

Laboratorios de Fisiología de la Facultad de Medicina
y del Instituto Cajal
(Prof. Dr. José María del Corral)

La insuficiencia coronaria provocada por la inyección de pentametilentetrazol (cardiazol) a dosis convulsionantes

por ANTONIO GALLEGO FERNÁNDEZ(*) y FRANCISCO DÍAZ GONZÁLEZ(**)

Recibido para publicar el 29 de julio de 1948

Todo aumento del trabajo del miocardio, que al organismo se imponga, trae como consecuencia un incremento en la irrigación sanguínea del corazón, debido a un mecanismo de adaptación del sistema coronario. En condiciones normales, este aumento en la irrigación coronaria es suficiente para proporcionar al corazón el plus de oxígeno que necesita. En determinadas circunstancias el aporte de oxígeno al miocardio puede, sin embargo, resultar insuficiente; REIN (17) ha llamado insuficiencia coronaria a esta perturbación. Esta insuficiencia puede ser debida: a que el sistema de aporte (vasos coronarios) se encuentre estrechado (estenosis coronaria, etc.); alteraciones en la composición de la sangre en sentido de una disminución en su tensión de oxígeno (anemia, intoxicación por el óxido de carbono, pequeña tensión de oxígeno por baja presión atmosférica, etc.); o a que el trabajo realizado sea tan considerable, que llegue a ser insuficiente el suministro de oxígeno, a pesar de funcionar bien el sistema de aporte. Sean unas u otras causas las que obren, en todos estos estados se origina una anoxemia del miocardio.

La insuficiencia coronaria de REIN se revela por los siguientes trastornos:

(*) Prof. Adjunto de Fisiología.

(**) Prof. Adjunto de Patología General.

1.º *Lesiones irreversibles del músculo cardíaco*, en forma de necrosis que fueron descritas por LUFT y SCHIRRMESTER (12), primeramente, y han sido dadas por BUCHNER (2) como características de los estados de anoxemia aguda del miocardio, es decir, de la «insuficiencia coronaria aguda».

2.º *Alteraciones típicas del electrocardiograma*, que en los casos de intensa falta de oxígeno se caracterizan por la aparición de un complejo ventricular monofásico deformado (GRUBER y KOUNTS) (7) GOLDENBERG y ROTBERGER (6), DIETRICH (4), OPEITZ y TILLAMNN (16), SCHIRRMESTER (21, etc.) mientras que si la carencia de oxígeno es ligera, únicamente se produce un descenso del espacio ST, por debajo de la línea isoelectrica (GOLDENBERG, ROTHBERGER y DIETRICH (4)). Estas alteraciones electrocardiográficas pueden desaparecer una vez que el estado de insuficiencia coronaria haya cesado.

3.º *Alteraciones metabólicas en el miocardio*, que se traducen por un considerable descenso del contenido en glucógeno, especialmente marcado en los casos en que la insuficiencia coronaria aguda grave llega a producir la muerte del animal (GALLEGO y DÍAZ GONZÁLEZ (5)).

Hemos querido averiguar en este trabajo, si las convulsiones podrían originar una insuficiencia coronaria en virtud del aumento de trabajo cardíaco que produce. Para ello, bajo la dirección y con la ayuda del Prof. Corral, hemos estudiado el efecto sobre los fenómenos que acabamos de indicar, de las convulsiones producidas en el animal por inyección de pentametilentetrazol (cardiazol).

MEESEN (14), ha encontrado en el miocardio del coneja necrosis diseminadas, así como alteraciones electrocardiográficas correspondientes a un estado de anoxemia aguda, a consecuencia de inyecciones de pentametilentetrazol a dosis convulsionantes. En cambio, HADORN y WALTHARD (8) en casos análogos, encuentran únicamente una vasodilatación del sistema caronario y atribuyen las necrosis vistas por MEESEN a *alteraciones post-mortem*. SARKADY (19), por su parte, ha estudiado las modificaciones de la irrigación coronaria del perro consecutivas a la inyección de pentametilentetrazol, mediante el «contador» de REIN, y llega a la conclusión de que tal fármaco, tanto a dosis pequeñas como a dosis convulsio-

nantes, produce un aumento de irrigación coronaria ; no debe pues existir lesión alguna de miocardio en estos casos.

En vista de estas divergencias creemos que no ha de carecer de interés el volver a estudiar este asunto.

TECNICAS

Nuestros experimentos han sido realizados en conejos de 0,8-2 kg. y gatos de 1-2 kg., todos ellos sometidos a alimentación corriente.

Los electrocardiogramas fueron obtenidos con el electrocardiógrafo portátil de Siemens. Se registraron inmediatamente después de los ataques convulsivos, y en algunas ocasiones — se trataba de conejos — previa anestesia con uretano. Usamos electrodos de aguja.

La presión arterial se midió con manómetro de mercurio.

Las determinaciones del glucógeno del corazón se hicieron siguiendo el método de TUTIN IRVING (23).

El examen histológico se hizo empleando los métodos de hematoxilinaeosina, Río Hortega, y las coloraciones electivas de grasa y glucógeno (SUDAN III y carmín de BEST).

RESULTADOS

Estudiamos primeramente los efectos del ataque convulsivo producido en el conejo por el pentametilentetrazol.

Se inyectó la substancia en la vena marginal de la oreja. La dosis mínima que produce convulsiones es de 0,05 gr. por kilogramo de peso según nuestra experiencia, coincidente con la de WATT y CAMP (24). Las cifras menores que tienen como dosis mínima convulsionante SCHOEN, ANOLT y HELAERS (9) y BLUME, no suelen provocar convulsiones, según hemos podido observar.

Dosis superiores a 0,05 gr. originan un estado convulsivo, que mata al animal tras un período de tiempo que variaba en los diversos animales.

Las inyecciones subcutáneas e intramusculares provocan también ataques convulsivos, pero más tardíamente, sólo tras un período de latencia de unos 5 a 10 minutos.

La inyección intravenosa va seguida, casi sin dar tiempo de terminar la inyección de un ataque típico que comienza

por una brusca y violenta contracción tónica de los músculos extensores de las patas que se colocan en extensión exagerada; la cabeza es extendida fuertemente hacia el dorso y las mandíbulas se contraen fuertemente. Tras un breve lapso de tiempo, que no suele pasar de 10 a 15 segundos, durante el cual el animal se va poniendo cianótico a causa de una detención de la respiración, comienza el período clónico caracterizado por contracciones bruscas y violentas de las extremidades y por un continuo masticar y rechinar de dientes característico. Suele haber intensa salivación y también incontinencia de orina.

El ataque dura de 4 a 6 minutos, cediendo luego momentáneamente para volver a comenzar en forma análoga un nuevo ataque, algo menos duradero e intenso que el anterior. Las convulsiones se repiten con intervalos cada vez mayores hasta que dejan de producirse. Después el animal se queda tumbado inmóvil y durante un cierto tiempo es incapaz de efectuar ningún ejercicio. El estado convulsivo suele durar en total un tiempo variable, que osciló entre 5 y 45 minutos en los animales por nosotros estudiados.

Hemos estudiado en 11 conejos los efectos del ataque convulsivo producido por una sola inyección del fármaco. En todos ellos hicimos electrocardiogramas. En 6 hicimos el estudio microscópico del miocardio y en otros 5 determinamos el glucógeno cardíaco.

En el cuadro 1.º exponemos las dosis empleadas, duración del ataque convulsivo y momento de la muerte del animal.

CUADRO 1.º

Conejo Núm.	Dosis por Kg. solución 10% c. c.	Duración del estado de convulsión	Momento de la muerte
32	1,0	45 minutos	Sacrificado a las 48 h.
33	0,5	1 h. 20 minutos	Muerto a 1 h. 20 minutos.
34	0,5	20 minutos	Sacrificado a las 48 h.
35	0,5	15 minutos	» » » » »
45	0,5	25 minutos	» » » » »
46	0,5	10 minutos	» » » » »

En todos los animales de este grupo, exceptuado el conejo 33, se observaron en el miocardio pequeñas *necrosis microscópicas* cuya localización puede verse esquematizada en la figura 1.^a. En el conejo 33 no hallamos lesión alguna, acaso por haberse hecho el examen necrópsico 1 h. 20 m. después del ataque, lo que representa un tiempo demasiado corto para que pudieran haberse hecho patentes las posibles lesiones.

Por lo que hace a la localización de las lesiones se nota gran predilección por los músculos papilares, alguno de los

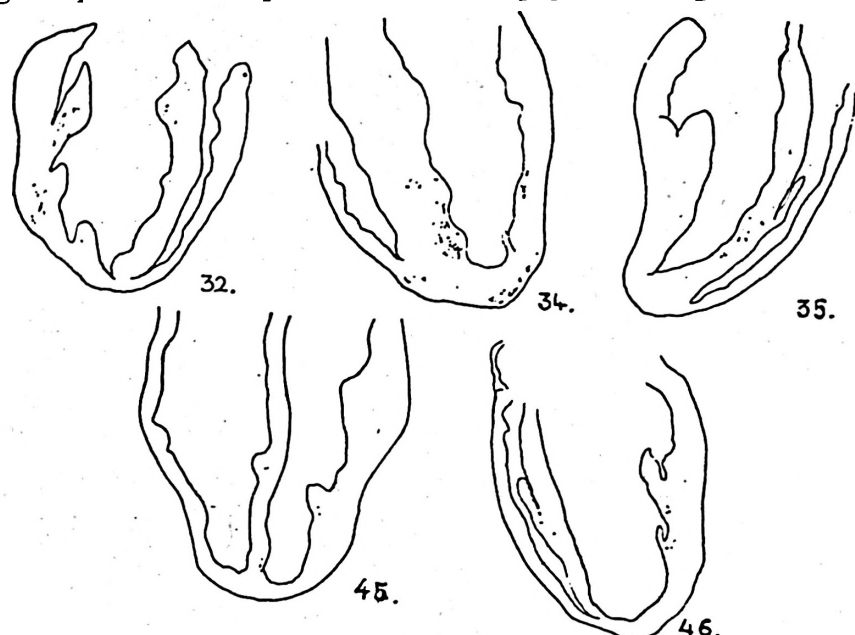


Fig. 1. — Esquemas demostrativos de la localización topográfica de las lesiones en el miocardio de los conejos, cuyos números se indican.

cualse aparecen verdaderamente acribillados de estas pequeñas necrosis; son frecuentes también en la pared interventricular, y más raras en el resto de la musculatura. El cuadro histológico es muy discreto apreciándose únicamente una infiltración de células de procedencia sanguínea y una proliferación celular unida — no en todos los casos — a imágenes de desintegración de algunas fibrillas musculares en las que la estriación ha desaparecido (figs. 2, 3 y 4). Se aprecia igualmente picnosis nuclear y a veces proliferación de los núcleos.

También apreciamos una gran vasodilatación. Es de señalar que estas lesiones son menores en extensión e intensidad

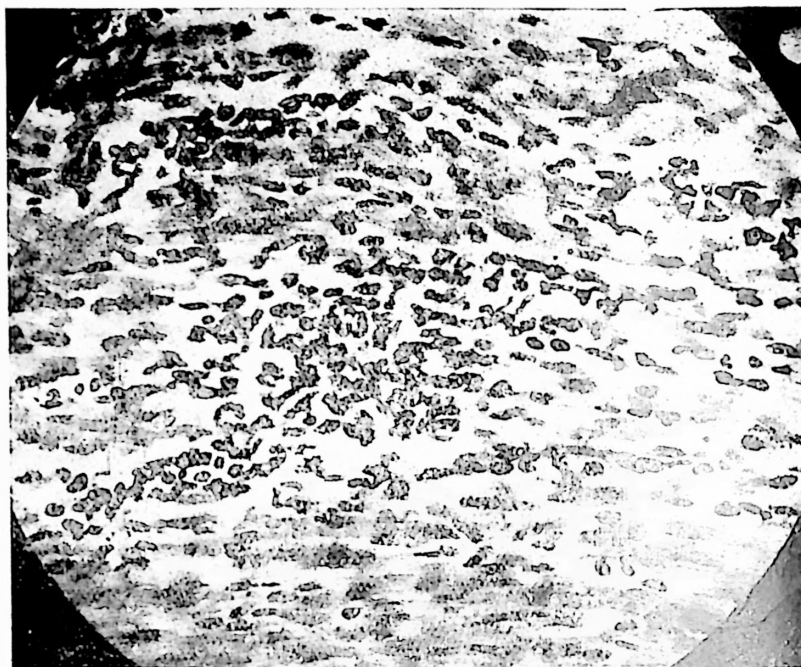


Fig. 2. — Microfotografía. Músculo papilar. Conejo núm. 35. Impregnación argéntica Río HORTEGA. Obj. corr. 40 ZEISS, oc. proy. 5.



Fig. 3. — Microfotografía. Músculo papilar. Conejo núm. 35. Impregnación argéntica Río HORTEGA. Obj. corr. 20 ZEISS, oc. proy. 5.

que las que se producen en los casos graves de anoxia del miocardio, por ejemplo en el colapso ortostático del conejo.

Nuestras observaciones confirman por tanto la existencia

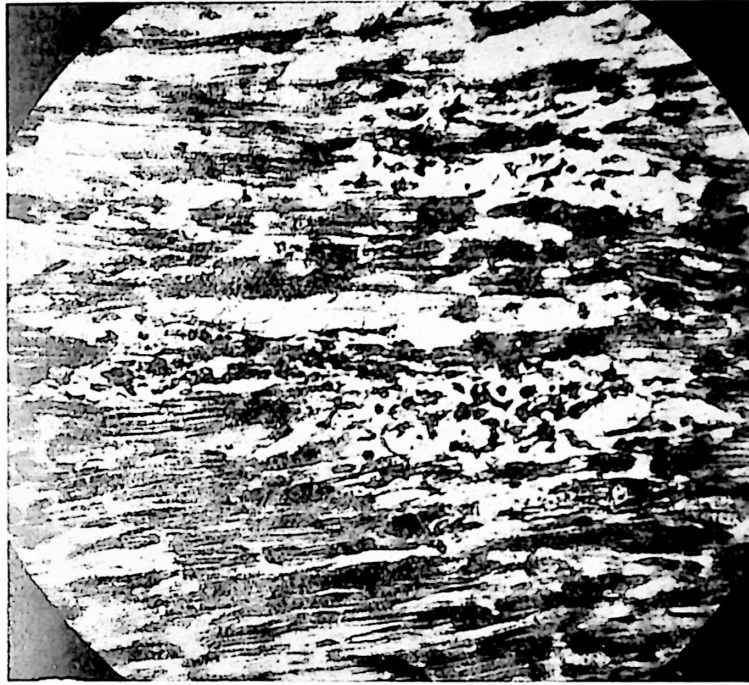


Fig. 4. — Microfotografía. Músculo papilar. Conejo núm. 32. Impregnación argéntica RIO HORTEGA. Obj. corr. 40 ZEISS, oc. proy. 5.

de las alteraciones morfológicas del miocardio que había encontrado ya MEESEN (14).

Contra la opinión ya citada de HADORN y WALTHARD (8) podemos asegurar que por lo menos las lesiones que nosotros hemos hallado no son lesiones *post-mortem*. Existe es cierto según hemos podido comprobar la vasodilatación que estos autores describen, pero a la par de ella hemos observado *siempre* las *necrosis* con sus caracteres histológicos ya descritos, bien diferentes de las lesiones *post-mortem*.

No hemos encontrado necrosis en los animales testigos, ni tampoco en los animales que hemos sacrificado inmediatamente después del ataque — ni siquiera en uno examinado a los 80 minutos—. Sólo aparecen a las 24-48 horas, es decir, cuando ha habido tiempo para que se realice la reacción hística

reparadora. No es pues posible hablar de lesiones *post-mortem*, sino de lesiones producidas *in vivo*.

El electrocardiograma nos demuestra que esta anoxia existe realmente. En los conejos 45, 35, 33 y 34 hemos hallado efectivamente un descenso más o menos profundo del espacio ST y en algunos de ellos (números 33 y 35) una deformación del complejo con base ensanchada y hasta bloqueos de rama (figura 5). Los conejos 32 y 46, no presentaron alteraciones electrocardiográficas claramente manifestadas; a pesar de esto las lesiones miocárdicas fueron en ellos sensiblemente iguales a las encontradas en los otros animales.

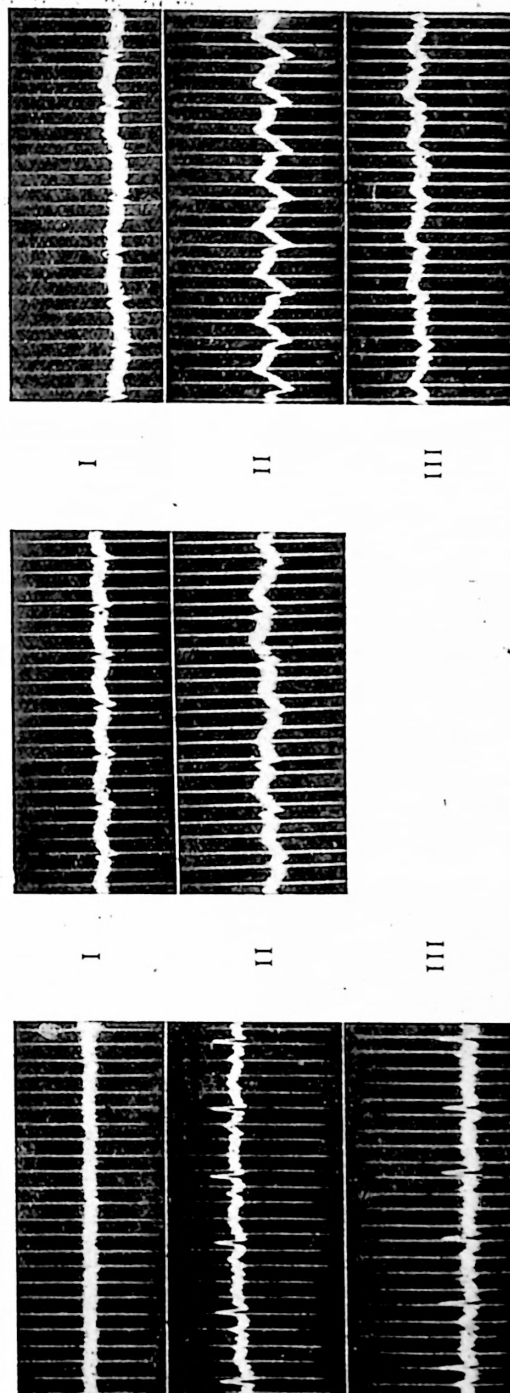
En otros cinco conejos (42, 43, 52, 55 y 57) estudiamos el contenido en glucógeno de sus corazones. El examen se hizo inmediatamente después de un período convulsivo de distinta duración. En el cuadro 2.º exponemos los resultados de estas observaciones.

CUADRO 2.º

Conejo núm.	Dosis por Kg. solución 10%	Duración del estado convulsivo	Glucógeno ‰
42	0,5	30 minutos	0,363
43	0,5	35 minutos	0,379
52	0,5	15 minutos	0,267
55	0,5	25 minutos	0,341
57	0,5	20 minutos	0,413
Cifras normales	—	—	0,283 — 0,392

El examen de este cuadro nos revela que los valores del contenido en glucógeno del miocardio se hallan dentro de los límites por nosotros señalados como normales. Cosa que no sucede en los casos de anoxemia intensa que producen la muerte del animal, en los que hemos hallado una disminución del glucógeno miocárdico (5).

Estudiado el electrocardiograma en estos animales durante el ataque, notamos en los conejos 42, 43, 55 y 57 un ligero descenso del espacio ST por debajo de la línea iso-eléctrica. El conejo 52 no presentó alteración electrocardiográfica alguna.



A los 30 minutos.

A los 15 minutos.

Antes de la inyección.

Fig. 5. — Conejo 35. Inyección intravenosa de 0,05 gr. por kg. de peso, de pentametilentetrazol.

Hemos querido saber si estas alteraciones anatómicas y electrocardiográficas que el cardiazol produce en el conejo se deben a una acción directa del medicamento sobre el miocardio, o si por el contrario son mera consecuencia de la sobrecarga que para el corazón suponen las convulsiones que el cardiazol produce.

Para averiguarlo hemos realizado primeramente una serie de observaciones en las que anestesiábamos el conejo antes de administrarle el cardiazol con lo que evitábamos las convulsiones.

En el cuadro 3.º damos cuenta de las dosis de cardiazol utilizadas — iguales o superior a la dosis mínima convulsionante —, del anestésico empleado y de los efectos convulsivos del tóxico.

CUADRO 3.º

Conejo núm.	Dosis por Kg. sol. al 10/100 c. c.	Anestésico	Observaciones
49	0,5	Eter	Ligeras convulsiones de las extremidades.
50	0,5	Eter	Sin convulsiones.
51	0,75	Eter	Un par de convulsiones.
52	0,5	Uretano	Sin convulsiones.
53	0,5	Uretano	Sin convulsiones.

En ninguno de estos animales pudimos hallar alteración alguna, ni electrocardiográfica ni histológica.

Inyectamos a otros tres conejos — éstos sin anestesia — también por vía intravenosa y en una sola vez, 0,3 gr. por kilogramo de cardiazol, dosis inferior a las convulsionantes. Los animales no presentaron convulsiones. Registrado su electrocardiograma a los 15 minutos de la inyección resultó normal. Sacrificados a las 48 horas, no se hallaron tampoco alteraciones histológicas en el miocardio.

Parece por tanto indudable, que el cardiazol no obre directamente sobre el miocardio, sino de un modo indirecto en tanto que es causa de convulsiones.

Podría pensarse que las convulsiones actuarían sobre el corazón gracias a la elevación de la presión arterial que es verosímil produzca en el animal. Hemos creído por ella conveniente estudiar la acción sobre la presión arterial del pentametilentetrazol en el conejo y también en el gato. En el conejo hicimos nuestras observaciones en el animal anestesiado con uretano. En el gato en el animal anestesiado con éter, unas veces profunda y otras muy superficialmente. También medimos la presión en el gato espinal y en el descerebrado de SHERINGTON.

En el conejo el cardiazol produce un claro aumento de la presión arterial con elevaciones coincidentes con la aparición de las convulsiones.

Con el gato íntegro, profundamente anestesiado con éter no se logra más que un ligero aumento de la presión arterial y, aun eso solo, si empleamos dosis muy grandes. En la mayor parte de los casos no logramos obtener aumento de presión. En todos aquellos casos en que se pudo observar, notamos que el animal no estaba anestesiado a fondo.

Sobre el gato íntegro, con anestesia nada más que superficial, pudimos observar en primer lugar que la dosis mínima convulsionante, no producía las convulsiones esperadas. La presión arterial sufre un descenso inicial seguido de una leve elevación que no llegó nunca a un centímetro de mercurio, ni

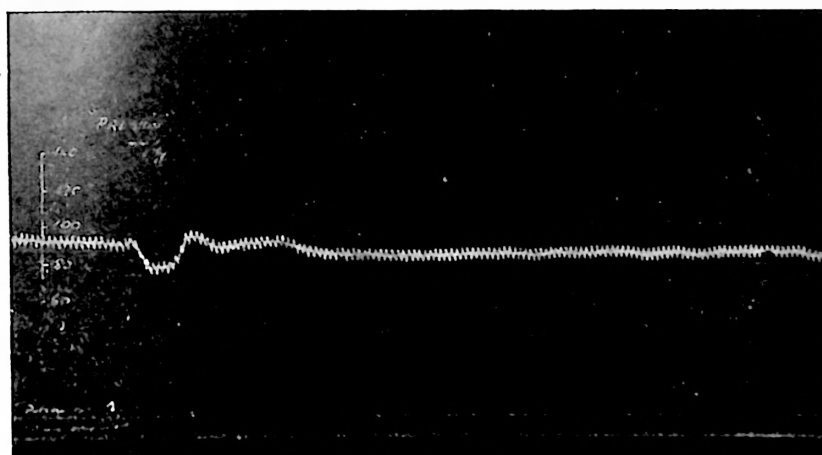


Fig. 6. — Gato íntegro, anestesiado superficialmente. En «1» inyección de 0,5 de sol. al 10 % de pentametilentetrazol por kg. de peso.

duró más de 30 segundos. En la figura 6 se ve la acción de 0,05 gr. por kg. de peso del animal, sobre la presión.

Cuando duplicamos la dosis se produce unas ligeras contracciones de las extremidades — que pueden terminar por un verdadero ataque convulsivo — acompañadas de un aumento

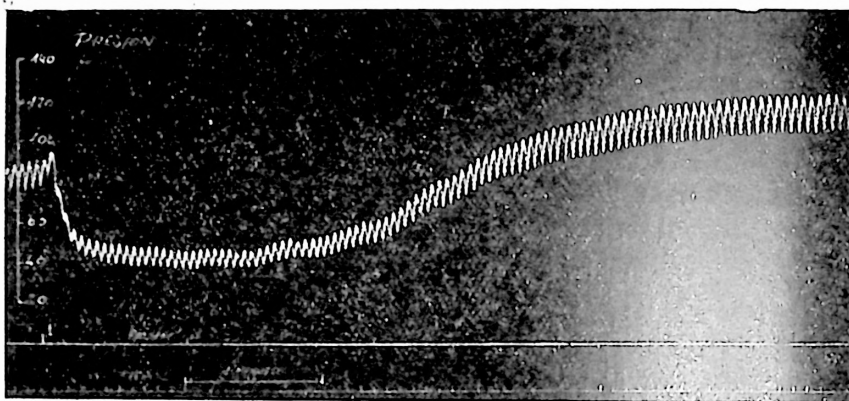


Fig. 7. — Gato íntegro, anestesiado superficialmente. En «1» inyección de 1 c. c. de sol. al 10 % de pentametilentetrazol por kg. de peso.

manifiesto de la presión arterial, a continuación de aquel leve descenso ya observado con las dosis inferiores. El aumento de la presión arterial que suele ser de unos 30-40 mm. de mercurio es persistente, durando en algunas ocasiones hasta una hora (fig. 7). Existe en estos casos un hecho interesante que

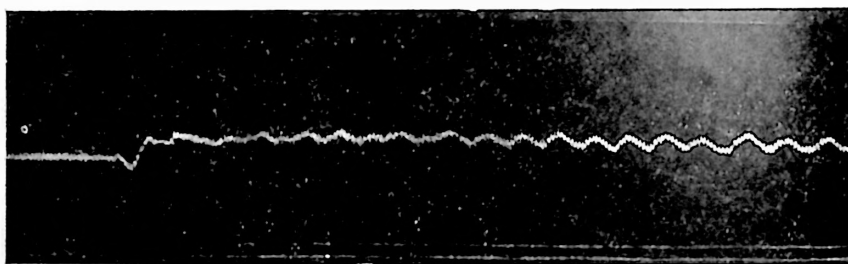


Fig. 8. — Gato íntegro, anestesiado superficialmente. En «3» inyección de 1 c. c. de sol. al 10 % de pentametilentetrazol por kg. de peso.

se da casi constantemente y es que aparecen en el registro de la presión, ondas de tercer orden o de TRAUBE-HERING (figuras 8 y 9) (1).

(1) Con el profesor Corral estamos estudiando este fenómeno actualmente.

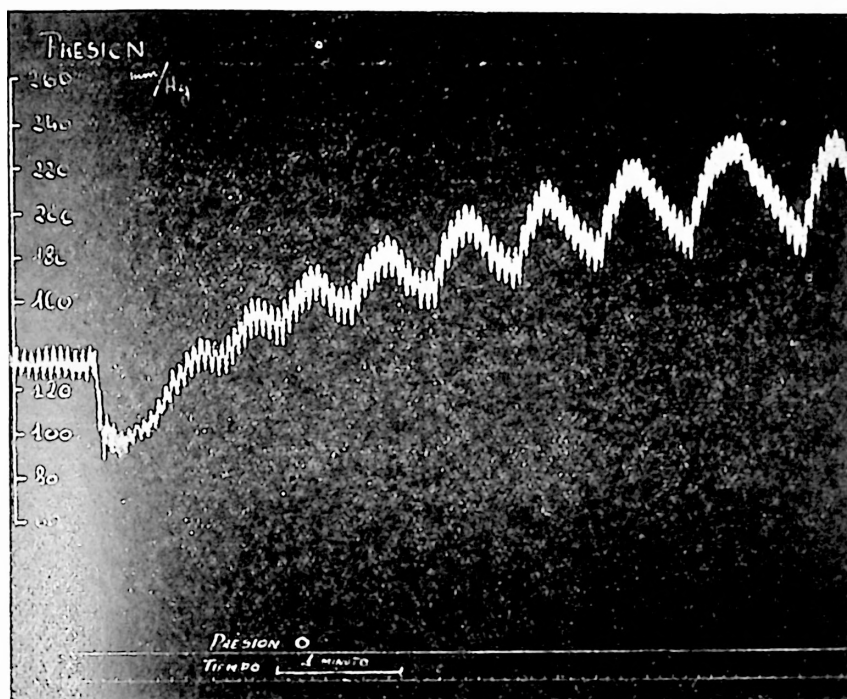


Fig. 9. — Gato íntegro, anestesiado superficialmente. Inyección de 1 centímetro cúbico de sol. al 10 % de pentametilentetrazol por kg. de peso.

DISCUSION

En el gato espinal el pentametilentetrazol no produce convulsiones ni hipertensión según nuestras observaciones y esto aun inyectado en catidad doble de la dosis mínima convulsio-nante. Sólo se produce un ligero descenso de la presión arterial, que sigue inmediatamente a la inyección.

En el gato descerebrado de SHERRINGTON, tampoco produce esa substancia convulsiones y sólo en casos raros hemos observado un pequeño aumento en la presión arterial. También se produce aquí como en el gato espinal el descenso inicial de la presión que hemos señalado en el animal intacto.

Las convulsiones y la hipertensión del cardiazol parecen pues debidas a una acción sobre centros nerviosos situados por delante de las tubérculos cuadrigéminos posteriores.

Por otra parte como la anestesia profunda del animal im-

pide también esas dos acciones del cardiazol, y la superficial suprime las convulsiones y deja persistir la acción hipertensora, parece pues verosímil admitir que los efectos convulsionantes se deban a una excitación cortical y los hipertensores a una acción sobre el diencefalo.

Para nosotros ahora, lo que importa es que las convulsiones del cardiazol van siempre acompañadas de un aumento de la presión arterial. Y como las alteraciones miocárdicas morfológicas y electrocardiográficas sólo se presentan cuando hay convulsiones, es lógico admitir que éstas son producidas por el aumento de presión que las acompaña.

En efecto, hemos visto que este aumento se establece de un modo brusco y tiene una duración considerable. El miocardio para vencer la sobrecarga que ese aumento de la presión le representa ha de hacer una demanda de oxígeno tan grande, que el sistema de aporte es insuficiente para cubrirla, y esto a pesar de la gran dilatación coronaria que observamos y del aumento de irrigación que halla SARKADY, midiendo la circulación coronaria con el «Strohmur» de REIN. Las gráficas que presenta SARKADY aunque criticables desde algún punto de vista, demuestran de un modo evidente este aumento de irrigación, pero ello no justifica su opinión de que el cardiazol a dosis convulsionantes no es nocivo para el corazón. Es muy verosímil por el contrario, que el aumento de trabajo a que éste se ve sometido bruscamente, exija una cantidad de oxígeno, que no sea capaz de aportar el sistema coronario, a pesar de su indudable esfuerzo compensador.

De todos modos el déficit de oxígeno del corazón en estos casos no puede ser tan intenso como el que se produce en anoxias graves como la del colapso ortostático. Aparte de la brevedad del ataque convulsivo del cardiazol, hemos de considerar en efecto que en el colapso ortostático hay un aumento del trabajo cardíaco y a la vez una considerable disminución del flujo sanguíneo por las coronarias. El cardiazol produce aumento del trabajo cardíaco, pero el trastorno como decimos es compensado — siquiera sólo parcialmente — por un aumento del riego coronario.

Por esta razón resulta fácil de explicar el hecho de haber encontrado nosotros en el colapso ortostático una disminución

del contenido en glucógeno del miocardio y no haber hallado variación del mismo en las convulsiones por el cardiazol.

La anoxia del corazón — y por tanto su alteración nutritiva — ha de ser menor en este último caso que en el colapso ortostático.

Resumen

La inyección en el conejo de pentametilentetrazol (cardiazol) a dosis convulsionante produce una insuficiencia coronaria aguda, relativamente leve, caracterizada por alteraciones electrocardiográficas, y por necrosis miocárdicas microscópicas, diseminadas y con localización precisa. Las necrosis se hallan constantemente, las alteraciones electrocardiográficas pueden faltar.

El pentametilentetrazol no produce disminución del glucógeno del miocardio, trastorno que nosotros tenemos como característico de las anoxemias graves del miocardio.

Dosis de pentametilentetrazol no convulsionantes no producen alteración miocárdica alguna. Tampoco alteran el miocardio las dosis convulsionantes siempre que se evite la producción de las convulsiones por medio de una anestesia profunda.

En el conejo y en el gato anestesiados superficialmente, el pentametilentetrazol en inyección intravenosa produce convulsiones y da lugar a un descenso de la presión arterial seguido de una elevación duradera de la misma.

El gato anestesiado profundamente no muestra convulsiones ni hipertensión tras la inyección de la dosis mínima convulsionante de pentametilentetrazol. A dosis dobles de la mínima esta sustancia produce hipertensión arterial y no causa convulsiones o solamente ligeras.

El gato espinal y el descerebrado de Sherrington no sufren convulsiones ni aumento de la presión arterial por la acción del pentametilentetrazol.

Explicamos la insuficiencia coronaria que produce el pentametilentetrazol, por el aumento de la tensión arterial que éste origina.

Summary

The injection of pentamethylentetrazol (cardiazol) at convulsant doses provokes in the rabbit an acute coronary insufficiency, relatively slight, characterized by electrocardiographic alterations and by microscopic myocardial necroses, dispersed and precisely localized. Necroses are found constantly; electrocardiographic alterations may be lacking. Pentamethylentetrazol does not produce any decrease of the myocardium glucogene, which trouble the authors consider as characteristic of serious anoxemias of the myocardium.

Non-convulsant doses of pentamethylenetetrazol do not produce any myocardiac alterations whatever. Neither is the myocardium altered by convulsant doses whenever the production of convulsions is prevented by means of a profound anaesthesia. In superficially anaesthetized rabbits and cats, pentamethylenetetrazol in intravenous injections produces convulsions and give rise to a descent of blood pressure followed by a lasting rise thereof.

The deeply anaesthetized cat shows no convulsions or hypertension after the injection of the minimum convulsant doses of pentamethylenetetrazol. At double minimum doses this substance produces arterial hypertension and does not cause any, or only slight convulsions.

The spinal and the Sherrington decerebrated cat suffer neither convulsions nor arterial pressure increase by the injection of pentamethylenetetrazol.

The coronary insufficiency produced by pentamethylenetetrazol is explained by the increase of blood pressure caused by the former.

Bibliografía

1. BLUME: *Arch. exp. Path. Pharm.*, **116**, 236, 1926.
2. BUCHNER: *La insuficiencia Coronaria*. Traducción española, Madrid 1942.
3. CAMP: *J. Pharm. exp. Ther.*, **33**, 81, 1928.
4. DIETRICH: *Z. exp. Med.*, **90**, 689, 1933.
5. GÁLLEGO y DÍAZ GONZÁLEZ: *Trab. del Ins. Cajal, Sec. Fisiología*, 1945.
6. GOLDENBERG y ROTHBERGER: *Z. klin. Med.*, **123**, 490, 1933.
7. GRUBER y KOUNTZ: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **30**, 27, 161, 1929.
8. HADORN-WALTHARD: *Z. exp. Med.*, **105**, 174, 1939.
9. F. HILDEBRANT: *Arch. exp. Path. Pharm.*, **116**, 108, 1926.
10. HELAERS: *Arch. Int. Pharmacodyn et Ther.*, **35**, 221, 1926.
11. KNOLL: citado por WATT.
12. LUFT: *Beitr. Path. Anat.*, 1937.
13. LUFT: *Luftf.-med.*, **2**, 231, 1938.
14. MEESSEN: *Arch. Kreis l.-forsch.*, **6**, 361, 1940.
15. NEUBURGER: *Klin. Wochs.*, 1355, 1933.
16. OPITZ y TILMANN: *Luftfahrtmed.*, **1**, 153, 1936.
17. REIN: *Verh. dtsch. Ver. inn. Med.*, 247, 1931.
18. REIN: *Z. Biol.*, **92**, 101, 1931.
19. SARKADY: *Klin. Wochs.*, 13, 1943.
20. SCHOEN: *Arch. exp. Path. Pharm.*, **113**, 257.
21. SCHIRRMESTER: citado por BUCHNER.
22. STROSS: *Arch. exp. Path. Pharm.*, **114**, 177, 1926.
23. TUTING IRVING: *Biochem Jour.*, **22**, 1508, 1928.
24. WATT: *Arch. int. Pharm. Ther.*, **36**, 225, 1930.