La Crónica Médica

APARTADO 2563

LIMA - PERU

COMITE DE REDACCION

CARLOS A. BAMBAREN Director

REDACTORES



EDMUNDO ESCOMEL — CARLOS MORALES MACEDO LUIS D. ESPEJO — RAFAEL M. ALZAMORA — JOSE MARROQUIN ERNESTO EGO-AGUIRRE - JORGE AVENDAÑO HUBNER LUIS QUIROGA QUINONES - HUMBERTO PORTILLO GUILLERMO KUON CABELLO

Vol. 68

Año 68.- Núm. 1051

Enero 1951

SUMARIO

NUMERO MONOGRAFICO

reparación y propiedades de la hialuronidasa, por	
la Q. F. Srta, Lila Ortiz Torres.	
Generalidades, pág	3
Semejanza entre el factor de difusión y la hialu-	
ronidasa, pág	5
Propiedades de la hialuronidasa, pág	7
Preparación de la hialuronidasa, pág	8
Valoración de la hialuronidasa, pág	11
Aplicaciones de la hialuronidasa, pág	13
Conclusiones, pág	18

Ahora...en dosis diarias de Contidado diarias de Contidado de Contidad

Empleada hasta la secha en más de 10.000.000 de casos clínicos, pasan de 7.000 las comunicaciones que sobre la aureomicina se han publicado provenientes de todos los campos de la práctica médica mundial.

Desde 1949, la tendencia de estos estudios viene confirmando la eficacia de dosis más reducidas de aureomicina, el antibiótico de espectro verdaderamente amplio y actividad verdaderamente uniforme.

El nuevo plan de administración de aureomicina a dosis reducidas:

Peso aproximado del paciente		Cantidad a administrarse	Húmero de dosis cada 24 horas	
0,1g diario	8 kilos	Una dosis de 50mg dos veces al día, después de comer	2 dosis	
0,5g dlario	40 kilos	Una dosis de 250mg dos veces al día, después del desayuno y la cena Una dosis de 100mg cada 3 ó 4 horas, después de las comidas Una dosis de 50mg cada 2 horas, con leche	2 dosis 5 dosis 10 dosis	
1,0g diario	80 kilos	Una dosis de 250mg cada 4 horas Una dosis de 100mg cada 2 horas	4 dosis 10 dosis	
1,5g diario	120 kilos	Una dosis de 250mg cada 3 horas	6 dosis	



... un timbre de honor

LEDERLE LABORATORIES DIVISION Cyanamid INTER-AMERICAN Corporation

Representantes y distribuidores enclusivos

La Quimica Suiza S. A., Linn-Poni

niversidad Nacional Mayor de San Marcos Universidad del Perú, Rocana de América

LA CRONICA MEDICA

APARTADO POSTAL 2563

LIMA - PERU

COMITE DE REDACCION

CARLOS A. BAMBAREN Director

REDACTORES

Edmundo Escomel
Carlos Morales Macedo
Luis D. Espejo
Rafael M. Alzamora
Ernesto Ego-Aguirre
Humberto Portillo
Jorge Avendaño
Luis Quiroga Quiñones
José Marroquín
Guillermo Kuon Cabello

AÑO LXVIII.- 1951



LA CRONICA MEDICA

AÑO 68 — 1951

LIMA - PERU

Cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Lima Profesor Dr. Carlos A. Bambarén

Preparación y propiedades farmacológicas de la Hialuronidasa

Por la Q. F. Srta. LILA ORTIZ TORRES

El descubrimiento de la Hialuronidasa, en estos últimos años, constituye, sin lugar a dudas, uno de los acontecimientos más trascedentales en el campo de la Patología y Farmacodinamia.

Como en el Perú no se ha realizado todavía ningún trabajo de investigación sobre esta enzima, que cada vez va adquiriendo más importancia, el profesor del curso de Farmacología de la Facultad de Farmacia Dr. Carlos A. Bambaré, me sugirió que estudiase el tema, sometiéndolo a experimentación personal.

Este trabajo consta de las siguientes partes: En la primera, relato la forma como se llegó al conocimiento de esta enzima y expongo sus caracteres generales; en la segunda, las técnicas de preparación y valoración; y en la tercera, refiero sus aplicaciones. Las conclusiones, por último, resumen el trabajo.

Testimonio mi gratitud al profesor del curso de Farmacología Dr. Carlos A. Bambarén, por haberme sugerido el tema, proporcionándome bibliografía y controlando las experiencias que he llevado a cabo, lo mismo que al "Instituto Nacional de Higiene", especialmente al Dr. Oscar Miró Quesada Cantuarias, que me facilitó su laboratorio para efectuar las investigaciones. También al "Instituto Sanitas Sociedad Peruana", donde realicé parte del trabajo experimental.

GENERALIDADES

Es frecuente comprobar que descubrimientos sin aplicación práctica en los primeros tiempos y sin coordinación, inesperadamente adquieren importancia y se relacionan con otros, dando insospechados resultados. Así ha sucedido con la Hialuronidasa, de gran interés en patología experimental y farmacología.

La evolución de los conocimientos sobre esta materia, es la siguiente:

En 1928 el investigador español Duran Reynals, trabajando en los Estados Unidos, observó que los extractos testiculares agravan de manera considerable la lesión producida por el virus de la Vacuna en el conejo, sin que el fenómeno fuese resultado de aumento en la virulencia del agente invasor, sino de modificaciones en el tejido del huésped, pues el virus recogido de la Iesión así agravada, siguió conservando idénticos todos sus caracteres.

En 1930 el mismo Duran Reynals descubrió que el extracto testicular tenía la propiedad de facilitar la difusión de los líquidos en los tejidos conjuntivos, por medio de un agente que denominó "Factor de difusión".

En 1934 Palmer y Meyer aislaron del humor vitreo del ojo de buey, un polisacárido, el Acido hialurónico, que también se encuentra en el cordón umbilical, humor acuoso, liquido sinovial, etc.

En 1936 Meyer descubrió que muchas bacterias producen un fermento que despolimeriza el Acido hialurónico, al que denominó Hialuronidasa.

En 1939 Chain y Duthie identificaron "El factor de difusión" con la Hialuronidasa, probándose, entonces, que tiene verdadera importancia en la etiogenia de muchos procesos mortosos y farmacológicos.

Es esta Hialuronidasa la que actúa sobre el Acido Hialurónico, que contribuye a la defensa de las estructuras orgánicas.

El descubrimiento de la enzima denominada Hialuronidasa, fué precedido por las siguientes comprobaciones:

Morner, en 1894, fué el primero en establecer la existencia de una sustancia mucoide en el humor vítreo, cuya concentración determinó Duke Elder; en 1934 Meyer y Palmer, a su vez, identificaron el Acido hialurónico con un nuevo tipo de muco-polisacárido descubierto primero en el ojo del gato y luego en el cordón umbilical humano.

Ferrecst, Kendall, Heidelberger y Dowson, en 1937, aislaron un polisacárido de los cultivos de tres tipos de estreptococos hemolíticos del grupo A, y en el mismo año Meyer, Dubós y Smith lo descubrieron en los autolizados de Neumococos del tipo 2R, comprobando, además, que la enzima hidrolizaba los polisacáridos del humor vítreo, del cordón umbilical y de los estreptococos.

Los polisacáridos descubiertos, análogos entre sí, tenían composición química, poder rotatorio y propiedades físicas igúales a los obtenidos por Palmer y Meyer.

Elvin-Kabat comprobó en ciertos tumores, provocados por Virus, la existencia de un polisacárido que por su comporta-

miento frente a la enzima neumocócica, se semejaba a la enzima del Acido hialurónico.

Corresponde el gran mérito a Chain y Duthie que sostuvieron la intima relación entre el "Factor de difusión" y la Hialuronidasa, demostrando que el "Extracto testicular", con el factor de Duran Reynals, hidrolizaba el Acido hialurónico del humor vítreo y del líquido sinovial, provocando su disminución en viscosidad y la liberación de sustancias reductoras.

Basados en estos descubrimientos, numerosos investigadores emprendieron estudios para establecer si factores provenientes de orígenes distintos, tenían idéntica actividad mucolítica o inversamente si todas las sustancias capaces de despolimerizar el Acido hialurónico presentaban el fenómeno de di-

fusión.

Madinaveitia y Quibell, en 1940, sugirieron que ciertas contradicciones observadas en las experiencias, podrían permitir diferenciar las dos actividades. El mismo año Mc Clean y Hale, trabajando en condiciones más precisas, llegaron a la conclusión de que eran análogas, tanto más, afirmaban, cuanto que las sustancias como el Acido ascórbico y sus derivados, son capaces de actuar, tambien, sobre la viscosidad, como sobre la piel.

Favilli demostró, casi simultáneamente, que muchos venenos de serpientes y extractos de sanguijuelas, de gran poder de difusión, tienen una marcada actividad mucolítica. Claude confirmó esto y a su vez, observó el sorprendente paralelismo existente entre la mucolisis y la difusión de los diversos extractos, considerando que el aumento de permeabilidad de los tejidos, podía resultar de la acción de la enzima sobre una hipotética mucina del colágeno dérmico. Claude logró preparar una mucoproteina de la piel normal del conejo, cuya viscosidad disminuye rápidamente en contacto con los extractos de sanguijuelas y abejas.

Meyer, en 1941 obtuvo, partiendo de la piel de cerdo, una mezcla de mucopolisacáridos separables en dos componentes por medio de la hidrólisis enzimática y del fraccionamiento con alcohol. El primero se identificaba con el Acido hialurónico por su comportamiento enzimático y su composición; el segundo, se revelaba como una mezcla de exosiamina acetilada.

SEMEJANZAS ENTRE EL FACTOR DE DIFUSION Y LA HIALURONIDASA

a) Todas las preparaciones que contienen Hialuronidasa, tienen, también, factor de difusión, como lo demuestran las comprobaciones con neumococos, estreptococos hemolíticos del grupo A (tipo 4 raza h H 44), Glostridium Welchü (raza A), con extractos testiculares y de sanguijuelas. Sinembargo, no

existe paralelismo entre la actividad de la Hialuronidasa y el factor de difusión.

- b) El calentamiento entre 65° a 100° C, durante 30 minutos, produce efecto comparable: disminución y luego inactivación total.
- c) La demostración de la existencia de Acido Hialurónico en la piel ofrece una posible explicación del mecanismo de la difusión, por la acción hidrolizante de la enzima. La trama conjuntiva más fluída, aumentaría la permeabilidad local.

 d) El Yodo inactiva el factor de difusión y la Hialuronidasa y la adición ulterior de Hiposulfito de Sodio, no produce nin-

guna reactivación.

e) El aumento de los dos efectos puede obtenerse, si se trata de bacterias, agregando Acido hialurónico al medio de cultivo.

DIFERENCIAS ENTRE EL FACTOR DE DIFUSION Y LA HIALURONIDASA

a) No existe paralelismo en el grado de actividad entre el

factor de difusión y la Hialuronidasa.

b) Todos los preparados que producen "Factor de difusión", no contienen, necesariamente, Hialuronidasa. Ciertas sustancias, inclusive el Acido Hialurónico (azoproteinas, hirudina, extracto esplénico), tienen acción difusora, pero ninguna actividad hialuronidásica. En este caso, la velocidad con que se produce aquella, difiere de la determinada por la Hialuronidasa normal.

Los sueros antihialuronidasa, inhiben específicamente y completamente la enzima homóloga, pero ni inhiben el factor Duran Reynals. Puede afirmarse que la difusión se debe a varios agentes, entre ellos a la Hialuronidasa, pues, Hebby y sus colaboradores, observaron que el fenómeno es complejo y no puede explicarse por una simple reacción química. Durand Reynals, en 1932, retomando la mayor parte de los argumentos precedentes, rechazó la hipótesis de que la Hialuronidasa produce la difusión, afirmando que debían intervenir otras enzimas y sustratos, atribuyendo a la enzima ún papel primordial.

Mc Clean y Rowlands, establecieron que la Hialuronidasa preparada a partir de testículos de toro, conejo, ratón y de estreptococos, clostridium welchii, del veneno de vívoras y de escorpiones, era inhibida por el suero de cobayo, conejo, carnero, caballo, ratón y humano. Posteriormente, Haas realizó al respec-

pecto, estudios más completos.

Haas, en 1943, logró concentrar y purificar por medio de la electroforesis, la Hialuronidasa testicular de los mamíferos. En esta forma pudo precisar las propiedades físico-químicas de la misma. Haas ha señalado la existencia de un agente destructor de la Hialuronidasa en el suero humano y del caballo, buey, carnero y gallina. Esta antienzima denominada "antiinvasina", inactiva la Hialuronidasa testicular (hombre, buey) y de diyersas bacterias, pero no la del veneno de serpiente (Agkistrodon Piscivorus).

Gelberg y Hass lograron, poco después, disociar la antiinvasina en dos factores inactivos por separado, mediante el fraccionamiento con alcohol etílico y desnaturalización selec-

tiva por el calor.

La "antiinvasina" es a su vez inactivada por las bacterias patógenas y venenos que contienen Hialuronidasa. El factor termolábil de esta reacción, se ha denominado "proinvasina". De este modo el Agkistrodon Piscivorus, muy rico en este último factor, destruye la "antiinvasina" contenida en el plasma humano y de la gallina, cerdo, etc., quedando intacta la Hialuronidasa.

La "antiinvasina II" es otro factor descubierto en el plasma del hombre, buey, gallina, etc. que puede destruir a la proinvasina I.

SUSTANCIAS QUE INHIBEN LA HIALURONIDASA

La Hialuronidasa es inhibida por los agentes antipirálgicos, antisimóticos y antireumáticos, como salicilatos, benzoato de sodio, cincofeno, gentisato de sodio, ácido gentísico, definitivamente e irreversiblemente inhiben su actividad.

La inactivan las enzimas proteolíticas, como la pepsina y tripsina, incubándole a pH 2.0 por 4 horas con pepsina.

PROPIEDADES DE LA HIALURONIDASA

La Hialuronidasa es una mucoenzima. Se presenta en dos formas: líquida y sólida; la líquida es de color gris claro, el polvo es también gris claro, casi blanco. En estas dos formas

es muy soluble en el agua. Son positivas las reacci

Son positivas las reacciones de Millón, Xantoproteica, Ninhidrina, Azoicas y Biuret. Con Acido nítrico produce un precipitado que no se redisuelve por calentamiento. Precipita con el Acido tricloro acético, Acetona, Alcohol y Eter. Es negativa la reacción con nitroprusiato de sodio. La precipita el Mercurio, Nitrato de plata y Tricloruro de Platino. No produce precipitación con Sulfato de Cobre, con Acidos débiles, ni con el Acido clorhídrico. El Nitrógeno representa el 14% de los sólidos totales.

Efecto del calor.—El calor a 100º la destruye o la inactiva, por calentamiento durante 5 minutos; esto es debido a la absorción del precipitado que se produce por calentamiento, a 95º durante 10 minutos. Es completamente estable a la temperatura de 37º C.

Resistencia a los ácidos fuertes.— Es soluble en Acido clorhídrico y resiste el Hidrógeno a concentración de pH 2.0. Por esta resistencia a los ácidos fuertes, es posible hacer un estudio de la solución proteolítica de la Pepsina sobre esta enzima.

Efectos de enzimas proteolíticas.— Se inactiva incubándola con Pepsina a pH 2 por 4 horas. La Tripsina también, la inactiva incubándola a 37° por 2 horas. La carboxipolipeptidasa no la inactiva.

Efectos del pH.—Conserva su actividad entre pH comprendidos entre 4 y 10. Pierde actividad a pH inferior a 4 y superior a 10.

Neutralización de la enzima por antisueros.—Los antisueros inhiben la expansión de la Hialuronidasa de origen baeteriano.

PREPARACION DE LA HIALURONIDASA

La Hialuronidasa se puede obtener de veneno de ofidios, de sanguijuelas, de filtrados de caldo de cultivo de estafilococos y estreptococos, de gérmenes de gangrena gaseosa, de neumococos virulentos, de tejidos malignos y de testículos, especialmente de toro, que son los que la contienen en más cantidad.

Entre los métodos de preparación de Hialuronidasa a partir de testículos de toro, dos son los más comunes:

a) Extracción con agua.

b) Extracción con solución N/10 de Acido acético.

Muchos son los procedimientos que se han aconsejado pa-

ra preparar la Hialuronidasa. Referiré los siguientes.

Técnica de Morgan y Mc Clean.— Tratan los testículos con agua y obtienen un extracto que acidifican hasta pH de 4.5 con Acido Acético N/10, pasando después a un pH de 6.5 con solución de soda 2/N. Se separan en las dos operaciones las materias inertes. Se alcaliniza la enzima y se precipita con acetato básico de Plomo, la solución de este precipitado en medio acuoso a un pH de 4.5; se extrae el Plomo por diálisis y luego de saturar con Sulfato de amonio, el precipitado que se obtiene se separa y se disuelve en agua y nuevamente se dializa. La solución de enzima sin sal se evapora al vacío.

Técnica de Madinaveitia,—Precipita la enzima en agua con solución saturada de Sulfato de amonio; se absorbe la enzima con Hidrato de Aluminio en lugar de ácido, diluyendo luego en

medio alcalino. El líquido diluído se dializa y deseca.

Técnica de Mannozi Torini.— Absorben el extracto acuoso, después de diálisis, con carbón a pH 7.0 y luego lo diluyen

hasta pH 5.

Técnica de Claude y Duran Reynals.— Tratan el extracto acuoso del testículo con un volumen igual de Acido acético N/10. El primer precipitado se elimina y el líquido filtrado se une con Acetona hasta precipitar; el precipitado acetónico es anhidrificado (reducido) y luego extraído con agua, eliminando la porción insoluble; la solución acuosa se mezcla con Sulfato de amonio hasta semisaturación y se elimina la parte no soluble; se aumenta luego el Sulfato de Amonio hasta saturación y se recoje la porción activa que se disuelve en agua y dializa después.

Esta técnica es la que he efectuado. Tomé 8 testículos de toro, los liberé del tejido conectivo, fraccioné la parte útil y la molí con arena lavada; antes de molerla con arena, pesé la pulpa y obtuve un peso de 1,034 gr.; agregué un peso igual de Acido Acétido N/10. Esta mezcla la dejé toda una noche en frío, a temperatura de 5°; al día siguiente, centrifugué y el líquido sobrenadante lo hice pasar a través de papel de filtro. El líquido quedó claro, rojizo y con pH 4.7; este líquido fué tratado con 4 volúmenes de Acetosa y obtuve un precipitado que recojí en un embudo de Buchner, lavándolo con más Acetona; luego lo desequé en el aire. Este precipitado al principio fué blanco, pero en contacto del aire, adquirió color bruno intenso.

Este polvo seco se disolvió en agua destilada, siendo sólo soluble en la proporción de 77% mas o menos; separé entonces la parte soluble, de la insoluble por centrifugación, eliminando el residuo insoluble.

El líquido sobrenadante, después de centrifugar, lo filtré y luego lo traté con volumen igual de Sulfato de amonio, a saturación, obteniendo un precipitado escaso, que eliminé después de pasar a través de papel de filtro plegado. El líquido filtrado lo traté con más Sulfato de amonio hasta saturación completa, dejándolo toda una noche en frío a temperatura de 5°. Al día siguiente, filtré este líquido a través de papel de filtro plegado y obtuve un precipitado que disolví en pequeño volumen de agua destilada, en proporción de 25 cc. por gr. de precipitado. Obtuve 4 gr. de precipitado al que añadí 100 cc. de agua destilada; este líquido lo dialicé a través de papel celofán, para eliminar lo más que fuese posible el Sulfato de Amonio. El líquido dializado tenía color bruno intenso.

A. Saldi y L. Schiafani, en lugar de efectuar una diálisis, efectúan dos diálisis y al final de la segunda, el líquido es filtrado a través de bujía y desecado al vacío a temperatura de 38° a 40°.

Esta modificación la incorporé en la técnica que he usado.

Técnica de Monrroe, E. Freeman, Pearl Anderson, Marian Oberg y Albert Dorfman.— Consta de las siguientes etapas:

Extracción con Acido acético.

Precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio.

Precipitación fraccionada con Etanol.

Extracción con Acido acético.— Los testículos de bovino en número 12, se descapsularon y el tejido útil fué dividido mecánicamente. Este tejido dividido, se puso en contacto, durante una hora, con igual peso de Acido acético glacial, N/10; se agitó vigorosamente y lo dejé enfriar toda una noche a temperatura de 5°. Al día siguiente, centrifugué el material a 5,000 revoluciones por minuto, durante 15 minutos. El residuo fué sometido dos veces mas, a la acción del Acido acético N/10, en la proporción de 5 a 1. Los productos extraídos se mezclaron y se pasaron a través de papel de filtro.

El fraccionamiento con Sulfato de Amonio de la Hialuronidasa dá los siguientes resultados:

Concentración de SO4 (NH4)2 por ciento	Total de unidades de Hialuronidasa recobradas por kilo de tejido	Hial. recobrada por ext. alcohólico acético por ciento	Indice de purif. por vez.
20	45.000	6	0.460
23	47.000	6	1.000
26	126.000	17	2.400
28.5	207.000	27	2.020
31	130.000	17	1.070
33	22.000	8	0.630

Agregué al líquido filtrado 212 gr. de Sulfato de Amonio (conforme indica la técnica) por litro de filtrado; agité rápidamente y lo dejé un corto tiempo a la temperatura de 5°; precipitó la parte inactiva, que descarté por filtración. Al filtrado agregué 282 gr. de Sulfato de amonio, dejándolo en frío toda una noche a 5°. Al día siguiente separé el precipitado por filtración y lo disolví en pequeña cantidad de agua destilada, que dialicé también a 5°. La diálisis duró 24 horas, precipitando una pequeña fracción que fué eliminada por filtración. A este líquido agregué más Sulfato de Amonio, filtré y obtuve otro precipitado que recojí en una solución al 0.015 M fosfatocitrato (Buffer) a pH 5.0, conteniendo 0.9% de Cloruro de Sodio. Probé la actividad Hialuronidásica, invectando en un conejo 0.5 cc. de esta solución, junto con 0.25 c:. de Hemoglobina. Esta solución fué nuevamente dializada para eliminar la mayor parte del Sulfato de Amonio; luego de dializada la traté con alcohol etilico a distintas concentraciones, tal como indica el cuadro siguiente:

Concentración de Etanol		Total de enzima recobrada		Indice de pureza Unid. de enz. por	
Fr	acci. Molecul.	Unid, por lit.	Unid, por cc.	mg. de N	
	0.10	13.000	4	800	
	0.15	70.000	20	2.000	
	0.20	133.000	38	5.000	
	0.25	84.000	24	8.200	
	0.30	8.000	2.5	1.600	

Los distintos precipitados contenidos los recibí en solución N de fosfatocitrato (Buffer) con pH 5.0 y probé la actividad Hialuronidásica, que se había incrementado notablemente. Esta solución, después de esterilizarla a través de bujía, se desecó por liofilización determinando la cantidad de Nitrógeno existente, que fué de 99,6 mg. de N por gr.

VALORACION DE LA HIALURONIDASA

Para determinar la actividad farmacológica de la Hialuronidasa existen métodos:

- a) Biológicos.
- b) Físico-químicos: Viscosimétrico. Turbidimétrico.
- c) · Químicos.
- a) Método biológico.— Se basa en el aumento de la superficie de difusión de una sustancia en el dermis de un animal, cuando esta sustancia se inyecta junto con Hialuronidasa; es por esta propiedad que se llama "Factor de difusión". El fenómeno se explica porque en el dermis existe Acido Hialurónico, en la parte interfibrilar del conectivo colágeno, que se degrada por la Hialuronidasa, eliminándose la barrera que obstaculiza la difusión de las sustancias inyectadas. Se emplean para este tipo de prueba: tinta china, tripán azul en solución al 1%, toxina diftérica muy diluída (1x1,000; 1x3,000), mezcla en partes iguales de solución al 0.5% de Citrato de Fierro y de Ferrocianuro de potasio. "Azul T 1824" en solució isotónica estéril y solución de Hemoglobina que es la mejor, por no absorber Hialuronidasa y ofrecer color perfectamente perceptible.

Cualquiera que sea el indicador usado, la técnica consiste en aspirar sucesivamente, en una jeringa de inyecciones hipodérmicas, cantidades iguales de indicador y de Hialuronidasa, y mezclar bien. El líquido así preparado, se inyecta en el espesor del dermis (0.4 a 0.5 en el conejo y 0.1 a 0.2 cc. en el hombre). La prueba en conejos se efectúa en animales blancos muy bien razurados, que no tengan lesiones, cicatrices, ni pústulas, que obstaculizarían la difusión. Las inyecciones se colocan en líneas paralelas a la columna vertebral, a distancia de 3 cm. Se puede hacer 3 o 4 inyecciones por lado.

La difusión se verifica con más intensidad en la primera

hora.

Las áreas alcanzadas fueron las siguientes:

Con la Hialuronidasa obtenida con la primera técnica de preparación hice 4 aplicaciones, 2 con tinta china y 2 con hemoglobina, obteniendo los siguientes resultados:

Conejo Nº 1.—La difusión producida por invección intradérmica de 0.25 cc. de tinta china diluída al 1/2 por ciento con 0.5 cc. de Hialuronidasa, fué de 37.2 cm2., la difusión producida por 0.25 cc. de tinta china con 0,5 cc. de Suero fisiológico (control) fué de 9.2 cm2.

Conejo Nº 2.—La difusión producida por invección intradérmica de 0.25 cc. de tinta china diluída al 1/2 por ciento con Hialuronidasa, fué de 37.2 cm2. y la difusión producida por 0.5 cc. de tinta china con Suero fisiológico, fué de 9.5 cm2.

Conejo Nº 3.—El área producida con mezcla de Hialuronidasa y Hemoglobina fué de 62.9 cm². y de Hemoglobina con Suero fisiológico, de 12.3 cm², empleando cantidades iguales que las anteriores.

Conejo Nº 4.—El área producida con Hialuronidasa y Hemoglobina fué de 62.7 cm2. y de Hemoglobina con Suero fi-

siológico de 12.3 cm2.

Las áreas empleando Hemoglobina, fueron mayores que

con tinta china y mucho más claras.

Con la Hialuronidasa obtenida con la segunda técnica, también hice dos experiencias, después de obtener el último precipitado con Sulfato de Amonio y dos después del último fraccionamiento con Etanol, obteniendo el siguiente resultado:

Conejo Nº 1.—El área con mezcla Hemoglobina y Hialuronidasa fué de 76.2 cm2. y el área producida por la inyección intradérmia de Hemoglobina con Suero fisiológico de 12.2 cm2.

Conejo Nº 2.—El área producida por la inyección de Hialuronidasa con Hemoglobina, fué de 76.2 cm2. y de la inyección de Hemoglobina con Suero fisiológico de 12.2 cm2.

Las áreas obtenidas después de fraccionamiento con Eta-

nol fueron las siguientes:

Conejo Nº 1.—El área producida por la invección de Hialuronidasa con Hemoglobina, fué de 99.7 cm2. y el área producida por la invección de Hemoglobina con Suero fisiológico de 12.3 cm2.

Conejo Nº 2.—El área producida por la inyección intradérmica de Hemoglobina con Suero fisiológico fué de 12.6 cm2 y el área producida por la inyección de Hialurodinasa con Hemoglobina de 99,7 cm2.

Aumentó mucho la actividad Hialuronidásica después del

fraccionamiento con Etanol,

b) Método físico-químico. — Madinaveitia, en 1940, propuso el método viscosimétrico para valorar la Hialuronidasa. Se funda en el descenso de la viscosidad de las soluciones de Acido hialurónico, cuando se agrega la enzima. La unidad de viscosidad es la cantidad exacta que hace disminuir la viscosidad del Acido hialurónico a la mitad de su valor inicial, en 20 minutos.

Kass y Seastone idearon, en 1934, el método turbidimétrico, que se funda en la propiedad del Acido hialurónico de copular con las proteinas y precipitar en medio ácido. Se define la unidad turbidimétrica como la cantidad de enzima que reduce en 30 minutos, el enturbiamiento del Acido hialurónico al 50%.

c) Método químico.— Se funda en que la Hialuronidasa, actuando durante tiempo suficiente, produce la liberación de los constituyentes químicos fundamentales del Acido hialurónico, como la Acetilglucosamina. Por la cantidad liberada podría deducirse la actividad de la enzima.

APLICACIONES DE LA HIALURONIDASA

La Hialuronidasa es enzima que cada vez va adquirienco mayor importancia. Sus aplicaciones son muchas, siendo las más conocidas, las siguientes:

Hialuronidasa e hipodermóclisis.— Hechter, en 1947, y Burket y Giorgi, en 1947, han probado que la Hialuronidasa es muy activa para diseminar los liquidos suministrados por Hipodermoclisis y aumentar la absorción. El estudio se hizo en niños de 4 días a 12 años de edad, que padecían diferentes enfermedades. El liquido para la hipodermoclisis contenía 2% de giucosa y 5% de Suero fisiológico; para las inyecciones se empleó el área de los muslos, en uno de los cuales se inyectaba la solución de glucosa y suero fisiológico y en el otro, la misma, más Hialuronidasa. Todos los niños, hasta la edad de 2 años recibieron 125 cc. La dosis de Hialuronidasa fué de 0.8 mg.

En todos los casos, la absorción fué más rápida, cuando la solución contenia Hialuronidasa; no hubo induración ni dolor. No hubo reacciones febriles atribuibles a la Hipodermoclisis. La inyección de 1 cc. de una solución que contenia 0.8 mg. de Hialuronidasa a niños sanos y a niños enfermos, no produjo reacciones tóxicas.

Absorción de colorantes radio-opacos.— La Hialuronidasa se inyecta por vía intradérmica inmediatamente antes de administrar el colorante en el mismo sitio, comprobándose que la pielografía se obtenía con la mitad de la dosis habitual del colorante, en los casos que recibieron Hialuronidasa. Los órganos ofrecían contraste más profundo y más claro, en las personas que recibieron la enzima.

Anestesia local.— Kirby y sus asociados han demostrado que la Hialuronidasa aumenta el área de anestesia efectiva, cuando se la mezcla con soluciones de Procaina. La adición de Adrenalina produce vaso-constricción marcada, palidez en la piel, aumentando la duración con una demarcación clara del área afectada.

Quimioterapia.— Gasisford y Evans han demostrado que la concentración sanguínea de las sustancias farmacológicas, quimioterápicas, se produce rápidamente, junto con Hialuronidasa, seguramente por facilidad de absorción.

Hialuronidasa e infecciones.— Los tejidos de sostén, poseen resistencia natural a la penetración de microbios patógenos, por contener sustancia viscosa, siendo el poder de invasión de muchas bacterias, el resultado de su capacidad de producir Hialuronidasa que destruye la sustancia viscosa.

El estafilococo aúreo y el estreptococo hemolítico producen grandes cantidades de "Factor de difusión"; el neumococo tipo I, produce también Hialuronidasa. En cambio, existen bacterias virulentas que no producen "Factor de difusión", como el bacilo tuberculoso, el meningococo, el tífico, las ricketsias.

Se ha propuesto dividir las bacteria, en: invasoras y no invasoras, según que produzcan o nó Hialuronidasa.

Las grandes cantidades de Hialuronidasa producidas por bacterias invasoras permiten fácilmente comprender el mecanísmo de la forma de extenderse, por ejemplo, de la erisipela y también de la dramática invasión de los tejidos infectados con gérmenes de la gangrena gaseosa, etc. La rápida invasión del pulmón en la neumonia lobar, también debe mirarse desde este punto de vista (Duran Reynals, 1930).

La Hialuronidasa que producen las bacterias, desempeña papel importante en la gravedad de las infecciones. El organismo se defiende elaborando sustancias antagonizantes. En la sangre existen normalmente sustancias que neutralizan la Hialuronidasa y que se conocen con el nombre de antiinvasinas. Solo se han encontrado en la sangre, y nunca en los tejidos. La acción difusora se detiene en las áreas inflamadas, según Durand Revnals.

En los pacientes con enfermedades infecciosas, el suero sanguíneo presenta mayor cantidad de antihialuronidasa que el de sujetos aparentemente sanos. Thompson ha comprobado estos hechos en 1948, en la neumonia neumocócica, etc.

Historonidasa y neoplasias.— Duran Reynals demostró. en 1931, que los extractos de tumores malignos, poseían "Factor difusor" pronunciado. Posteriormente, Boylan y Mc. Clean, probaron que existía paralelismo entre la rapidez del crecimiento y el contenido en "Factor de difusión". Nakanson y Glisk, en 1948, han observado que en los enfermos con tumores malignos, no metastásicos, la antiinvasina del suero está aumentada en 52 %. En los casos de tumores metastásicos el aumento alcanza una cifra media de 40 %. Por el contrario, en los pacientes portadores de tumores benignos, no había ninguna diferencia con los normales. Esto apoya la presun ción del posible papel de la Hialuronidasa en la malignidad de los tumores.

Hialuronidasa y gérmenes capsulados.— Existen gérmenes virulentos con cápsulas Hialurónicas. Rothbard, en 1948, comprobó que cuando a los microorganismos se les quita la cápsula, por medio de la Hialuronidasa, se hacen más susceptibles a la fagocitosis. Igualmente en las infecciones in vivo, en el ratón, se ha conseguido protegerlos con Hialuronidasa.

La Hialuronidasa puede producir una cierta acción contra los gérmenes encapsulados, aunque no es, sin embargo, aplicable en la práctica, puesto que por una parte es débil y por otra existe el riesgo de aumentar la capacidad invasora en los

tejidos del agente infectante.

Hisluronidasa y fecundación.— El testículo de los mamíferos es el que contiene mayor proporción de Hisluronidasa. En 1942, Mc Clean y Rowlands hicieron la interesante observación que la Hisluronidasa es capaz de desintegrar el cúmulo celular que rodea al óvulo recién expulsado del ovario, y esto sin producir en la célula ninguna alteración. Kurtzrock es quien ha estudiado mejor la intervención de la Hisluronidasa en el proceso de la fecundación.

Hialuronidasa y reumatismo.— Esta enfermedad de origen tan oscuro en sus diversas modalidades, resulta interpretada en su mecanismo patogénico, cuando se hace intervenir a

la Hialuronidasa.

En el año 1945, el investigador español F. Guerra, trababajando en México, hizo la trascendental observación que los salicilatos administrados, por vía digestiva, eran capaces de in hibir la Hialuronidasa. La difusión de la tinta china, disminuía, si el animal había sido inyectado con Salicilato sódico. En enfermos con fiebre reumática, se producen al hacer la inyección intradérmica de Hialuronidasa, reacciones enormes y el colorante se difunde por todo el brazo, al mismo tiempo que se determina edema local. Los salicilatos inhiben esta reacción. Guerra concluyó que en el mecanismo patogénico del reumatis mo; interviene la Hialuronidasa desintegrando el Acido hialurónico del líquido sinovial y de las estructuras particulares, dando lugar a las reacciones inflamatorias características. La ac

ción curativa del Salicilato de sodio se debe a su capacidad inhibidora del fermento. La interpretación es verosimil, puesto que los gérmenes señalados como causantes del reumatismo, son activos formadores de Hialuronidasa, (estreptococo hemolitico).

Meyer, en 1949, demostró que el Acido salicílico no era capaz de inhibir in vitro, la acción de la Hialuronidasa. Sin embargo, la acción in vivo se confirmó repetidamente y por lo tan-

to, el problema seguía en pie.

Cohen, en 1949, ha observado que el Acido hialurónico que existe en el líquido sinovial de los enfermos reumáticos, es diferente del existente en el líquido sinovial normal y que en estos enfermos existe una mayor producción de Acido hialuró nico, posiblemente como reacción frente a la incapacidad de función que él mismo ejerce, ya sea que inicialmente se produce alterado, o por que se altere una vez producido, por la Hialuronidasa presente en el organismo, como lo afirma F. Valdecasas, de Barcelona.

Regan y Meyer, en 1949, confirmaron las comprobaciones de Cohen, pero, en lugar de considerar la viscosidad, como elemento de diferenciación, relacionan el logaritmo de la misma con la dilusión; el cociente entre dicho logaritmo y la concen-

tración de Acido hialurónico tiene valor constante.

Teniendo en cuenta que la viscosidad del líquido sinovial, depende casi por completo del Acido hialurónico y este ácido es tanto más viscoso cuanto más polimerizado está, el cociente logarítmico de viscosidad partido por la concentración de Acido hialurónico, da una idea del grado de polimerización de este ácido en el líquido que se estudia.

En las personas no afectadas de enfermedad articular alguna, el cociente fué siempre superior a 10, mientras que en los reumáticos fué siempre inferior a este número. El grado de despolimerización corre paralelo con la actividad del proceso patológico, es decir, que cuando la enfermedad es más activa, la polimerización es mayor.

Campani, en 1942, observó que los exudados inflamatorios contienen, siempre bastante cantidad de Acido hialurónico, mientras que los trasudados no lo contienen, por un mecanis-

mo activo de defensa.

En la enfermedad reumática existe una alteración del Aci do hialurónico, siendo posiblemente la causa inicial de la en-

fermedad.

Diversos investigadores han estudiado los metabolitos, en que se transforma el Acido salicílico en el interior del organismo. Meyer y Regan comunicaron a fines de 1948, que uno de estos metabólitos el Acido Gentísico tiene in vitro acción anhialuronidásica, que falta a los salicilatos, y Lowental y Cagnon han comunicado, casi simultáneamente, que la sustancia

CENT

activa no es en realidad el Acido gentísico, sino un derivado de éste, la carboxiparabenzoquinona. Valdecasas, en 1949, ha de mostrado que tiene mayor toxicidad, que carece de acciones irritantes sobre la piel y mucosas, cosa que posee el Acido salicífico en alto grado y que su actividad antireumática es, además, muy superior.

En la "Mayo Clinic", un grupo de investigadores, entre los que se encontraba el célebre químico Kendall, afirmaron, en abril de 1949, que son sorprendntes los resultados obtenidos con la fracción E de las Hormonas de la corteza suprarrenal O 17-hidroyi 11 dihidro-corticoesterona. Aunque se conocen muchos datos clínicos de las interrelaciones existentes entre trastornos endócrinos y artritis, etc., a la luz de la teoría hialuronidásica, la solución puede orientarse estudiando las relaciones entre el fermento y las sustancias endócrinas.

Glick y col, han trabajado intensamente en los últimos años, en estos problemas. Seifter y colaboradores han probadc que existe correlación entre la teoría hialuronidásica y el efecto de la Cortisona en el reumatismo, estudiando el efecto de la Hialuronidasa y diversas hormonas esteroides sobre la permeabilidad, tanto in vitro como in vivo de la vejiga urinaria. La Hialuronidasa aumenta en forma ostensible la permeabilidad, aboliendo prácticamente, por completo, su condición de semipermeabilidad, es decir, que convierte la vejiga urinaria en una membrana que deja pasar fácilmente los electrolitos, la glucosa, etc. El efecto es reversible y al cabo de un corto tiempo (1 hora) la permeabilidad vuelve a disminuir, restableciéndose por completo a las 3 horas. Los extractos de la Corteza suprarrenal, la Testosterona, la Estrona, inhiben este efecto en gran proporción. En cambio, la Desoxicorticosterona tiene un efecto semejante al de la Hialuronidasa y aumentan enormemente el efecto de ella.

Invectando un colorante en la cavidad articular, se mide, entonces, el tiempo requerido para que dicho colorante aparezca en la orina, tiempo que indica la velocidad de paso del mismo a travez de la membrana sinovial. Seifter ha podido comprobar que la Cortisona y la denominada Artistona, actúan rápi mente en los enfermos, por su acción sobre la membrana sinovial. La Cortisona cura las alteraciones articulares producidas por la Hialuronidasa en patología experimental; la acción de la droga en la clínica humana debe tener el mismo mecanismo.

Las aportaciones experimentales más recientes apoyan la teoría Hialuronidásica del reumatismo. Tanto en artritis reumatoide como en la fiebre reumática, es evidente que existe una alteración del Acido hialurónico, y que esta alteración, es en todo semejante a la que in vitro produce la Hialuronidasa sobre él. Todos los medicamentos antireumáticos, actúan, especialmente in vivo, como substancias antihialuronidasa, desde los salicila-

tos a la Cortisona; las alteraciones reumáticas experimentales producidas por la Hialuronidasa, se tratan con éxito por los medicamentos antireumáticos. El mecanísmo patogénico de Guerra parece, por lo tanto, totalmente establecido en la actualidad.

CONCLUSIONES

- 1.—El "Factor de difusión" de Duran Reynals, aislado en 1928, es idéntico a la Hialuronidasa descubierta por Meyer en 1936.
- 2. Se ha preparado, por primera vez en el Perú, Hialuronidasa, a partir de testículo de toro.
- 3. Se la ha caracterizado debidamente, encontrándose que corresponde a la que fabrican los laboratorios extranjeros, ofreciendo las reacciones biológicas que señalan los investigadores que la han estudiado.
- 4.—La Hialuronidasa es enzima, que parece de constitución química diferente, según su procedencia, porque antigénicamente pueden distinguirse; son sin embargo, mucopolisacáridos.
- 5.—La importancia de la Hialuronidasa, se deduce después de saber que interviene en el proceso etiogénico de los gérmenes patógenos, de modo que su virulencia es casi paralela con la capacidad de formación de esta enzima, en la difusión de veneno de serpientes, abejas, etc., en la destrucción de la cápsula de muchos microbios patógenos, como estreptococos y neumococos, que contiene Acido hialurónico, en la fecundación de los mamíferos y en el mecanismo patogénico del reumatismo.

BIBLIOGRAFIA

- Duran Reynals et Pi Suñer J.— Exaltación de l'activité du estaphilocoque par les extraits testiculaires.— "Comptes rendus de la Societé de Biologie".— Vol. 99.— Pág. 1908.— París 1928.
- Douglas Mc Clean.— The influence of testicular extract on dermal permeability and the response to vaccine virus.— "Journal Pathology and Bacteriology".— Vol. 33.— Pág. 1045.— London 1930.
- Pike R. M.— Failure of Sodium salicilato to inhibit hialuronidase.—
 "Science".— Vol. 105.— No. 2.— Pág. 2782.— (Washington 1947.
- 4) Guerra F.— La Interacción del salicilato de sodio y de la sulfadiazina corre la Hialuronidasa en el conejo.— "Archivos del Instituto de Cardiología de México".— Vol. 16.— Pág. 1.— México 1946.
- 5) Guerra F. y Robles J.— Estudios sobre el reumatismo; inhibición de la Hialuronida a por el salicilato de sodio en individuos normales.— "Archivos del Instituto de Cardiología de México".— Vol. 16.— Pág. 293.— México 1946.

- 6) Guerra F.— Inhibición de la Hialuronidasa por el salicilato de sodio en fiebre reumática.— "Science".— Vol. 103.— Pág. 1082.— Washington 1949.
- 7) Dorfman Albert and Reimers Elizabeth.— Action of sodium salicilate in Hialuronidase.— "Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine".— Vol. 64.— Pág. 357.— Washington 1947.
- 8) San Max and Suesman Mary.— Enhancement of penetration of peniciline into imflamet and normal Mucous Membrane by Hialuronidase.— "Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine".— Vol 70.— No. 1.— Pág. 96.— Washington 1949.
- 9) Monroe, Freeman, Anderson, Oberg, and Dorfman.— Preparation of Hialuronidase.— "The Journal of the Biological Chemisitry".— Vol. 180.— Pág. 395.— Boston 1949.
- 10) Madinaveitia J.— Studies on testicular extract.— "Biochemical Journal".— Vol. 32.— Pág. 1806.— London 1938.
- 11) Tint Howard and Bogash Richard.— Purification of Hialuronidase.—
 "The Journal of Biological Chemistry".— Vol. 18.— No. 2.— Pág. 502.— Boston 1950.
- 12) Boltraffio C.— La Jaluronidasi: Sintesi dei fenomeni biologici relativi e rassegna critica dei métodi d' indagine.— "Il Farmaco".— Vol. 4.— Pág. 51.— Pavia 1949.
- 13) Delbert M., Bergenstal M. and Wallace William.— Studies on Hialuronidase.— "The Journal of de American Medical Association".— Vol. 137.— Pág. 1507.— Chicago 1948
- 14) Tanturi Carlos, Anderson R. y Cánepa J.— Lecitinase y Haluronidasa en la obstrucción intestinal experimental.— "El Día Médico".— No. 14.—Buenos Aires 1950.
- 15) Mondolfo Hugo.— Investigación del Acido Hialurónico en la cápsula de la "Escherichia Coli".— "Archivos de Farmacia y Bioquímica de Tucumán".— Vol. 4.— Pág. 135.— Tucumán 1946.
- 16) Pérez Charles.— L' Hialuronidase.— "La Semaine des Hopitaux".— No. 48.— Pág. 2071.— París 1949.
- 17) Valdecasas F.— Nuevos Progresos en el tratamiento del reumatismo— "Acta Médica Hispánica".— No. 58.— Pág. 395.— Sevilla 1949.
- 18) Valdecasas Francisco.— El fermento Hialuronidasa y su importancia en Medicina.— "Acta Médica Hispánica".— No. 60.— Pág.— Sevilla 1949.
- 19) Barondes R. de R., D. Levine and Feinstein M.— Artificial Insemination with modified seminal fluid.— "Western Medicine and Surgery".— Vol. 13.— Pág. 191.— Chicago 1949.
- 20) Humprey R.— The action of Hialuronidase of various sources on some substrates besides hyaluronic acid.— "The Biochemical Journal".— Vol. 30.— Pág. 425.— London 1936.
- 21) Humprey R.— The Kinetics of Hialuronidase action of various sources on Hyaluronic acid with a note on the anomalies found in the stimation of N—acetilglucosamine.— "The Biochemical Journal".— Vol. 30.— Pág. 430.— London 1936.
- 22) Meyer Carl.— The Biological significance of Hialuronic acid and Hialuronidase".— "Physiological Revue".— Vol. 27.— Pág. 335.— Philadelphia 1947.

- 23) Mc Clean and Rogers J'— The discovery of bacterial enzymes in infected tissues.— "The Lancet".— Pág. 434.— London 1945.
- 24) Claude and Durand Reynals.— Chemical properties of the purified apreading factor from Testicle.— "Journal Experimental Medicine".— Vo. 65.— Pág. 661.— New York 1937.
- 25) Madinaveitia J.— Mucolytic activity of diffusing factor preparations.— "Nature".— Vol. 146.— Pág. 197.— London 1940.
- 26) Favilli G.— Mucolytic effect of several diffusing agents and of diazotized compound (azoprotein).— "Nature".— Vol. 145.— Pág. 866.— London 1940.
- 27) Chain and Duthie.— Mucolytic enzime in testis extracts.— "Nature'.—Vol. 144.— Pag. 977.— London 1939.
- 28) Soldi A.— Jaluronidase e Hypodermoclise.— "Il Farmaco".— Vol. IV.— Pág. 105.— Pavia 1949.

Quino-Fanyl "Tonex"

COMPOSICION QUIMICA.

Quinina básica	0.06 gr.
Aleanfor	0.07 gr.
Aceites esenciales	0.27 gr.
Colesterina	6.08 gr.
Aceite de clima a n n	2 00

INDICACIONES.

Catarros nasales, bronquitis, gripe, broconeumonías, complicaciones bronco-pulmonares post-operatorias.

DOSIS.

1 ampolla de 2 cc., por vía intramuscular, diariamente. Niños Niños ampollas de 1 cc.



REY BASADRE 385.

MAGDALENA DEL MAR.

LIMA - PERU