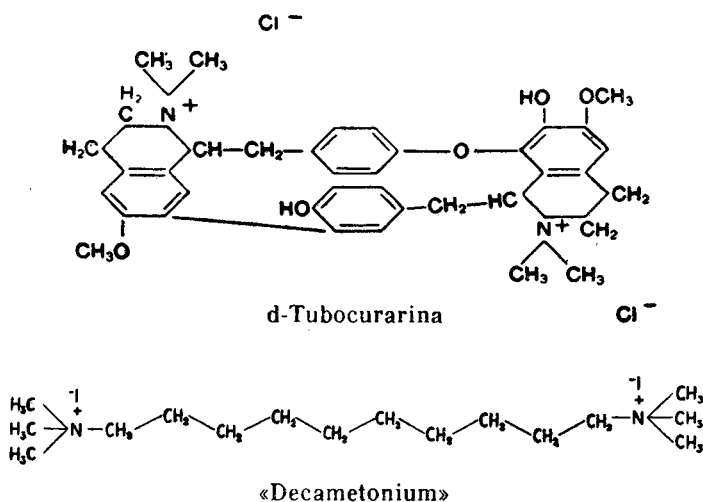


Fig. 2

ción de 1 x 60 millones; BERNSTEIN y colaboradores la fijan en 1 x 50 millones; STEENKEN y WOLINSKY (19) en 1 x 40 millones y 1 x 20 millones; FUST, STUDER y BOHNE (20) en 1 x 28 millones, y PÉREZ PARDO, ABELLÓ y LÓPEZ JUMAR en 1 x 2.500.000 (21). Claro está que estas diferencias vienen condicionadas por múltiples factores, especialmente raza del bacilo, medio de cultivo, temperatura, etc.

Esta acción bacteriostática es un dato interesante, pero por sí sólo posiblemente no explicaría la ulterior actuación clínica del producto, ya que existen antecedentes de sustancias con actuación muy evidente "in vitro" que posteriormente no actuaban en la experimentación animal. FINSTONE y colaboradores (22) ensayaron sin gran éxito sustancias que inhibían el

crecimiento bacilar hasta diluciones de 1 x 100 millones e inversamente, se conocen y utilizan con bastante eficacia cuerpos que tienen pequeñísima actuación "in vitro", tal como, por ejemplo, el PAS, cuya bacteriostasis, según DOMACK, no llega a 1 x 25.000 y la misma estreptomycin, que no pasa de 1 x 100.000.

Estos títulos bacteriostáticos, como decimos, si bien son un dato interesante, no explican toda su acción y, en efecto, ya se observa inmediatamente cómo en la experimentación animal estas diferencias tan grandes se acortan considerablemente, lo que ocurre mucho más al llegar a la clínica.

Por todo ello, queremos mencionar aquí, brevemente, algunos de los mecanismos que asimismo se pueden invocar para comprender mejor su acción terapéutica.

Uno de ellos es el que iniciaron CARL y MARQUARD (23) con la observación de que varios cuerpos tuberculostáticos son capaces de formar complejos con el ion cobre. Lo cual, unido al antecedente conocido de que en los tejidos tuberculosos existen un aumento del mencionado elemento metálico y los estudios de SCHUBERT, MAURER y RIEZLER (24) que demuestran que inyectando cobre marcado o radioactivo a animales tuberculosos y a otros sanos, éste se acumula preferentemente en los tejidos enfermos, especialmente en los pulmones.

El PAS da estos complejos, el TBI también y recientemente se ha visto que la hidracida isonicotínica y precisamente por su función hidracínica, da asimismo tales complejos (25).

La acción beneficiosa de estos complejos cúpricos vendría a ser especialmente porque el ion cobre es un activador de los fermentos oxidantes y prooxígenos, que condicionan la intensa acción catabólica que es tan evidente en el proceso tuberculoso (26).

El catabolismo exagerado de la afección tuberculosa, que llega incluso hasta la ulceración y desintegración hística, previo proceso inflamatorio, pone en juego, no sólo las oxidasas, sino todo el sistema de proteasas, ya que sin una acción proteolítica no es posible una ulceración endógena.

Tal inflamación y proteolisis viene condicionada ya sea por los componentes enzimáticos del bacilo infectante, ya porque los componentes de éste exaltan con su presencia los sistemas proteolíticos normalmente presentes en los tejidos afectados.

Hay abundantes datos clínicos y experimentales en favor de estas acciones proteásicas, de los que hicimos una mención bastante detallada en nuestra exposición del pasado mes de marzo (27). Sólo queremos señalar aquí los magníficos estudios de MILLER y colaboradores (28), los cuales demuestran que, para que la fracción proteo-tuberculínica del bacilo mani-



fieste acción citolítica sobre los leucocitos, es necesaria la presencia de una fracción de plasma de enfermos tuberculosos.

“Estos resultados —dijimos en aquella ocasión—, a través de los cuales se evidencia la necesidad de una acción conjunta de un constituyente plasmático con otro del bacilo para lograr una acción proteolítica —o patógena— única, es el mayor exponente experimental de lo que en realidad es el proceso clínico de la tuberculosis. Por otra parte, relata las especulaciones que se encuentran en los tratados de patogenia y bioquímica de la tuberculosis sobre la relativamente escasa actuación proteolítica del bacilo, cuando se estudia “in vitro”. Al aproximar una vez más los métodos de investigación hacia la realidad orgánica, se consigue una mayor comprensión del tema.”

Pues bien, en completa concordancia con estos datos, existe el antecedente de que el grupo hidracínico posee un alto poder inhibitor de la acción proteásica. Al investigador americano SCHALES y a sus colaboradores (29) se deben estos conocimientos, y en ellos se concreta que siempre esta acción anti-proteásica va unida a la característica de que los inhibidores son reactivos del grupo carbonilo (lo que es típico de las hidracinas), con lo que se matiza la forma en que tal inhibición se produce.

Al hacer esta referencia a una posible reacción química elemental entre la fracción hidracina y las funciones carbonilos de las proteasas u otros componentes, no implica en modo alguno que en su acción terapéutica ello sea tan simple. En efecto, en favor de que intervienen múltiples factores tenemos en primer lugar el hecho de que muchísimas otras hidracinas e hidracidas que se han ensayado no actúan como medicamentos antituberculosos.

Asimismo, de la hidracin-ptalizina que actúa como potente hipotensor, SCHROEDER, OLESEN y PERRY (30), que lo han estudiado detenidamente, creen que su acción asimismo es por inactivación de la angiotonina o ferantina, en cuya molécula proteica se había comprobado la presencia de funciones carboniles. Y las hidracidas tuberculostáticas no tienen acción apreciable sobre la presión sanguínea, y de la pthalacidine no conocemos datos, y si tiene algo de actuación ésta posiblemente sería mínima, de acuerdo con los estudios que sobre este grupo han efectuado BAVIN y colaboradores (31).

Indudablemente, como ya hemos anotado anteriormente, lo que tiene trascendental importancia para la actuación terapéutica es la molécula total, y de ésta, especialmente, las distancias entre sus grupos activos, quedando en el plano subsiguiente la función química de tales agrupaciones.

Es muy posible que en la intimidad hística la hidracida isonicotínica

se hidralice en hidracina y ácido isonicotínico. Y en su ulterior metabolización la primera se transforma en grupos amónicos. Es debido a esta final transformación en ion amonio, como muy acertadamente señala MORVILLO (32), el que a dosis altas las hidracidas tuberculostáticas manifiestan actuación excitadora sobre el sistema nervioso central, ya que el ion de referencia tiene acción específica en este sentido (33).

Que la sintomatología de los efectos secundarios era sobre el sistema nervioso central ya se apreció desde los primeros ensayos clínicos y experimentales, y lo confirmaba el hecho de que los barbitúricos e hipnóticos inhibían tales manifestaciones tóxicas (34).

Nosotros creemos haber aportado un dato afirmativo al criterio de MORVILLO al observar que la previa administración de glutamato sódico, que actúa sobre el ion amonio transformándose en glutamina, disminuye asimismo la acción tóxica de las grandes dosis de hidracidas.

La hipótesis de la acción de la hidracida isonicotínica sobre el sistema proteolítico y oxidásico hístico, con la consiguiente valoración de la importancia de éstos en la función tuberculosa, especialmente el primero, permite asimismo relacionar esta enfermedad orgánica con las depresiones psíquicas, en lo que muchos fisiólogos han hecho hincapié; asimismo en la mejora subjetiva o psíquica que aparece precozmente, en los enfermos tratados con las nuevas drogas. En efecto, JACOBS, WEST y TEMPEREAU (35), así como antes MAC FARLANE y VON KAULLA (36) y otros, han demostrado que existe una reacción contrastable entre el estado emocional y la intensidad proteolítica en sangre y tejidos. Todo lo cual, como recientemente señala UNGAR (37), entra de lleno en los aspectos del Stress, en lo cual no es nuestro deseo adentrarnos.

Por todos estos datos, creemos que con la nueva droga hidracida del ácido isonicotínico, se está logrando un gran avance en el tratamiento clínico de la tuberculosis, tanto por su valor intrínseco como por que, a partir de su estudio químico-físico y bioquímico, se podrán concebir nuevos productos que superen en la actuación al anterior.

### Bibliografía

- (1) P. PUIG MUSET: "Los Antibióticos, generalidades. La Estreptomina, propiedades físico-químicas". Conf. pub. en Ann. Medicina y Cir. XXIV, núm. 47, mayo 1949. Posteriormente, adicionada de importante nota, constituyó el capítulo II, "Bioquímica de la Estreptomina", del libro de J. Cornudella, "Contribución a la clínica de la Estreptomina". Edit. M. Servet. Barcelona, 1950.
- (2) V. CHORINE: "Action de la amide nicotinique sur les bacilles du genre "Mycobacterium". C. R. Ac. Soc. 220, 150, 1945.
- (3) H. S. CORPER, M. L. COHN y W. M. H. FREY: "A pyridine derivatives and experimental tuberculosis". Am. Rev. Tub. 60, 269, 1949.

- (4) C. LEVADITTI, A. GIRARD, A. VAISMAN y A. RAY: C. R. Ac. Sc. 231, 1.174, 1950.  
C. LEVADITTI, A. GIRARD, A. VAISMAN y A. RAY: "Comparison entre le G.469 de Girard y le TBI de Domagk du point de vue de leur activité antituberculeuse chez la souris". C. R. Soc. Biol. 145, 60, 1951.
- (5) D. MAC KENZIE, L. MALONE, S. KUSHNER, J. L. OLESON y SUBBAROW: "The effect of nicotinic acid amide on experimental tuberculosis of white mice". J. Lab. Clin. Med. 33, 1.249, 1949.
- (6) E. GRUNBERG y B. LEIWANT: "Anti-tuberculos activity "in vivo" of Nicotinaldehyde Thiosemicarbazone and its isomers". Pre. Sc. Exp. Biol. Med. 77, 47, 1951.
- (7) H. H. FOX: "The chemical approach to the control of tuberculosis". Science, 116, 129, 1952. — "Synthetic tuberculostats —III— Isonicotinaldehyde thiosemicarbazone and some related compounds". J. Org. Chem. 17, 555, 1952.
- (8) H. MEYER y J. MALLY: "Hydrazyn derivate der pyridincarbonsaure". Monatsch. J. Chem. 33, 393, 1912.
- (9) MC. FADYEN y STEVENS: "A news method for the conversion of acids into aldehydes". J. Chem. Soc. 584, 1936.
- (10) J. BERNSTEIN, W. A. LOTT, B. A. STEINBERG y H. L. YALE: "Chemoterapy of experimental tuberculosis. Isonicotinic acid hydrazide (Nydravid) and related compounds". Am. Rev. Tub. 65, 357, 1952.
- (11) J. C. HIRCH y R. S. DUBOS: "The effect of spermine on tubercule bacilli". J. Exp. Med. 95, 191, 1952.
- (12) *American Trudeau Society*: "Current status of isonicotinic Acid Hidrazide in the treatment of tuberculosis". Am. Rev. Tub. 65, 649, 1952.
- (13) H. A. OFFE, W. SIEFKEN y G. DOMAGK: "Neoteben, ein neues, hochwirksame tuberculostaticum und die beziehungen zwischen konstitution und tuberculostatischer wirksamkeit von hydrazin derivaten". Naturwies. 39, 118, 1952.
- (14) PATTON y ZAIMIS: "Actions and clinical assesement of drugs which produce neuromuscular block". Lancet, 2, 568, 1950. — "Farmacologie of curare and curarising substances". The J. of Pharm. and Pharmacol. 1, 273, 1949. — "Pharmacological actions of Decametonium iodide and related compounds". The J. of Phar. and Pharmacol. 2, 532, 1950.  
P. PUIG MUSET: "Mayor seguridad y eficacia en la curarización mediante el Decametonium y Anticude". Las últimas aportaciones de la farmacología. Nascentia, IV, oct. 1951.
- (15) D. NACHMANSON: "Metabolisme et fonction de la cellule nerveuse". Bull. Soc. Clin. Biol. 34, 447, 1952.
- (16) H. NEURATH, J. A. GLANDNER y G. DE MARÍA: "Structurals requeriments of inhibitor for  $\alpha$ -chymotrypsin". II. "Effects of chim length and ciclic substituents". J. Biol. Chem. 188, 407, 1951.
- (17) D. H. ADAMS y V. P. WHITTAKER: "The cholinostenses of human blood". II. "The forces acting between enzyme and substrare". Bioch et Biophys. Acta 4, 543, 1950.
- (18) E. GRUNBERG y R. J. SCHITZLER: "Studies on the activity of Hydrazine derivates of isonicotinic acid in the experimental tuberculosis of mice". Quert. Bull. of Sea View Hosp. 13, 3, 1952.
- (19) V. STEENKEN y E. WOLINSKY: "Antituberculous properties of hydrazines of isonicotinic acid (Rimifon, Marsalid)". Am. Rev. Tub. 65, 365, 1952.
- (20) FUST, STUDER y BOHNE, citados por B. FUST: "Orientierung über das antituberculoticum Rimifon "Roche". Sch. Med. Wosh. 82, 333, 1952.
- (21) PÉREZ PARDO, ABELLÓ y LÓPEZ JUMAR, citados por A. CRESPO ALVAREZ: "La terapéutica de la tuberculosis con hidracida del ácido isonicotínico y sus derivados". Proy. Terap. Clí. V, 689, 1952.
- (22) V. H. FEINSTONE: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63, 153, 1946. J. Pharmacol. 89, 153, 1947.  
P. PRATESI: Il Farmaco, 7, 177, 1952.
- (23) CARL y MARQUARD: Z. f. Naturforsch. 4, 280, 1949.  
KALKOFF: B. Klin. Tuberc. 101, 395, 1949.  
HAHN: 103, 55, 1950.  
HEILMEYER: Dtsch. Med. Woch. 94, 161, 1949.
- (24) SCHUBERT, MANRER y RIEZLER: Klin. Med. Woch. 26, 494, 1948.
- (25) S. FALLAB y H. ERLNMEYER: "Zur Kenntnis des Isonikotinsaurehydrazid —cu— Komplexes". Experientia, 8, 298, 1952.
- (26) M. BERCEL: "Antioxígenos y Tuberculosis: Mecanismo de acción del PAS, el TBI y el H. A. I.". Se. Med. (B. A.), 59, 130, 1952.

- (27) P. PUIG MUSET: "Datos bioquímicos de los nuevos agentes antituberculosos: Hidracida del Acido Isonicotínico". Conf. pron. en la Asoc. de Tisiol. de la Acad. de Ciencias Médicas de Barcelona, en 7 de marzo de 1952. Posteriormente public. en la Revista "Tórax" (Montevideo), vol. I, págs. 5-16, 1952 (Mayo).
- (28) J. M. MILLER y col.: "Nature of the plasma factor responsible for in vitro lysis of the leukocitos by tuberculo protein". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 287, 1949.
- (29) O. SCHALES, A. M. SOTHON, R. M. ROUX, E. LLOYD y SS. HALES: "Inhibition of enzymic proteolysis. I observations with carbonyl group reagents. Effect of hydrazine on peptic hydralisis". Arch. Bioch. 19, 119, 1948.  
O. SCHALES: "New inhibitors of enzymatic proteolisis". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 75, 1952.
- (30) H. A. SCHROEDER: "New Antihypersion drugs". J. A. M. A. 149, 297, 1952 (17-V.).
- (30) H. A. SCHROEDER y N. S. OLCEN: "Pressor substances in Arterial Hypertensión". J. Exp. Med. 92, 545, 1950.  
H. A. SCHROEDER: "Effect of I-Hydrazinophthalazine in Hypertension". Circulation, 5, 28, 1952.
- (31) E. M. BAVIN, D. J. DRAIN, M. SEDER y D. E. SEYMUR: "Some further studies on tuberculostatic compounds". J. Pharm. y Pharmacol. 4, 844, 1952.
- (32) G. MORVILLO: "Primeros datos farmacológicos sobre la Hidracida del Acido iso-nicotínico". Giorn. Ital. Tuberc. 6, 63, 1952.
- (33) P. PUIG MUSET: "La terapéutica farmacológica del retardo Mental". Medicina (Madrid). Agosto, 1948. — "Factores alimenticios y función del sistema nervioso: el ácido glutámico y otros metabolitos esenciales". Conf. en Cursillo "Farmacología Neurológica", dirigido por el Profesor F. García Valdecasas, en el Instituto Neurológico de Barcelona, abril 1950. Publicado en "Circular Farmacéutica", números 84-87, 88-91, 26-31 y 35, y 19-25. 1950-1951.
- (34) S. Y. P'AN, L. MARKAROGLU y L. REILLY: "The effects of barbiturates on the toxicity of Isoniacid (Isonicotinic Acid Hydrazide)". Am. Rev. Tub. 66, 100, 1952.  
P. FORNAROLI y M. KOLLER: "Rilievi sperimentali sulla tollerabilità dell'hydrazide dell'acido isonicotinico". II Fármaco, 7, 173, 1952.
- (35) J. S. L. JACOBS, P. M. WEST y C. E. TEMPEREAU: "Studies of proteolytic enzyme systems in patients with emotional disorders". Proc. Soc. Exp. Biol. Méd. 78, 410, 1951.
- (36) K. N. VON KAULLA: "Fibrinolisis terapéutica". Folia Clin. Int. 2, 181, 1952.
- (37) C. UNGAR: "Inflammation and its control". Lancet, II, 742, 1952.