

# LA HIALURONIDASA. ESTUDIO FARMACOLOGICO EXPERIMENTAL Y APLICACIONES TERAPEUTICAS

ANTECEDENTES - RESUMEN HISTORICO

Dr. J. L. GARCIA LUDEÑA

EN el año 1928 el investigador español DURAN REYNALS, trabajando en el Instituto Rockefeller de Nueva York, observó que los extractos de testículo agravaban las infecciones vacunales en los conejos, lo mismo cuando se inyectaban mezclados con la linfavacuna, que si se inyectaba con anterioridad a la vacunación antivariólica, en la zona cutánea en que ésta se va a realizar. El hecho se debe a que, según dicho autor, los extractos citados favorecían la difusión del virus variólico a través de la piel.<sup>39, 40.</sup>

Trabajos posteriores de CHAIN y DUTHIE en 1939<sup>33</sup> permitieron descubrir que dicha acción era debida a que los extractos de testículo contienen un fermento que ellos denominaron *hialuronidasa*, porque actúa despolimerizando el ácido hialurónico, principal constituyente del cemento intercelular, muy abundante en el humor vítreo del ojo, en la gelatina de Wharton del cordón umbilical (MEYER<sup>85</sup>), en el tejido conjuntivo humano y otros tejidos y órganos como la pleura, córnea, peritoneo, sinovia, etc.

A pesar de los muchos trabajos aparecidos en años sucesivos sobre la hialuronidasa, es lo cierto que sus numerosas propiedades biológicas, su acción fisiopatológica y, sobre todo, sus aplicaciones terapéuticas, continúan siendo objeto de discusiones ardientes. Solamente una de sus propiedades ha sido utilizada en la práctica con el interés y objetividad que merece. Nos referimos al papel que juega en la absorción de líquidos terapéuticos depositados en los tejidos y que está siendo utilizada, aunque menos de lo que debiera, en la técnica de las hipodermoclisis. En las diferentes especialidades comienzan a aparecer trabajos aislados con experiencias muy limitadas y que, a decir verdad, no han conducido al uso frecuente de este utilísimo fermento en la práctica habitual médico-quirúrgica.

**La sustancia fundamental del  
tejido conjuntivo. La colagena: su  
síntesis y despolimerización.  
Las collagenosis**

La sustancia fundamental del tejido con-

juntivo ha sido objeto de meticolosos estudios recientes por el interés despertado por el inquietante problema de las llamadas «enfermedades de la colágena», y gracias al avance de la investigación por el microscopio electrónico y la difracción de Rayos X, que han permitido la investigación física de estructuras de tamaño entre 0'2 micrones (límite de visibilidad) y 10 A (tamaño de las mayores moléculas). Y así se ha comprobado que las pretendidas *fibrillas de colágena* de la observación microscópica, están en realidad formadas por haces de protofibrillas de 50 a 100 A. Cada una de estas protofibrillas está constituida a su vez por cadenas laterales de polipéptidos (macromoléculas de 10 A.) Dichas cadenas tienen una columna axial a la que se engarzan otras cadenas laterales de *prolina*, *oxiprolina* y *glicina* que son las que determinan la capacidad de reacción de la colágena, teniendo forma helicoidal o plisada, para poder alargarse mecánicamente.

Toda la colágena tiene gran capacidad de imbibición y el agua penetra entre las fibrillas e incluso entre las cadenas citadas que se separan y por hidrólisis se origina un gel semejante a la gelatina.

Entre las fibras colágenas hay una sustancia fundamental, intercelular, que es un gel protéico, muy viscoso, que al parecer circula también por ciertos espacios perifibrilares, pero en su seno, ni el microscopio electrónico ni la difracción por Rayos X han permitido descubrir estructura ordenada alguna.

En la constitución química de la colágena figura un mucopolisacárido azufrado, el *ácido condroitinsulfúrico A* de rotación óptica de  $-30^\circ$  e hidrolizable por la hialuronidasa testicular pero no por la del neumococo, el *ácido condroitinsulfúri-*

*co B*, no hidrolizable por ninguna hialuronidasa y el *ácido condroitinsulfúrico C* también hidrolizable por la hialuronidasa testicular. Pero el componente más importante es el ácido hialurónico.

*El ácido hialurónico.* — Es un ácido de elevado peso molecular, que no es dializable a través de membranas de colodión, incluso de las de mayor porosidad; que por no estar ligado a ninguna proteína no tiene poder antigénico y que, con el agua, da lugar a un gel, semejante a la gelatina, de gran viscosidad.

Su aislamiento tuvo lugar en 1934, al lograr obtenerlo MEYER y PALMER<sup>86</sup> del cristalino del ojo, a lo que debe su nombre (hialos, significa cristalino).

Se sospecha que está formado por las células cebadas del mesénquima. MEYER y FELLING en 1950 hallaron su constitución química. Se trata de un mucopolisacárido no azufrado, polímero del disacárido beta - glucurónico - 1 - 3 - acetyl - glucosamina, constituido por restos de acetyl-glucosamina y de ácido glucurónico en la proporción de 1:1.

La fórmula descubierta por ellos se detalla en la figura 1.

Así como el organismo humano y el de los animales utilizan el ácido hialurónico en combinaciones que tienden a constituir zonas de revestimiento celular, también en la superficie de muchas bacterias y sobre todo en la cápsula de las que

la tienen, figura como constituyente el ácido hialurónico.

La síntesis de todos estos compuestos para dar origen a la colágena se hace por polimerización bajo la influencia de vitaminas, hormonas y fermentos, según el esquema núm. 1.

Una de las características de la sustancia fundamental conectiva es su gran resistencia a dejarse pene-

tración de la colágena que origina su licuación, su fluidificación y a veces la producción simultánea de otras sustancias patológicas que como la *hialina amiloide* y *fibrinoide* pueden depositarse en los órganos o tejidos, sobre todo en las paredes vasculares, dando lugar a ese mal conocido grupo de lesiones englobadas en la denominación vaga y genérica de "enfermedades de la colágena" o "colagenosis" (KLEM-

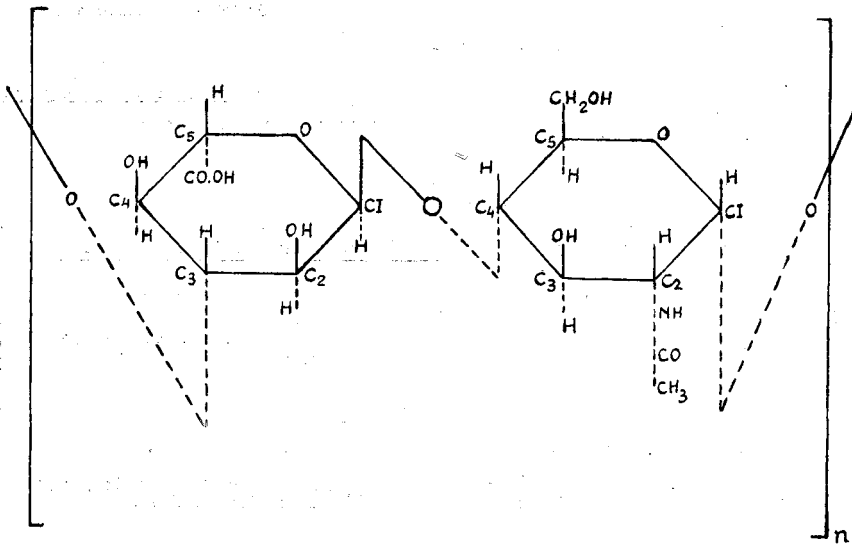


Fig. 1. — Fórmula del ácido hialurónico según K. H. MEYER y J. FELLING (1950).

trar por agentes extraños, representando por ello una barrera frente a la invasión orgánica de toda clase de elementos (sustancias químicas, bacterias, virus, toxinas...), siendo por lo tanto un verdadero elemento antidifusor.

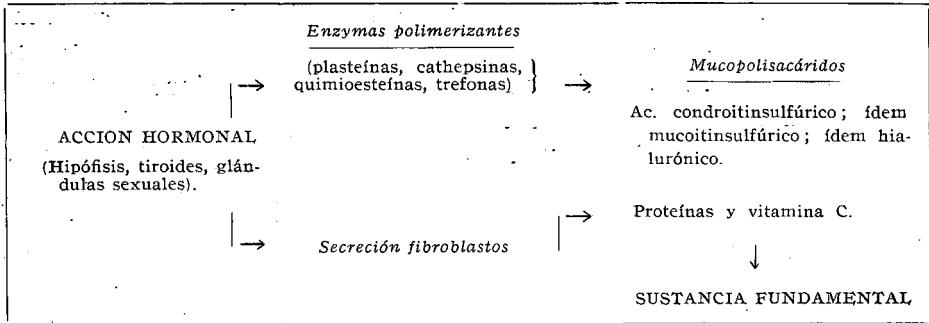
Pero el organismo, las bacterias y los virus tienen, a su vez, medios para destruir la sustancia fundamental mediante la despolimeriza-

PERER) que SELYE considera originadas por una alteración del metabolismo de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo, que conduciría a un aumento de producción de *adenosintrifosfatasa*, con exagerada desintegración consecutiva del ácido adenosintrifosfórico, todo ello motivado por una disreacción del sistema general de adaptación.

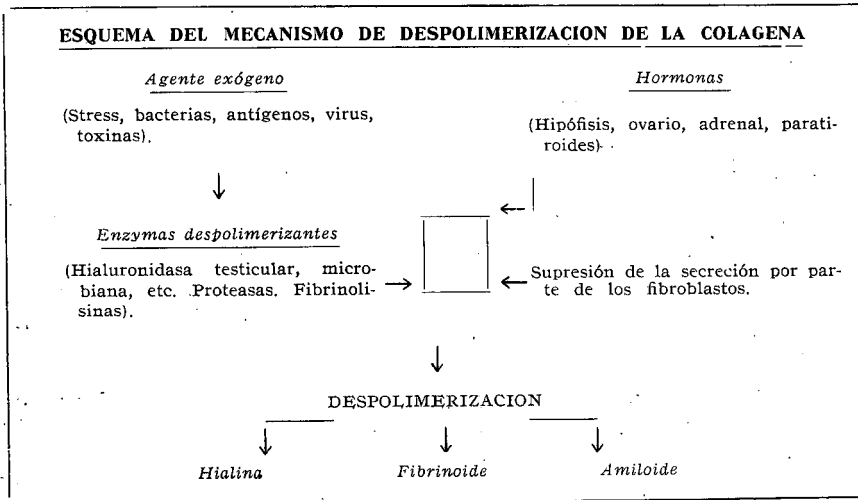
De todo ello se deduce la importancia que para nosotros tiene conocer el mecanismo de despolimerización de la colágena que sintetizamos en el esquema núm. 2.

diante el microscopio electrónico comprobando que las fibrillas de colágena quedan indemnes en medio de la sustancia fundamental que es licuada. En cambio no se ha com-

Esquema n.º 1



Esquema n.º 2



La despolimerización y consecutiva licuación del ácido hialurónico por la acción de la hialuronidasa ha sido estudiada en la intimidad de los tejidos por LELLI y MAROTTA<sup>75</sup> que han podido seguirla me-

probado que estos fermentos aumenten la permeabilidad capilar, atacando el cemento intercelular de los capilares. Podemos resumir este problema diciendo: el aumento de la permeabilidad del tejido se

realiza por la licuación de la sustancia fundamental, lo que permite la difusión del líquido que se inyecta por extensa zona, aumentando así extraordinariamente la amplitud de las áreas vasculares con que contacta, lo que motiva una más rápida absorción.

### La hialuronidasa

*Naturaleza.* — La hialuronidasa es indudablemente un fermento; su fórmula química no ha podido ser descubierta a pesar de los intensos trabajos efectuados con ese fin por MAC CLEAN, MEYER<sup>85</sup>, HUMPHREY y por el español A. MADINA VEITIA.

También se la conoce con el nombre de factor de *difusión* de DURAN REYNALS o *spreading factor* entre los anglosajones.

*Origen y localización.* — Se halla en muchos lugares del organismo humano y de los animales. Los extractos de casi todos los órganos la poseen en mayor o menor proporción. Así GIBIAN ha demostrado como los extractos de piel, hígado, lóbulo posterior de hipófisis, cerebro, pulmones, útero y placenta desintegran en mayor o menor grado el ácido hialurónico.

Pero de todos los órganos de los mamíferos, el más rico en este fermento es indudablemente el testículo en cuyos extractos se presenta en elevada concentración.

Pero a una concentración aun mayor que en el testículo se pre-

senta en el semen, por lo que se supone que es segregada por los mismos espermatozoos con objeto de disolver el cemento que une las células de cubierta del óvulo, quedando éste aislado, al descubierto, por lo que el espermatozoo puede entonces penetrar en él y fecundarlo. Solamente la producen los espermatozoos en el momento de su génesis, pero los ya maduros no tienen esa capacidad formadora, por lo que se limitan a ceder al medio ambiente la hialuronidasa que ya contenían. Exclusivamente cuando la concentración de espermatozoos en el semen es superior a 50 millones por centímetro cúbico, la cantidad de hialuronidasa del semen es capaz de liberar al óvulo de envoltura y, por tanto, capaz de motivar la fecundación. JOEL y EICHENBERGER<sup>68</sup> demostraron que un descenso de hialuronidasa en el líquido espermático ocasiona la esterilidad, aunque el número de espermatozoos fuese normal.

Por todo ello, WALLENFELLS<sup>128</sup> sostiene que este fermento desempeña un principal papel en la fecundación (hombre y mamíferos) aunque no esté totalmente aclarado.

También ha sido hallada en venenos y toxinas de serpientes, especialmente vipéridos (serpientes de cascabel), insectos, (abejas, mosquitos), arañas, cabezas de sanguijuelas, moluscos y en algunos tumores malignos. Igualmente está demostrada su presencia en los ex-

tractos de determinadas bacterias como el estafilococo, neumococo, *Clostridium welchii*, *Clostridium septicum* y estreptococos hemolíticos. El poder de invasión de estos microorganismos está relacionado con su riqueza en este fermento y por eso dichas bacterias tienen tendencia a originar infecciones generalizadas, bacteriemias y septicemias, al contrario que otros microbios como el *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, etc., pobres o carentes de hialuronidasa que apenas poseen capacidad de difusión, por lo que su acción patógena sobre el organismo se debe a las exotoxinas que liberan y que dan lugar más que a infecciones propiamente dichas, a toxemias o verdaderas intoxicaciones.

*Caracteres físico-químicos.\**—Se obtiene por extracción de testículos de toro y purificación consecutiva o por métodos especiales utilizados en el aislamiento y obtención de fermentos.

Este preparado, como todos los enzimas es muy sensible a las temperaturas elevadas y a las oscilaciones del pH.

Es inactivado a temperaturas superiores a 57° centígrados; igualmente se inactiva en un pH superior a 7'5 e inferior a 4.

Es destruido por la acción de los

rayos X, de los rayos ultravioleta, por la tripsina o pepsina y por la acción de productos químicos como el yodo, formol, etc.

No es dializable. Por su naturaleza proteica podría ser antigénico. Es soluble en el agua y ácidos débiles. Insoluble en alcohol y en otros disolventes orgánicos.

En polvo se conserva casi indefinidamente, pero no en solución. Una vez disuelta, si lo es en concentraciones débiles, se puede conservar en sitio fresco, pero si es en concentraciones fuertes (500 T. R. U.), para que conserve sus propiedades durante 15 días, ha de ser conservada en la nevera a baja temperatura (2 a 5 grados). Por ello, las casas productoras lo presentan en forma de polvo estéril de elevada actividad.

Los preparados comerciales contienen el fermento en forma de polvo seco y liofilizado estéril, que se disuelve en el momento del empleo en suero fisiológico (1 ó 2 c.c.) o en otros líquidos (soluciones de novocaína, etc.) con la condición que tenga un pH entre 4 y 7'5 (el pH óptimo es 4'5).

*Toxicidad.* — Para investigar la toxicidad de las muestras utilizadas en nuestras experiencias y trabajos hemos procedido de la siguiente forma: Elegimos como ani-

\* Para realizar todos los trabajos y experiencias hemos utilizado la hialuronidasa que los *Laboratorios Drovysa* pusieron ampliamente a nuestro alcance, con profusión y generosidad desinteresada ante nuestra solicitud, por lo que creemos un deber moral expresarles desde estas páginas nuestro agradecimiento.

males de experiencia 15 ratones blancos y 5 conejos comunes.

A cada ratón le inyectamos por vía venosa (en la vena dorsal de la cola) 50 unidades viscosimétricas de hialuronidasa por gramo de peso del animal. El peso osciló entre 22 y 28 gramos y con arreglo a él fué calculada la dosis del fermento.

A los cinco conejos también se les inyectó la hialuronidasa en la vena marginal de la oreja en dosis que oscilaron entre 86.250 y 105.750 unidades viscosimétricas (a razón de 50 unidades por gramo de peso).

La observación de los veinte animales se efectuó durante los veinte días que siguieron a la inyección. Solamente uno de los conejos presentó taquicardia, erizamiento de pelo y anorexia a continuación de la inyección, desapareciendo a las 48 horas todos los síntomas. En los demás animales no se apreció ningún trastorno y fueron considerados como normales una vez transcurrida la observación y destinados, por ello, para ser utilizados en otros trabajos de laboratorio.

De esa experiencia sacamos como conclusión *la total atoxicidad del fermento administrado incluso a dosis mucho mayores que las habituales en sus usos en la clínica humana.*

Otra conclusión es que si por error o defecto de técnica se inyecta la hialuronidasa en vena, no se

produce trastorno alguno, porque además de ser atóxica, existen, como luego veremos, sustancias anti-hialuronidasa en sangre que la inhiben o neutralizan.

Conocemos, por otra parte, algunas experiencias referentes a este problema publicadas en la escasa bibliografía mundial sobre esta materia. ELSTER y colaboradores<sup>42</sup> inyectaron a una rata de 150 g., 7.500 unidades viscosimétricas del fermento por vía venosa, sin que le sobreviniera trastorno tóxico alguno.

JAWORSKI y FARLEY<sup>67</sup> a un grupo de niños le inyectaron siete días consecutivos dosis de 25 a 250 unidades viscosimétricas; controlaron la temperatura, proteinemia, uremia y cardiograma, sin descubrir ninguna alteración o síntoma de tipo tóxico.

*Experiencias sobre el poder anafilactógeno de la hialuronidasa.* — Como sustancia proteica que es la hialuronidasa, teníamos el temor de que pudiera desencadenar en los animales el temido choque anafiláctico, cuando transcurridos ocho días después de la primera dosis se le administrara al animal una segunda dosis con fines experimentales, lo que suponía idéntico peligro para el hombre cuando fuera usada en él repetidamente con fines terapéuticos.

Teniendo en cuenta la facilidad de provocación del choque anafiláctico en el cavia, fueron elegidos cin-

co ejemplares de este animal para efectuar nuestra experiencia. Sabido es que este choque tiene signos clínicos característicos en el cavia (disnea, taquicardia, agitación, hipotermia, hipotensión y muerte) y además origina una serie de alteraciones en el suero que se conocen con el nombre de "crisis hemoclásicas de Widal" entre las que figurarán el descenso del número de plaquetas, leucopenia, descenso del ín-

5 c.c. de hialuronidasa por vía muscular y a los diez días una segunda inyección intravenosa de 1'5 c.c. del mismo producto.

La observación clínica de la temperatura, pulso y respiraciones se hizo a los 10 minutos, a la hora y a las 24 horas de la segunda inyección. Las extracciones y análisis hemáticos se efectuaron en momentos simultáneos a los de las observaciones clínicas anteriores.

#### CUADRO N.º 1

Temperatura, pulsaciones, y respiraciones por minuto del cavia normal.

Temperatura rectal	Pulso (latidos cardiacos)	Respiraciones
38'6º	150	80

#### CUADRO N.º 2

Características sanguíneas del cavia normal.

Glóbulos sanguíneos por mm <sup>3</sup> .		Fórmula leucocitaria		
Leucocitos	Hematis	Mononucleares	Polinucleares neutrófilos	Polinucleares eosinófilos
15,000	5,300,000	53	46	1

dice refractométrico del suero, disminución del tiempo de coagulación y aumento del número de hematis.

Para efectuar esta experiencia es preciso recordar las cifras normales de ciertas constantes fisiológicas y sanguíneas del animal elegido y que exponemos en los cuadros adjuntos <sup>99</sup>.

A cada animal se le inyectaron

Podemos resumir las observaciones y los datos hallados en el cavia al intentar provocar en él la anafilactización de esta forma: Taquicardia durante los primeros minutos siguientes a la inyección, ligera taquipnea, débil reacción neutrófila.

Si a esto se añade que tampoco observamos más que ligeras alteraciones clínicas (disnea poco intensa



y agitación pasajera) se puede concluir de nuestra experiencia que la hialuronidasa *no tiene potencia anafilactógena*.

*Valoración. Unidades de hialuronidasa.* — Aun cuando, desgraciadamente, no se ha establecido una standardización internacional para este preparado, se han adoptado, aunque en forma anárquica, varias unidades de este fermento. Por ello vamos a definir las principales y, al final, expresaremos en un cuadro las equivalencias entre ellas, lo que nos facilita el cálculo cuando un trabajo determinado esté referido en la dosificación a una sola de ellas.

*Unidad viscosimétrica* (Viscosity Reducing Unit). Se calcula por el método viscosimétrico de MADINA-VEITIA. Se funda en que la viscosidad de las soluciones de ácido hialurónico es disminuida por la hialuronidasa, tanto más cuanto mayor es la concentración o cuantía de este fermento, y se define así: "la unidad viscosimétrica es la cantidad de hialuronidasa necesaria para disminuir en el 50 % y en 20 minutos la viscosidad de una solución de ácido hialurónico dos veces y media más viscosa que el agua".

*Unidad turbidimétrica* (Turbidity Reducing Unit). Se funda en que al añadir ácido hialurónico o hialuronato potásico a una solución proteica acidificada, se produce una turbidez (por precipitación) que es

susceptible de ser reducida o disminuída cuando a la mezcla anterior se le añade hialuronidasa. Se define así: "La unidad turbidimétrica es la cantidad de hialuronidasa que se precisa para reducir la turbidez producida por la adición de 0'2 miligramos de hialuronato potásico a un suero de caballo acidificado, hasta igualar con la turbidez de otro volumen igual de dicho suero acidificado, al que solo se ha añadido 0'1 mg. de hialuronato potásico".

*Unidad Schering.* — Es la cantidad de hialuronidasa contenida en un centímetro cúbico de solución de dicho fermento, a tal concentración, que con 0'1 de dicha solución reduce a la mitad la viscosidad de 0'5 c.c. de disolución de ácido hialurónico al 1 por 100, a temperatura de 30° centígrados y a pH de 4'5, en diez minutos".

*Unidad U. S. P.*—Cada vez tiende más a usarse este tipo de unidad aparecida en la XV edición de la Farmacopea Americana, pág. 329. Se basa en el método turbidimétrico y la valoración de la actividad se hace frente a una muestra standard de hialuronidasa sancionada por la "Reference Standards U. S. P.". Una unidad U. S. P. equivale a una unidad turbidimétrica.

Otra unidad, empleada sobre todo por Casas francesas es la llamada unidad Bengier.

A continuación damos una tabla de equivalencias.

*Dosificación y administración de la hialuronidasa.* — Se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, siendo estas dos últimas utilizadas habitualmente.

Respecto a la dosis es natural que varíe según el uso que vayamos a hacer del fermento.

A este respecto fué interesante el descubrimiento de SOLDI<sup>116</sup> de que la velocidad de difusión de los líquidos inyectados no es directamente proporcional a la cantidad de hialuronidasa que se administra con ellos, por lo que es totalmente inútil

dosis de este fermento conviene sea elevada, por ejemplo, 250-500 unidades viscosimétricas disueltas en suero fisiológico para un hematoma de regular extensión. Ello se debe a que en el hematoma existen sustancias de acción antihialuronidasa.

Un detalle que no dudamos repetir por ser de transcendental importancia es que el líquido en que se mezcla tenga un pH de 4 a 7'5 (óptimo 4'5).

En los primeros trabajos que hicimos para determinar el poder difusor del fermento, tuvimos un

TABLA DE EQUIVALENCIAS

1 unidad U. S. P. =	1	unidad turbidimétrica
	3,3	unidades viscosimétricas
	1,5	unidades Bengel
	0,033	unidades Schering

la sobredosificación. Doscientas cincuenta unidades viscosimétricas son suficientes para inyectar de uno a dos litros de cualquier suero salino. En las infiltraciones anestésicas locales es suficiente inyectar 75 unidades viscosimétricas por cada 10 c.c. de solución anestésica y en las anestias tronculares igual cantidad por 5 c.c. Repetimos que la sobredosificación no origina molestias ni trastornos locales ni generales; es sencillamente inútil y por ello incluso antieconómica.

En cambio, en las infiltraciones para reabsorción de hematomas, la

fracaso sorprendente. Pronto averiguamos que la solución de hemoglobina obtenida como más adelante detallamos, resultaba muy ácida; fué suficiente ajustar su pH para que todo marchara bien.

Pero aun en los casos en que el líquido a inyectar tenga un pH inconveniente se puede utilizar este fermento con buen éxito. Para ello se inyecta la hialuronidasa sola en el tejido correspondiente y cuando transcurran diez minutos se inyecta el líquido en cuestión, con lo que su pH ya no dificulta ni interfiere la acción del fermento.

*Accidentes en la aplicación de hialuronidasa.* — Con los preparados de garantía prácticamente no existen. En primer lugar el margen de seguridad entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica es de 1 a 200.000.

Además, por ser una sustancia inerte no provoca reacciones locales de eritema, dolor, etc., ni generales de hipertermia, alteraciones hepato-renales o digestivas.

Y como hemos demostrado en las páginas anteriores no tiene acción anafilactógena.

Podemos afirmar sin dudarle que a todas las propiedades farmacológicas de este fermento, hay que añadir la muy fundamental de su inocuidad, lo que facilita extraordinariamente su aplicación en medicina y cirugía.

*Sustancias de acción antihialuronidásica.* — En este grupo se incluyen las sustancias que por algún mecanismo se oponen a la acción de este fermento. Se las conoce con el nombre genérico de *anti-invasinas* y, por lo general, actúan neutralizando la capacidad de difusión del enzima.

En primer lugar tienen acción antihialuronidasa, la colesisterina, estrona, progesterona, la hormona posthipofisaria, la ACTH, y la cortisona, que al parecer actúan sobre la sustancia fundamental del tejido conjuntivo haciéndola refractaria a la hialuronidasa.

De ello se deduce que las dosis

normales de este fermento en cualquier uso terapéutico deben ser dobladas por lo menos cuando se trate de enfermos sometidos a medicación de los productos antes citados.

De igual forma la neutralizan o inhiben, el ácido salicílico, los salicilatos, la hirudina, heparina, vitamina P y los antihistamínicos. El ácido salicílico y salicilatos actúan sobre ella por medio del ácido genticónico que resulta de la oxidación "in vivo" del ácido salicílico.

De todas ellas, tenemos experiencia personal solamente de los antihistamínicos, por ser administrados con frecuencia por diversas causas a enfermos de odontología y de esta experiencia se deduce que cuando la dosis de tales preparados es la normal, su efecto antihialuronidásico es tan ligero que al emplear en ellos el fermento con fines de anestesia no hemos tenido que aumentar la dosis habitual.

Pero donde más sustancias antihialuronidasa existen es en la sangre o mejor dicho, en el suero sanguíneo, siendo muchos los autores que las localizan precisamente en la fracción sérica globulina gamma. A ella se debe la inocuidad de la penetración accidental de hialuronidasa en el torrente circulatorio cuando por descuido o defecto de técnica se inyecta en vena. En los focos inflamatorios agudos, además de estar contraindicada la administración de este fermento por el peligro de difusión, es por otra parte muy poco eficaz, porque la di-

latación, permeabilización y trasudación capilar propias de la inflamación, dan lugar a la salida a sus tejidos de abundantes prótidos séricos que como demostró MENKIN, neutralizan al fermento, dada su riqueza en anti-invasinas.

*Determinación de la potencia antihialuronidasa del suero sanguíneo.* — La mayor o menor acción antihialuronidasa del suero sanguíneo por su mayor o menor riqueza en sustancias inhibitoras de este fermento, se ha propuesto por varios autores y entre ellos por BECKMANN en 1952, como prueba diagnóstica de determinados procesos.

BAYÉS FABREGÓ (Clínica médica del profesor M. SORIANO) estudió esta actividad<sup>119</sup> como prueba diagnóstica inespecífica, en un centenar de casos, en los que se incluían enfermos de afecciones diversas y sujetos sanos (testigos). La técnica que siguió fué la de BECKMANN y la exponemos a continuación.

1.º Se prepara una solución de ácido hialurónico al 1 por 100 en suero fisiológico y se madura por permanencia de cuatro semanas en la nevera.

2.º En dos tubos de ensayo se colocan 0'7 c.c. de suero problema y se etiquetan con los números I y II.

3.º Al tubo primero se le añaden 500 unidades viscosimétricas del fermento.

4.º Se llevan los tubos al Baño María a 37º durante 30 minutos.

5.º A ambos tubos se le añade a continuación 0'1 c.c. de una solución tampón de pH 4'5 preparada en el momento, mezclando 10 c.c. de solución normal de sosa

con 2'3 c.c. de ácido acético glacial. Agitar bien los tubos y dejarlos otros 15 minutos al Baño María a 37º.

6.º Se preparan dos series de tres tubos cada una, y en cada tubo se colocan 10 c.c. de una solución de metanol al 15 por 100 en agua destilada a los tubos primeros de ambas series; idem, idem, al 16 por 100 en los segundos y al 17 por 100 en los terceros.

7.º A cada tubo de la primera serie se añade ahora 0'1 c.c. del contenido del tubo etiquetado con el número 1 (que lleva hialuronidasa).

8.º A cada tubo de la segunda serie se le añade 0'1 c.c. del contenido del tubo etiquetado con el número II.

9.º Se agitan enérgicamente todos los tubos y se colocan una hora en la nevera.

10.º Se hace lectura en el fotocolorímetro utilizando filtro verde. Se leen por parejas los tubos de ambas series que llevan la misma concentración metanólica aplicando a cada uno la fórmula:

$$\text{Reducción del enturbiamiento} = \frac{100 \times \text{Lectura del tubo de la serie 1.}}{\text{Lectura del tubo equivalente de la serie 2.}}$$

Una vez efectuado el cálculo de la reducción del enturbiamiento en las tres concentraciones metanólicas se halla la media aritmética de los tres valores hallados, para calcular el valor medio. Los valores normales de reducción oscilan entre el 60 y 70 por 100. Naturalmente a mayor reducción del enturbiamiento por la hialuronidasa, menor cantidad de sustancias inhibitoras (antihialuronidasas) en el suero. O dicho de otra manera, las cifras halladas son inversamente proporcionales a la concentración de inhibidores de la hialuronidasa, en el suero problema.

Según las observaciones recogidas por BAYÉS FABREGÓ hay aumento de sustancias antihialuronidásicas del suero sanguíneo en las

neoplasias y disminución de las mismas en las cirrosis hepáticas.

Gracias a los progresos realizados en el estudio de las proteínas del suero sanguíneo por el método electroforético de Tiselius, se ha podido evidenciar que la potencia antihialuronidásica del suero se debe a dos factores: uno el factor inhibidor de la hialuronidasa que radica en la fracción albumínica del suero y otro, el anticuerpo antihialuronidasa que existe en la fracción gamma-globulina del espectro electroforético.

*Acción de la hialuronidasa sobre los tejidos.* — La acción fundamental de este enzima sobre los tejidos consiste en aumentar la permeabilidad del tejido conjuntivo y a la vez disminuir la viscosidad de los líquidos (sueros, plasma, etc.), que inyectemos en la zona impregnada con el enzima, y como consecuencia de ambas propiedades, facilita la difusión y paso a la sangre de los citados líquidos.

Como consecuencia tiene dos grandes aplicaciones en terapéutica; una de ellas es facilitar la penetración de sustancias (anestésicos locales, sueros, etc.), en tejidos anormales en los que las alteraciones patológicas (esclerosis, fibrosis postinflamatorias, etc.) o por su textura histológica especial, fuera difícil o retardada su impregnación, y como consecuencia, difícil o imposible la actuación terapéutica que buscamos.

La otra aplicación es facilitar la absorción rápida de productos medicamentosos (plasma, sangre, sueros salinos, etc.) cuando inyectados en el tejido celular subcutáneo normal (por no poder efectuarlo por vía venosa), urge su actuación y por ello deseamos que su difusión y penetración en la circulación general, sea mucho más rápida de lo que normalmente permite la vía subcutánea.

Como con anterioridad hemos estudiado la constitución, síntesis y despolimerización de la colágena y sustancia fundamental del tejido conjuntivo, sólo nos resta resumir aquí que la acción de este fermento se efectúa atacando la mucina y sustancia fundamental conjuntiva, despolimerizando el ácido hialurónico que es el constituyente fundamental de aquellos elementos, y consiguiendo así, como último resultado, el reblandecimiento y permeabilización de la sustancia fundamental e interfibrilar.

*Determinación de la potencia de difusión de la hialuronidasa utilizadas en este trabajo.* — Son muchos los métodos propuestos para medir la potencia de difusión de este fermento, pero todos ellos se fundan en medir el área de difusión de algunos colorantes, cuando se inyectan por vía intradérmica mezclados con hialuronidasa y comparando el área citada con la de otra inyección testigo del colorante sin el fermento.

Como tales colorantes, se han propuesto muchas sustancias. MEYER<sup>85</sup> recomienda la tinta china o el azul tripán en solución al 1 por 100, o una mezcla a partes iguales de una solución al 0'5 por 100 de citrato de hierro amoniacal y ferrocianuro potásico. Pero todas ellas tienen inconvenientes; unas por inhibir la hialuronidasa y otras por no poder ser administradas en solución isotónica.

MAHAUX y STIENLET<sup>89</sup> utilizaron como indicador coloreado para valorar la actividad de los preparados de hialuronidasa según la dispersión que provocan, la *hemoglobina* propuesta con anterioridad por MADINAVEITIA. FAVILLI<sup>44</sup> también recomienda la hemoglobina con este objeto.

Nosotros hemos procedido de la siguiente forma en nuestros trabajos experimentales:

*Preparación de la hemoglobina.* Recogemos 20 c.c. de sangre total de conejo o humana en un frasco de Erlenmeyer estéril, desfibrinándola y haciéndola incoagulable mediante agitación con perlas de vidrio. Se centrifuga y se vierte el plasma quedando sólo los hematies. A éstos le añadimos dos o tres veces su volumen de suero fisiológico; se agita la mezcla, se centrifuga y se decanta el líquido que sobrenada, obteniendo así los hematies puros, lavados. Se colocan en una probeta y se le añade agua destilada, cuya hipotonía provoca la hemólisis y la hemoglobina queda así disuelta. Se filtra la solución por bujía o filtro Seitz y al líquido hemoglobínico filtrado se le añade suficiente cloruro sódico (en la proporción de 8'5 gr. por 1000) para que resulte isotónico.

Esta hemoglobina se envasa en ampo-

llas estériles de 1 c.c., que cerradas a la lámpara se conservan en la nevera dispuestas para el uso.

*Técnica de la prueba de dispersión o difusión de la hemoglobina.* Se comienza preparando la mezcla de hemoglobina-hialuronidasa en la proporción que después indicaremos; se inyecta 0'5 c.c. de ella por *via intradérmica* (se ha de formar habón) en la piel bien depilada del dorso de un conejo común. Con otra jeringuilla se inyecta a corta distancia de la anterior 0'5 c.c. de hemoglobina sola, lo que nos permite comprobar el coeficiente de difusión espontánea de la hemoglobina usada. Finalmente y también a corta distancia de las anteriores, se inyecta con otra jeringuilla 0'5 c.c. de la mezcla hialuronidasa-hemoglobina-adrenalina (ver figura 2).

Como se puede apreciar, en las tres inyecciones se obtiene una mancha cutánea en forma elipsoidea. Se procede a calcular el área pigmentada a los 15, 30, 60 minutos y a las 24 horas siguientes al momento de la inyección:

Para calcular el área de la superficie pigmentada se miden en cada lectura los dos ejes mayores (D, d) de cada mancha elíptica; la superficie (s) o área de cada mancha se calcula por la fórmula:

$$S = \frac{D}{2} \times \frac{d}{2} \times 3,14$$

Aun cuando un mismo conejo podía ser utilizado para efectuar varios de estos tests, nos servimos de uno diferente para cada prueba, para descartar el factor terreno, que indudablemente hubiera podido motivar error en las experiencias. Utilizamos cinco conejos.

Por lo tanto, a cada conejo se le practicaron tres inyecciones intradérmicas; en una se le administró hemoglobina sola (H); en otra la mezcla hemoglobina-hialuronidasa (H-H); y en la otra la mezcla hemoglobina-hialuronidasa-adrenalina (H-H-A).

La mezcla H-H la obtuvimos añadiendo 500 unidades viscosimétricas del fermento a 90 c.c. de hemoglobina; en cada puntura se inyectaron 0'5 c.c.

Finalmente la mezcla H-H-A se obtuvo añadiendo a la mezcla anterior epinefrina en la proporción de 1 por 100.000; el volu-

men inyectado de esta mezcla fué también de 0,5 c.c.

Aun teniendo en cuenta la pérdida de detalles al conseguir el positivo fotográfico, se puede apreciar claramente la diferente extensión de las manchas correspondientes a las tres diferentes inyecciones.

Del estudio de esta experiencia se obtienen estas conclusiones:

3.º La adición de adrenalina a la hialuronidasa disminuye el área de dispersión en poca cuantía, pudiéndose valorar en 3'7 veces mayor que el área de dispersión de la piel normal.

4.º La absorción de hemoglobina ya es ostensible a las 24 horas

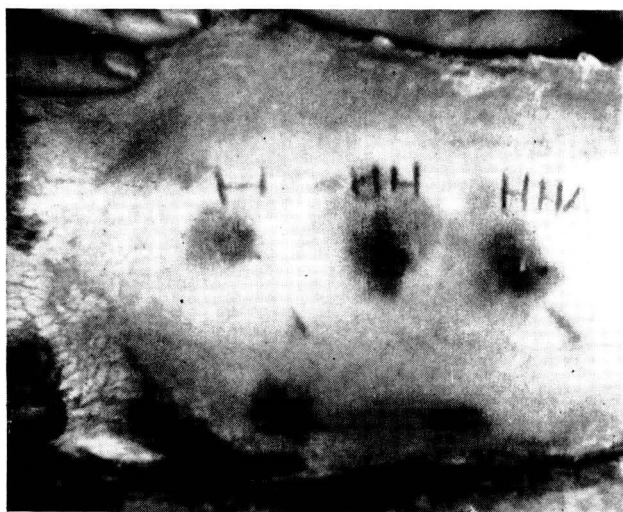


Figura 2. — En la piel depilada del cavia se han practicado tres inyecciones intradérmicas. La letra H con 0'5 c.c. de hemoglobina; la reseñada como H-H con 0'5 c.c. de mezcla de hemoglobina y hialuronidasa; finalmente, la correspondiente a las letras H-H-A con 0'5 c.c. de una mezcla de hialuronidasa, hemoglobina y adrenalina. La fotografía se efectuó a los 10 minutos de practicadas las inyecciones intradérmicas.

1.º La permeabilidad de la piel de la región que recibe hialuronidasa es por término medio 4'2 veces superior a la de la piel normal.

2.º Ya a los diez minutos de hialuronizada la piel su permeabilidad adquiere casi el incremento máximo, pues las áreas de dispersión a los 30 y 60 minutos son sólo ligeramente mayores que a los diez minutos.

y es bastante más lenta en las áreas que además de hialuronidasa recibieron adrenalina.

*Nota.* Aun cuando no se deduzca de esta experiencia, sino de otras que hemos realizado, queremos hacer constar aquí anticipadamente, que cuando el líquido inyectado con hialuronidasa es la novocaína, la persistencia de su efecto anestésico local es bastante menor que cuando

se inyectan ambas mezcladas con adrenalina.

*Hialuronidasa e infección.* — He aquí un problema que constituyó un motivo de precaución para nosotros antes de decidirnos a utilizar este fermento con la prodigalidad que hoy lo hacemos en nuestra consulta privada. Indudablemente la constelación hialuronidasa - ácido hialurónico representa un factor a tener en cuenta en la patogeneidad y virulencia de muchas bacterias. Ya vimos que sobre todo las capsuladas (*B. antracis*, *Cl. septicum*, *Cl. edematiens*, neumococos, estreptococos, etc.) tienen gran cantidad de ácido hialurónico, sobre todo en dicha cápsula. Pues bien, estas mismas bacterias son a la vez las más productoras de hialuronidasa, al parecer, porque mediante este fermento, renuevan la cápsula, que como se sabe desempeña capital importancia en su virulencia y acción patógena.

Dadas las características de la acción del enzima sobre el organismo, parece lógico admitir que podría desempeñar un papel importante en la virulencia bacteriana e incluso en la "invasividad" de los microorganismos, lo que motivaría la contraindicación de su uso en todo foco de infección, por el peligro de difusión o generalización.

Como en la mayoría de los procesos dentales en que tiene aplicación este fermento, como potenciador o posibilitador de anestésicos locales,

hay focos de infección local, limitados, en los que a la luz de modernas investigaciones existen bacterias de escasa virulencia en las que predomina su "capacidad de persistencia" sobre su "capacidad de invasión", se comprende el interés con que hemos procurado estudiar este asunto, siempre poseídos del lógico temor de la generalización de la infección, de convertir en septicemia lo que no es más que un simple foco de leve infección local.

Por otra parte, como veremos a continuación, consultando la bibliografía extranjera acerca de la pretendida posibilidad de difusión de focos al actuar sobre ellos este fermento, comprobamos que la opinión no era unánime, ni mucho menos, y autores de la categoría científica de DURAN REYNALS, niegan rotundamente dicha contingencia.

CORPER y COHN<sup>32</sup> refieren la observación de diseminación de la tuberculosis experimental cuando se inyecta en el cavia el bacilo de Koch mezclado con hialuronidasa.

Nosotros inyectamos tres cavia en la cara interna del muslo con una suspensión de bacilo de Koch en suero fisiológico, añadiéndole a cada centímetro cúbico 250 unidades viscosimétricas de este fermento. Un cuarto cavia recibió igual dosis de bacilos pero sin hialuronidasa. He aquí el curso clínico de la infección en cada uno de ellos:

**Primer cavia.** El granuloma específico local se inició clínicamente a los doce días; la muerte ocurrió a los 56 días.

**Segundo cavia.** Granuloma local a los catorce días; muerte a los 42 días.

**Tercer cavia.** Granuloma local a los diez días; muerte a los 47 días.



En la evolución de la tuberculosis experimental (fiebre, adelgazamiento, poliadenitis, etc.) no se apreció diferencia ostensible entre los cuatro animales inoculados.

En resumen: no hemos comprobado que tenga realidad la hipótesis de CORPER y COHN<sup>32</sup> de que la hialuronidasa favorece la difusión de la tuberculosis experimental.

En contra de la hipótesis antes citada de CORPER, y COHN, se alza la de ROTHARD<sup>108</sup>. Este autor opina que, por el contrario, la hialuronidasa actúa favorablemente sobre las infecciones, facilitando la acción de los anticuerpos que han de destruir a las bacterias y favoreciendo la fagocitosis de los microorganismos por los histiocitos y grandes monocitos.

Además ROTHARD y otros investigadores han demostrado que la hialuronidasa atenúa la virulencia de los estreptococos por el hecho de la despolimerización del ácido hialurónico, componente de su cápsula, cuando es de todos conocido y admitido que dicha cápsula tiene un papel transcendental tanto en la virulencia como en la patogenicidad del estreptococo, por radicar en ella los factores de difusión, persistencia y penetración, que regulan los procesos infecciosos de esta bacteria. Teniendo en cuenta la importancia extraordinaria que el estreptococo tiene en la mayoría de los procesos de infección focal, tanto oral como amígdalo-faríngea, se comprende la transcendencia que para nuestro objetivo tienen estas investigaciones norteamericanas.

SANNELLA<sup>111</sup> y DURAN-REYNALS, también sostienen que no hay inconveniente alguno en introducir este fermento en un foco infeccioso crónico o localizado.

Sería interminable enumerar los hechos ya comprobados en la medicina y cirugía de nuestros días, en los que el uso inocuo de este fermento en focos localizados de infección de curso crónico, corroboran la opinión de ROTHARD.

RAMOS<sup>102</sup> consiguió eliminar el bloqueo raquídeo en un caso de meningitis neumocócica, administrando por vía raquídea una mezcla de penicilina-hialuronidasa.

Recientemente EHLERT, para facilitar la llegada al foco tuberculoso pulmonar de medicamentos tuberculostáticos administrados por vía enteral o parenteral. (Pas, estreptomycin, etc.) somete al enfermo a aerosoles de hialuronidasa cuyas partículas de 1 a 5 micras de diámetro, llegan así hasta el foco, permeabilizándolo, para que los fármacos que circulan por la sangre puedan hacer acto de presencia en el foco.

Los resultados han sido buenos y no se observó agravación ni generalización de la infección.

No podemos extendernos por considerarlo fuera de lugar, en detallar las experiencias que además de las antes citadas hemos llevado a cabo para estudiar la exacerbación o atenuación de las bacterias cuando se inoculan en el animal junto con hialuronidasa. Solamente

las resumiremos diciendo que hemos hallado las dosis mínimas mortales de bacilos tíficos y de estreptococos entretenidos en cultivos de laboratorio, y después hemos inoculado dichas dosis mínimas mortales vehiculadas en soluciones de hialuronidasa y el resultado ha sido observar que tanto el período de incubación, como el curso, lesiones y gravedad de la infección experimental, han sido similares cuando se inocula la bacteria sola, que cuando va vehiculada en las soluciones del enzima.

De estas experiencias y de los hechos anotados de la bibliografía extranjera hemos llegado a la conclusión de que en las infecciones agudas, no delimitadas, en las bacterias que las originan suelen predominar los factores de difusión y dispersión y por lo tanto está contraindicado el uso de la hialuronidasa. Es más, no faltan quienes atribuyen poder antiinfeccioso a la hialuronidasa. Así HIRST<sup>66</sup> consiguió proteger a ratones contra la infección por estreptococos del grupo C, por medio de altas dosis de hialuronidasa.

KASS y SEASTONE citados por DELAUNAY y VOISIN<sup>34</sup> y<sup>35</sup> lograron lo mismo frente a estreptococos del grupo A, siendo corroborado este resultado por ROTHARD<sup>108</sup> muy recientemente.

Esto no quiere decir que este fermento vayamos a utilizarlo con fines terapéuticos, pues ni las altas dosis que ello requería ni la débil

acción anti-infecciosa que posee frente a algunas bacterias, aconsejaría tal medida. Pero anotamos no obstante estos hechos probados, que apoyaron nuestra decisión cuando comenzamos a utilizar este fermento, buscando su poder difusor de medicamentos, aunque se tratara de lesiones con infección larvada crónica o poco virulenta. Resumiendo nuestro modo de pensar diremos que un flemón en el suelo de la boca, una osteomielitis aguda, una sinusitis maxilar aguda, un proceso de gangrena bucal, etcétera, son contraindicaciones para el uso de este fermento, como potenciador o facilitador de la anestesia local.

En cambio en las periodontitis, infecciones periapicales crónicas, osteitis y granulomas apicales, etcétera y, en general, en todos los procesos dentales con el carácter de infección local, subaguda o crónica, no hay inconveniente alguno en utilizar este fermento con cualquier fin terapéutico que se desee.

Esta conclusión nuestra ha sido ya compartida por autores de la máxima solvencia científica.

Así, DELAUNAY y VOISIN<sup>34</sup>,<sup>35</sup> dicen textualmente refiriéndose a la acción de la hialuronidasa sobre las infecciones: "bajo su influencia aquéllas sufren a veces una agravación (cuando son originadas por microbios muy virulentos o muy numerosos) y otras veces una atenuación (cuando se trata de bacte-

rias poco numerosas o poco virulentas).

*Influencia de la presión intratrasular en el poder difusor de la hialuronidasa.* — Es muy notable el incremento en la intensidad y velocidad de acción de este fermento, cuando actúa a gran presión, en el interior de los tejidos, como se evidenció en las experiencias de HECHTER y col.<sup>59</sup>

Y así este mismo autor en 1947 demostró que era más activo este fermento en los tejidos firmes y fibrosos (como ocurre en tejidos de sujetos jóvenes) que en los tejidos blandos y laxos (como ocurre en los viejos).

Por otra parte, este aumento de la presión con objeto de elevar la rapidez e intensidad de acción del fermento, podemos conseguirlo sobre todo cuando lo inyectamos con jeringuilla o elevando la altura de la ampolla que contiene el líquido que se inyecta, habiendo sido principalmente BURKET y GÖRGY<sup>19</sup> así como HECHTER y col.<sup>59</sup> los que demostraron esta propiedad tan importante en la técnica de administración. A ella se debe su potente acción en la anestesia dental en la que se suman las dos características, tejido duro y poco extensible y gran presión de la inyección.

*Duración del efecto local.* — La acción eficaz, es decir, el tiempo que el tejido hialuronizado conserva su permeabilidad aumentada, es de 12 horas; a partir de ese mo-

mento comienza la normalización química e histológica del tejido y entre las 48 y 90 horas siguientes se han restablecido en él las condiciones bioquímicas y la consistencia que tenía antes de la inyección, y como han demostrado BUNTING<sup>18</sup> y HECHTER, y col.<sup>59</sup> transcurrido ese tiempo, la zona puede ser utilizada para recibir un nuevo medicamento con hialuronidasa.

*La hialuronidasa en los tumores malignos.* — Después de muchas investigaciones se ha determinado que en los extractos de tejidos tumorales existe una hialuronidasa químicamente definida.

Fueron HARRIS y HARRIS<sup>58</sup>, DURAN-REYNALS, DUX, GUERIN y LACOUR<sup>41</sup> los investigadores que demostraron este hecho hoy admitido definitivamente.

Según DURAN REYNALS, el poder difusor de los tumores malignos de estirpe epitelial es mayor que el de los sarcomas. BOYLAND y MAC CLEAN<sup>15</sup> constataron que el contenido en hialuronidasa de un tejido canceroso es superior al del tejido sano correspondiente.

Son muy interesantes los trabajos de HAKANSON y GLICK<sup>56</sup> al demostrar que en el suero sanguíneo de los cancerosos el título de la antihialuronidasa es más elevado que el de los sujetos sanos.

*Hialuronidasa y reumatismo.* — Existen vivos indicios de que la hialuronidasa juega un papel de

primer orden en la génesis de los reumatismos. Esta teoría tiene su punto de partida en la feliz experiencia de GUERRA <sup>55</sup> al demostrar que el salicilato sódico reducía el área de difusión provocada por la hialuronidasa y al observar que los glucocorticoides y la ACTH eran también a la vez medicamentos antirreumáticos y potentes inhibidores de la hialuronidasa.

El asunto está lejos de ser aclarado y podría resumirse diciendo que en el reumático hay un manifiesto desequilibrio entre la destrucción y regeneración de ácido hialurónico. Un excelente resumen de la cuestión, ilustrado con multitud de datos clínicos y experimentales lo constituye un trabajo de MASSONS <sup>84</sup>.

#### Usos de la hialuronidasa en medicina y cirugía

Ya se comprende que no puede constituir objetivo de este trabajo el estudio experimental y clínico de todas las aplicaciones que han ido descubriéndose en estos últimos años, de la hialuronidasa en Medicina, Cirugía y distintas especialidades.

Por ello, en este capítulo, no pretendemos más que resumir las aplicaciones terapéuticas en general, detallando únicamente aquellas que pueden tener una utilidad manifiesta en nuestra especialidad de estomatología y cirugía máxilo-facial (epidermoclisis, traumatología, ro-

turas fibrilares musculares, inyecciones de sueros fisiológicos, plasmoterapia), constituyendo un capítulo final con su aplicación en las técnicas de anestesia local dental.

*La hialuronidasa en las epidermoclisis.* — Es indudable la favorable acción de este fermento en la absorción cutánea de sustancias medicamentosas o de otra índole, administradas por esta vía.

SANNELLA <sup>111</sup> fué el primero que observó que las sustancias cristaloides (suero fisiológico, suero Ringer, etc.) administradas junto con este enzima se absorbían con mucha mayor rapidez.

HECHTER y col. <sup>59</sup>, SCHWARTZMANN y col. <sup>114</sup>, GAISFORD <sup>48</sup>, DURAN REYNALS <sup>40</sup> y HENDERSON y colaboradores <sup>63</sup> han llevado a cabo numerosos trabajos para comprobar esta acción y del estudio de ellos puede deducirse que la adición de 250 unidades viscosimétricas, a cada 500 c.c. de suero fisiológico, logra acelerar más de cuatro veces la absorción del líquido infundido, respecto a lo que tarda cuando se inyecta sin el fermento.

MEYER puso de manifiesto que la administración hipodérmica de suero glucosado con hialuronidasa, iba seguida de niveles de glucemia tan altos y rápidos, como los que se obtienen al inyectarlo por vía venosa.

Pero además BANKS y col. <sup>6</sup> inyectando al perro, por vía subcutá-

nea y asociadas a la hialuronidasa, soluciones coloidales (sueros anti-tóxicos, plasma homólogo, etc.) cuyas proteínas estaban marcadas con isótopos radioactivos, demostraron que el fermento aumentaba de dos a tres veces la velocidad de absorción.

Nosotros hemos realizado 25 inyecciones subcutáneas de 200 c.c. de plasma humano, añadiéndole 200 unidades viscosimétricas de hialuronidasa y hemos comprobado que en efecto, el relieve y tumefacción local en el lugar de la inyección, desaparece tres o cuatro veces antes que cuando se inyecta el plasma sin este fermento.

En cirugía y en pediatría sobre todo, estos descubrimientos han sido de importancia extraordinaria. La hialuronidasa es el remedio de elección cuando se hayan de infundir grandes cantidades de líquido y la vía venosa no se pueda utilizar por circunstancias de diversa índole. Con ella se disminuyen las hinchazones, infiltrados y tumefacciones que en el tejido celular subcutáneo o muscular se originan en las hipodermoclasias habituales y su secuela de sensaciones de tensión, dolor y malestar general.

La administración subcutánea se puede hacer siguiendo tres métodos.

1.º Mezclada en la jeringuilla con el líquido a inyectar; es el método de elección en anestésias locales por infiltración, tronculares, re-

solución de hematomas, tratamiento de cicatrices recientes, etc.

2.º Inyectándola sola en la región elegida y a los diez minutos después el líquido en cuestión. Esta técnica se utiliza cuando el volumen del líquido es menor de 500 c.c. o cuando el pH del mismo no está comprendido entre 4 y 7.

3.º Se coloca el irrigador o ampollas con el líquido a una altura entre 50 y 70 centímetros de la región y después de introducir la aguja en la hipodermis y antes de comenzar a pasar el líquido, se inyecta la hialuronidasa en el tubo de goma del irrigador a 3 centímetros por detrás de la aguja; así es arrastrada con los primeros centímetros cúbicos que pasen del líquido del irrigador.

Como la absorción de suero fisiológico o del glucosado isotónico está aumentada en velocidad de cinco a diez veces de lo normal, se puede decir que la inyección subcutánea de estos sueros con hialuronidasa es equivalente en velocidad a la inyección endovenosa gota a gota, a la que sustituye siempre que sea necesario.

Como la acción de la hialuronidasa dura en el tejido 12 horas, si antes de ese tiempo se quiere repetir la inyección del suero en la misma región, puede efectuarse sin necesidad de añadirle este fermento.

Según DELAUNAY y VOISIN<sup>34</sup> y<sup>35</sup>, la adición de este fermento al

siero o antitoxina antidiftérica, administrado por vía subcutánea, elevaría en dos a cinco horas la concentración de anticuerpos específicos (antitoxinas) en la sangre.

*La hialuronidasa en la plasmoterapia.* — La adición de este fermento al plasma aumenta dos o tres veces la velocidad de absorción de éste; para ello es preciso que el plasma se inyecte diluido con un volumen igual de suero fisiológico y la dosis de hialuronidasa será doble de la empleada para los sueros salinos; es decir, añadiremos de 250 a 1.000 unidades viscosimétricas para un volumen de 1 a 2 litros de la mezcla plasma-siero fisiológico. Son muchos los trabajos realizados para estudiar la utilidad de este fermento en plasmoterapia siendo los principales los de GAISFORD y EVANS <sup>47</sup>, GRANT <sup>53</sup> y SCHWARTZMANN y colaboradores <sup>114</sup> y <sup>115</sup>.

De ellos se deduce que las proteínas plasmáticas se absorben a velocidad tres veces mayor que si se inyectan sin el fermento.

Para comprobarlo hemos efectuado 25 inyecciones de 200 c.c. de plasma humano, mezclados con 200 c.c. de suero fisiológico, añadiéndole 500 unidades viscosimétricas del fermento, comprobando que en estas condiciones el plasma se absorbe a la misma velocidad que si se tratara de suero fisiológico sólo.

*Utilidad de la hialuronidasa en Cirugía.* — La hipodermoclisis me-

dante la hialuronidasa, tiene múltiples aplicaciones en el campo de la cirugía.

Gracias a ella se resuelve el problema de la rehidratación rápida de pacientes en el pre y postoperatorio, cuando por alguna circunstancia no es utilizable el gota a gota por vía venosa.

Después de las grandes intervenciones, así como tras extensas quemaduras, es a veces decisivo la introducción de un líquido suplente del suero; pero a veces los enfermos por hallarse en estado de shock profundo, tienen las venas colapsadas y no es posible o muy difícil la punción venosa.

En los traumatismos de las grandes catástrofes (bombardeos, desastres ferroviarios, guerra atómica, etcétera) facilita la urgente administración de sueros a pesar de que no exista el material y personal adecuado para prodigar el gota a gota intravenoso.

En pacientes agitados, intranquilos, etc. permite la rehidratación al no precisar la fijación e inmovilización del brazo. En estos casos la utilidad de la terapéutica con el fermento es de indudable valor y así lo ha comprobado PETRUCCI <sup>97</sup> en la rehidratación de enfermos gastrectomizados.

*Esguinces.* — Se utiliza el fermento mezclado con la novocaína, para efectuar una infiltración que irá seguida de la colocación de un vendaje elástico.

Los resultados son buenos, pues favorece la desaparición del edema y hematoma que pueden existir. KIRBY y col. <sup>72</sup>; KENDALL.

*Fracturas.* — En la reducción de ellas presta este fermento una utilidad manifiesta; inyectada con el anestésico produce tres efectos: reabsorción del edema y del hematoma, disminución del dolor y disminución de la tumefacción.

Todo ello permite una buena reducción pero además evita la tumefacción y el edema posterior *bajo el vendaje de yeso*, como demuestran los trabajos de GARTLAND y MC. AUSLAND <sup>50</sup>. Además ROVATTI <sup>109</sup> ha comprobado experimentalmente que la hialuronidasa no altera la evolución del callo de fractura.

*Hematomas traumáticos.* — La casual observación de TUCHMANN y MOOLTEN <sup>125</sup> de la reabsorción de un hematoma por heparina con hialuronidasa, hizo que se comenzara a usar este fermento con resultado brillante para conseguir la rápida absorción de los hematomas traumáticos.

Repetimos que en estos casos la dosis del fermento (diluído en suero fisiológico) debe ser doble o triple que en las epidermoclisis, pues de otra forma la acción antihialuronidásica que existe en la sangre extravasada, neutralizaría el efecto del fermento. Así se expresan BRITTON y HABIF <sup>17</sup>, BOSCHI, BECK

y GREWE <sup>8</sup>, DI MARTINO <sup>81</sup>, PERUZZO y STRINGA <sup>96</sup>.

*Parafimosis.* — En el tratamiento de esta complicación se consiguen con la hialuronidasa éxitos que no dudamos en calificar de espectaculares. Se sigue la técnica preconizada por RATLIFF <sup>104</sup> y WILLIAMS y BAZERLEY, <sup>130</sup> diluyendo 250-500 unidades viscosimétricas en 2 c.c. de suero fisiológico y se inyectan en el glande edematoso en dos puntos opuestos. Entre los doce y veinte minutos de la aplicación desaparece el edema y la recuperación es total, sin precisar intervención quirúrgica.

*Cirugía plástica.* — La región en que se ha de realizar el injerto puede ser anestesiada por infiltración con novocaína-adrenalina-hialuronidasa, con lo cual se evitan posibles edemas o hematomas postoperatorios sobre todo si después de efectuado el injerto se aplica un apósito comprensivo.

CAMERON <sup>26</sup> utiliza la mezcla hialuronidasa - novocaína - adrenalina en anestesia local para la obtención de injertos cutáneos, consiguiendo además de la rápida difusión del anestésico dejar la superficie cutánea lisa y plana, pudiendo así ser cortada con el dermatom con igual <sup>46</sup> facilidad que cuando la piel se halla sin infiltrar por usarse anestesia general.

*Tratamiento de queloides.* — BRAUN - FALCO <sup>16</sup> utilizó este fermento como tratamiento único de

queloides. Sin embargo, CORN- BLEET <sup>31</sup> y la mayoría de los autores que la utilizan con este fin, reconocen que su mayor utilidad se obtiene cuando se utiliza combinada con la exéresis quirúrgica y la radioterapia; con este tratamiento mixto se evitan las recidivas.

CORNBLEET <sup>31</sup> utiliza la inyección "loco dolenti" de 250 u. v. de este fermento con 1 c.c. de solución de novocaína al 2 %; se repite cada siete días hasta poner de seis a doce inyecciones para preparar el queloides para su extirpación quirúrgica. Después aconseja radioterapia a la dosis de 900 r. repartidas en dosis máxima semanal de 90 r.

En otro lote de enfermos usó la hialuronidasa y la radioterapia sin exéresis y obtuvo siempre buenos resultados.

Es frecuente que tras la exéresis, recidiven. Pero cuando aquélla era precedida de inyecciones locales del fermento no había recidiva; al menos así ocurrió en los veintiséis pacientes cuya historia detalla este autor.

*Hialuronidasa en traumatología deportiva. Roturas fibrilares musculares.* — Estas roturas son muy frecuentes en la práctica de los más diversos deportes y en general siempre que el individuo efectúa esfuerzos musculares *bruscos y violentos* estando previamente el músculo en estado de reposo; por ser insuficiente en esas circunstancias el aporte de sangre, surge la

anoxia muscular relativa, que predispone a la rotura.

La sintomatología es típica; durante una carrera, un esfuerzo, un salto, siente de repente un intenso latigazo que lo inmoviliza o hace caer al suelo; luego se calma el dolor para reproducirse con la misma intensidad al menor esfuerzo. Se creyó buena medida terapéutica inyectar novocaína (infiltración), pero como dice NAVÉS JANER <sup>90</sup> ello es un error, pues al suprimir el dolor se hacen nuevos esfuerzos, que transforman la leve rotura en fuerte desgarro.

En cambio el reposo, calor y onda corta dan buen resultado, pero además de no evitar la recidiva exige un mínimo de treinta días de reposo.

Según LÓPEZ QUILES <sup>78</sup> la causa de las recidivas radica en que la cicatriz muscular es dura, inelástica y como tal no puede adaptarse ni resistir los continuos esfuerzos de tracción a que está sometido el músculo y por ello comenzó a utilizar la hialuronidasa en el tratamiento de la rotura muscular con magníficos resultados, bien sea porque como supone GIGLIO inhiba la producción de fibrina o porque aumente la permeabilidad del tejido conjuntivo y favorezca la autólisis de la fibrina.

La técnica que preconiza dicho autor consiste en inyectar 10 unidades Schering disueltas en 5 a 10 c.c. de solución de novocaína al 1 por 100 sin adrenalina, en el pun-



to máximo de dolor a la presión digital, en la masa muscular lesionada. Se repite en días alternos y bastan de 4 a 6 inyecciones. Durante los 15 días siguientes el enfermo no hará ejercicio, pero no es preciso el reposo absoluto. Al final de este tratamiento se hará entrenamiento progresivo y pasada la primera semana el enfermo está totalmente recuperado.

**La hialuronidasa en distintas especialidades**

*En oftalmología.* — Se ha empleado por ATKINSON<sup>4</sup>, ANASTASI<sup>3</sup>, VENCO<sup>126</sup> y KEY y KEY<sup>70</sup> con éxito en anestesia en cirugía ocular para favorecer la difusión, aumentar el área de anestesia y la hipotonía muscular, con lo que se evita el edema y se mantiene como consecuencia las relaciones anatómicas de la región.

He aquí la solución preconizada por ATKINSON:

Clorhidrato de adrenalina al milésimo . . .	1 gota.
Sulfato potásico . . .	0'25 gr.
Hialuronidasa . . .	100 U. V.
Novocaína al 2 por 100 c. s. para . . .	5 c.c.

LEBENSOHN<sup>74</sup> refiere mejoría en glaucomas a los quince minutos de la aplicación de la mezcla de hialuronidasa.

ANASTASI<sup>3</sup> emplea dicha mezcla en inyecciones retrociliares para

anestesiarse el ganglio ciliar y conseguir la hipotonía conveniente para la iridectomía antiglaucomatosa.

TASSMANN<sup>122</sup> considera que la hipotonía del globo ocular provocada por la inyección retrobulbar de la mezcla hialuronidasa-novocaína practicada cinco minutos antes de incidir la córnea, es muy favorable para extraer el cristalino en la operación de la catarata.

También se ha empleado con éxito por CARRIKER<sup>27</sup> en el tratamiento de iritis, úlceras corneales y sinequias posteriores.

*En urología.* — La casual observación de BUTT<sup>20</sup> de que en enfermos febriles se les aclaraba la orina turbia al rehidratarlos por hipodermoclisis con hialuronidasa, condujo al estudio de la utilidad de este fermento en la profilaxis y tratamiento de la litiasis renal. Llegaron a la conclusión de que al inyectar la hialuronidasa por vía subcutánea, los productos resultantes de la desintegración del ácido hialurónico se eliminan por la orina, donde realizan el papel de coloides protectores que impiden la precipitación de sales productoras de cálculos.

BUTT y col.<sup>21, 22</sup> dieron la técnica de este método capaz de prevenir la litiasis renal, aún en sujetos predisuestos. Consiste en inyectar de manera indefinida 500 unidades viscosimétricas por vía subcutánea diariamente o cada dos días. Sus buenos resultados han sido confirmados por JOOS y LEFEVRE<sup>69</sup> y

MINARELLI <sup>87</sup> pero tropieza, como es natural, con el inconveniente de su carestía y su incomodidad y con algunas objeciones como las formuladas por PRIEN <sup>101</sup> y TAYLOR y colaboradores <sup>123</sup>.

Otra aplicación muy práctica y de grandes resultados es la pielografía descendente en niños o personas de venas difíciles y substituye la inyección intravenosa del medio de contraste. La técnica estriba en inyectar por vía subcutánea la solución de contraste diluida mezclada con el fermento, o bien se inyecta primero la hialuronidasa sola y, a los diez minutos y en la misma región, se inyecta el medio de contraste. Así se consigue una rápida visualización de las vías renales lo que permite obtener magníficas pielografías descendentes.

Los buenos resultados que señalaron primero BURKET y GYORGY <sup>19</sup> han sido comprobados por OLSSON y LÖFGREN <sup>91</sup>, AMATO <sup>2</sup>, SPOTO <sup>120</sup>, CALABI y GORINI <sup>25</sup>, BONETTA <sup>12</sup>, SALVATI <sup>110</sup> y BYRNE y col. <sup>23</sup>.

*En Obstetricia y Ginecología.* — Son abundantísimos los trabajos que hasta el presente registra la literatura médica sobre el uso de este fermento en dicha especialidad. Así tenemos los trabajos de AGUIRRE <sup>1</sup> en España, GAGLIARDI y FRANCO <sup>46</sup>, FUMAROLA <sup>45</sup>, MASSANO y MONTICELLI <sup>83</sup>, HEINS <sup>61</sup>, <sup>62</sup>, GRIFIN y GOLGOWSKI <sup>54</sup>, HILLARD y GRASSIE <sup>65</sup>, BAUM <sup>7</sup> y DOUGLAS y VOWBURGH <sup>38</sup> que lo utilizan asociado a la novocaína en el bloqueo

del pudendo, bastando introducir la mezcla en sus proximidades para obtener la anestesia.

PELLIZARI ha utilizado este fermento en el tratamiento de la toxicosis gravídica <sup>94</sup> y en la conducción del parto en casos de espasticidad del cuello <sup>95</sup>, HERMANN <sup>64</sup> y, entre nosotros, BIEL y NUBIOLA <sup>11</sup> infiltran el cuello con mezcla de hialuronidasa y anestesia local.

BOSCARO <sup>14</sup>, COLUCCI y FRANCO <sup>30</sup>, DIGGONNET y col. <sup>36</sup> y SAVI <sup>113</sup> han utilizado con éxito la mezcla de hialuronidasa con la hormona occitócica hipofisaria diluida en suero glucosado en el tratamiento de la inercia uterina, durante el período de dilatación o expulsión, consiguiendo acortamiento de la duración del parto sin producir contracciones espásticas ni sufrimiento fetal. KIMBELL <sup>71</sup> y LABRUM <sup>73</sup> la administran junto con dihidroergotamina como prevención de las hemorragias del alumbramiento.

ROLLEY DU COUDRAY <sup>107</sup> fuerza la permeabilidad de las trompas de Falopio mediante solución de penicilina y estreptomocina a la que ha añadido hialuronidasa.

GIALDRONI y MIRAGLIA <sup>51</sup> recomiendan en las infecciones genitales femeninas la aplicación local de tapones vaginales empapados en 15 c.c. de suero fisiológico que contenga penicilina asociados a la inyección parenteral (vía subcutánea) de 2 ó 3 dosis de 750 unidades viscosimétricas de hialuronidasa.

BALTON<sup>5</sup>, LEONE<sup>76</sup>, DE VITA<sup>127</sup> y GAGLIARDI y FRANCO<sup>46</sup> usan la hialuronidasa para llevar a cabo infiltraciones locales en las anexitis con mezclas de penicilina y estreptomocina.

RIMBACH y GRIEFHAHN<sup>106</sup>, CEPEDA y RODRIGUEZ<sup>28</sup>, BERLINGIERI<sup>10</sup> y MINK y LANG<sup>89</sup> han empleado con éxito la hialuronidasa para evitar la producción de desgarros de periné durante el parto, inyectándola disuelta en novocaína al 1 por % en el tejido celular subcutáneo a nivel de la comisura posterior.

*En otorrinolaringología.*—HEINBERG<sup>60</sup> fué el primero en utilizar este fermento asociado a los antibióticos y novocaína en anestesia en amigdalectomías si hay abscesos y sin antibióticos cuando no hay complicación infecciosa.

SOM y col.<sup>137</sup> usaron también con buenos resultados este enzima asociado a los antibióticos para aumentar la difusión de éstos en el tratamiento de distintos tipos de sinusitis e infecciones nasales, de modo que en varios casos en que había fracasado la punción seguida de lavado e inyección intrasinusal de penicilina, se obtuvo la curación instilando en el seno cada 3 ó 4 días una mezcla de 40.000 unidades de penicilina con 250 unidades viscosimétricas del fermento. De ordinario basta con 4 ó 5 instilaciones.

### **Investigaciones sobre la utilización de la hialuronidasa en las diferentes técnicas de anestesia dental**

#### *Antecedentes*

Ya en el año 1939 SORCE<sup>118</sup>, GIANNANTONI<sup>52</sup> y REGOLI<sup>105</sup> observaron que la inyección subcutánea de anestésicos mezclados con hialuronidasa conseguía una mayor extensión de la zona anestesiada. Posteriormente, han sido especialmente los oftalmólogos los que utilizaron con más éxito este fermento en las técnicas de anestesia.

En Cirugía bucal BENZER en 1951<sup>9</sup> expuso los resultados que obtuvo en el tratamiento con hialuronidasa en los casos de inflamación y edema postoperatorio en cirugía bucal. Diez casos de edema postoperatorio trató con este fermento y, de ellos, siete respondieron totalmente y tres no sufrieron alivio ni empeoramiento. En este trabajo preliminar de BENZER se cita también un enfermo al que por error se le inyectó anestésico en el suelo de la boca por lo que en dicha zona apareció a las 24 horas una dureza muy sensible y del tamaño de una nuez. La inyección de 1 c.c. de suero fisiológico con hialuronidasa en el centro de dicha tumoración intrabucal, produjo a los 30 minutos una mejoría notable con disminución del volumen y desaparición del dolor, estando a las 24 horas casi normal la zona. A parecidas conclusiones llegan

CADENAT y VINCENT <sup>24</sup> y TORRIELLI <sup>124</sup>. ROSENTHAL en el Congreso de Cirugía de Munich de 1952 detalló experiencias clínicas llevadas a cabo por él, adicionando hialuronidasa a los anestésicos locales en pequeñas y grandes intervenciones en el territorio de cara y cuello, resaltando que tanto en la anestesia por infiltración como en las de conducción, la difusión conseguida es tan rápida que la intervención se puede comenzar inmediatamente de terminada la infiltración, criterio que como veremos y según nuestras investigaciones confirmamos categóricamente. Según él, otras de las ventajas de dicha asociación serían una mayor rapidez en la entrada del anestésico, más rápida difusión intratisular, más pronta desaparición del edema postoperatorio.

Finalmente, en la anestesia por conducción bastaría con llegar a las proximidades del nervio para que la anestesia tenga lugar (BONFANTI <sup>13</sup>, TANZ y col. <sup>121</sup> y WILD <sup>129</sup>).

LOOBY y KIRBY <sup>77</sup> emplearon la hialuronidasa en anestias por infiltración o conducción y comprobaron para intervenciones odontológicas una mayor profundidad y extensión de la anestesia.

Esto es todo cuanto hemos podido recoger en la bibliografía consultada, es decir, nada en la bibliografía nacional y muy poco en la extranjera (por lo que se refiere exclusivamente a las aplicaciones del fermento en las técnicas de anestesia dental). Por ello consideramos que el estudio e investigaciones sobre la utilización de la hialuronidasa en este tipo de anestias, podría ser considerado un tema de suficiente interés en nuestra profesión, y como tal nos propusimos que constituyera uno de los tres capítulos en que dividimos nuestra tesis doctoral.

Dividimos nuestras investigaciones en dos partes. La primera se consagró al estudio de la utilidad del fermento en la anestesia dental por infiltración y la segunda en la anestesia por conducción.

#### BIBLIOGRAFIA

1. AGUIRRE, G. — *Med. Clin.*, 12, 178, 1954.
2. AMATO, A. — *Gior. Med. milit.*, 101, 416, 1951.
3. ANASTASI, G. — *Arch. Ottalm.*, 57, 465, 1953.
4. ATKINSON, W. S. — *Arch. Ophth.*, 42, 628, 1949.
5. BALTON, A. — *Presse Méd.*, 63, 1651, 1955.
6. BANKS, H., SELIGMAN, T., FINE, J. — *J. Clin. Investig.*, 12, 548, 1949.
7. BAUM, F. E. — *Am. J. Obst.-Gynec.*, 60, 1356, 1950.
8. BECK, E., GREWE, H. E. — *Zbl. Chir.*, 76, 1095, 1951.
9. BENZER, P. — *Oral Surg., Oral Med., Oral Path.*, 5, 1315, 1952.
10. BERLINGIERI, D. — *Attual. Ostet. & Ginec.*, 2, 327, 1956.

11. BIEL, J. M., NUBIOLA, J. — *Med. Clin.*, **23**, 416, 1954.
12. BONETTA, C. — *Ann. Radiol. Diagn.*, **26**, 223, 1953.
13. BONFANTI, N. — *Ann. Ravasini*, **39**, 10, 1956.
14. BOSCARO, M. — *Min. Ginec.*, **3**, 13, 1951.
15. BOYLAND, E., MC. CLEAN, D. — *J. Path. & Bact.*, **41**, 560, 1935.
16. BRAUN-FALCO, O., WEBER, G. — *Derm. Wschr.*, **125**, 465, 1952.
17. BRITTON, R. C., HABIF, D. V. — *Surgery*, **33**, 917, 1953.
18. BUNTING, H. — *Ann. New York Acad.*, **52**, 977, 1950.
19. BURKET, L., GYORGY, P. — *Pediatrics*, **3**, 56, 1949.
20. BUTT, A. J. — *J. Florida M. Ass.*, **37**, 711, 1951.
21. BUTT, A. J., HAUSER, E. A., SEIFTER, J. — *J.A.M.A.*, **150**, 1096, 1952.
22. BUTT, A. J., HAUSER, E. A., TRAINA, V. — *Presse Med.*, **60**, 106, 1952.
23. BYRNE, J. y COL. — *Urol. & Cutan. Rev.*, **55**, 193, 1951.
24. CADENAT, H., VINCENT, P. — *Presse Med.*, **64**, 709, 1956.
25. CALABI, V., GORINI, S. — *Chir.*, **5**, 301, 1950.
26. CAMERON, J. A. — *J.A.M.A.*, **147**, 197, 1951.
27. CARRIKER, F. R. — *Am. J. Ophth.*, **35**, 1765, 1952.
28. CEPEDA, M., RODRÍGUEZ, D. — *Toko-Ginec. Pract.*, **13**, 210, 1954.
29. COHEN, P. — *New York State J. Med.*, **51**, 222, 1951.
30. COLUCCI, G., FRANCO, G. — *Riv. Ost. Ginec. prat.*, **36**, 148, 1954.
31. CORNBLEET, T. — *J.A.M.A.*, **154**, 1161, 1954.
32. CORPER, J., COHN, M. L. — *Amer. Rev. Tub.*, **63**, 108, 1951.
33. CHAIN, E., DUTHIE, S. — *Nature*, **144**, 977, 1939.
34. DELAUNAY, A., VOISIN, G. — *Presse Méd.*, **58**, 20, 1950.
35. DELAUNAY, A., VOISIN, G. — *Presse Méd.*, **58**, 79, 1950.
36. DIGONNET, L., CAHN, J., ROY, J. — *Presse Méd.*, **60**, 1191, 1952.
37. DIGONNET, L., CAHN, J., ROY, J., BOUCET, J. — *Thérapie*, **7**, 388, 1952.
38. DOUGLAS, G. W., VOWBURGH, L. F. — *Am. J. Obst. Gynec.*, **62**, 1253, 1951.
39. DURAN-REYNALS, F. — *C. R. Soc. Biol.*, **99**, 6, 1928.
40. DURAN-REYNALS, F. — *Science*, **83**, 286, 1936.
41. DUX, C., GUÉRIN, M., LACOUR, F. — *Bull. Assoc. Franç. Etude Cáncer*, **35**, 427, 1948.
42. ELSTER, S. K., FREEMAN, M. E., DORFMAN, A. — *Am. J. Physiol.*, **56**, 429, 1949.
43. ENDE, M. — *J.A.M.A.*, **147**, 348, 1951.
44. FAVILLI, G. — *Fenomeni di diffusione nei tessuti nel loro aspetto fisiologico e patologico*. Ed. ITER, Turin 1941.
45. FUMAROLA, A. — *Clin. Ost. Ginec.*, **56**, 41, 1954.
46. GAGLIARDI, F., FRANCO, G. — *Riv. Ostet. Gin. Prat.*, **37**, 522, 1955.
47. GAISFORD, W., EVANS, D. G. — *Lancet*, **II**, 505, 1949.
48. GAISFORD, W. — *Lancet*, **II**, 505, 1949.
49. GAMNA, L. — *Comunicación Congreso Médico de Turin*, 1951.
50. GARTLAND, J. J., MC. AUSLAND, W. R. — *Arch. Surg.*, **68**, 305, 1954.
51. GIALDRONI, G., MIRAGLIA, F. — *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **27**, 1207, 1951.
52. GIANNANTONI, C. — *Lettura Oftalmol.*, **15**, 295, 1939.
53. GRANT, I. C. — *Virginia Med.*, **76**, 182, 1949.
54. GRIFFIN, E. L., GOLKOWSKI, W. V. — *Georg. Med. Ass. J.*, **41**, 54, 1952.
55. GUERRA, F. — *J. Pharm. a. exp. Therap.*, **87**, 193, 1946.
56. HAKANSON, E. Y., GLICK, D. — *J. Nat. Cáncer Inst.*, **9**, 129, 1948.
57. HARRIS, T. N., FRIEDMAN, S. — *Amer. J. of Dis. Children*, **77**, 561, 1949.
58. HARRIS, T. N., HARRIS, S. — *Amer. J. of Med. Sciences*, **217**, 174, 1949.
59. HECHTER, O., DOPKEEN, S. K., YU-DELL, M. H. — *J. Ped.*, **30**, 645, 1947.
60. HEINBERG, G. H. — *Eye, Ear, Nose & Throat Monthly*, **30**, 31, 1951.
61. HEINS, H. C. — *South Carolina Med. Ass. J.*, **46**, 309, 1950.
62. HEINS, H. C. — *Am. J. Obst. Gynec.*, **62**, 658, 1951.
63. HENDERSON, A. T., WALLACE, S., FAN-

- CETT, R. — U. S. Naval Med. Bull. 48, 865, 1948.
64. HERMANN, U. — Gynäcologia, 139, 223, 1955.
65. HILLARD, B. M., GRASSIE, E. D. — J. Obst. Gyn. Brit. Empir., 62, 6, 1955.
66. HIRST, G. K. — Jour. Exper. Med., 73, 493, 1941.
67. JAWORSKI, A. A., FARLEY, J. E. — Am. J. Dis. Child., 79, 59, 1950.
68. JOEL, C. A., EICHENBERGER, E. — Schweiz. Med. Wchsr., 27, 601, 1945.
69. JOOS, F., LEFEVRE, PH. — Rev. Med. Louvain, 10, 153, 1953.
70. KEY JR. S., KEY, S. — J.A.M.A., 143, 206, 1950.
71. KIMBELL, N. — Brit. Med. J. II, 130, 1954.
72. KIRBY, K. C., ECKENHOFF, J. E., LOOBY, J. P. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 52, 1166, 1950.
73. LABRUM, A. H. — Lancet, II, 522, 1955.
74. LEBENSOHN, J. E. — Am. J. Ophth., 33, 865, 1950.
75. LELLI, G., MAROTTA, U. — Stetoscopio, 1, 369, 1951.
76. LEONE, U. — Ann. Ost. Ginec., 77, 485, 1955.
77. LOOBY, J. P., KIRBY, C. K. — I. Am. Dent. Ass., 43, 555, 1951.
78. LÓPEZ QUILES, J. — Bol. Inst. Pat. Med., 11, 126, 1956.
79. LORENZO VELÁZQUEZ, B. — Terapéutica con sus fundamentos de Farmacología experimental. 6.ª edición 1953.
80. MAHAUX, J., STIENLET, R. — Ann. Endocrinol., 12, 1104, 1951.
81. DI MARTINO, M. — La Nuova Veter., 28, 197, 1952.
82. MASCHAS, H. — Presse Med., 59, 1332, 1951.
83. MASSANO, A., MONTICELLI, S. — Min. Ginec., 6, 641, 1954.
84. MASSONS, J. M. — Introducción al estudio de la Enzimoterapia. Paz Montalvo. Madrid. 1957, pág. 95.
85. MEYER, K. — Physiol. Rev., 27, 335, 1947.
86. MEYER, K., PALMER, J. W. — J. Biol. Chem., 114, 689, 1936.
87. MINARELLI, A. — Min. Med., 47, 346, 1956.
88. MINK, E. — Geburtsh. u. Frauenheilk., 15, 246, 1955.
89. MINK, E., LANG, W. — Dtsch. Med. Wschr., 77, 1328, 1952.
90. NAVÉS JANER, J. — Medicina del deporte, Salvat, Barcelona, 1952.
91. OLSSON, O., LÖFGREN, O. — Acta Radiol., 31, 256, 1949.
92. PELLIZARI, C. — Comunicación al Congreso de Obstetricia y Ginecología de la Italia Septentrional, 9 de septiembre de 1950.
93. PELLIZARI, C. — Riv. Ost. Gin. Pratica, 34, 359, 1952.
94. PELLIZARI, C. — Riv. It. Ginecol., 36, 85, 1953.
95. PELLIZARI, C. — Riv. It. Ginecol., 36, 105, 1953.
96. PERUZZO, L., STRINGA, U. — Giorn. It. Chir., 9, 42, 1953.
97. PETRUCCI, D. — Arch. ed. Atti Soc. It. Chir., 51.º Congreso Roma, octubre-noviembre 1949.
98. PICHLER, H., TRAUNER, R. — Cirug. bucal y de los maxilares, Labor, 1952.
99. PIEDROLA, G., GARCÍA RODRÍGUEZ, V. Manual Práctico de Laboratorio, Marban, Sevilla, 1955.
100. PRETE, A., PALOMBA, R. — Riv. Med., 65, 407, 1951.
101. PRIEN, E. L. — J.A.M.A., 154, 744, 1954.
102. RAMOS, R. — Monog. breves de Terapéutica, DROVYSSA n.º 5, 1953.
103. RAMOS, R., OPPENHEIMER, W. — Rev. Esp. Pediat., 2, 162, 1946.
104. RATLIFF, R. K. — J.A.M.A., 155, 746, 1954.
105. REGOLI, A. — Rass. It. Oftalmol., 9, 433, 1939.
106. RIMBACH, E., GRIEFAHN, S. — Zbl. f. Gynäk., 77, 546, 1955.
107. ROLLEY DU COUDRAY, M. — Presse Med., 63, 542, 1955.
108. ROTHARD, S. — J. Exper. Med., 88, 325, 1948.
109. ROVATI, L. — Farmaco (ed. prat.), 10, 680, 1955.
110. SALVATI, R. — Ann. Radiol. Diagn., 26, 153, 1953.
111. SANNELLA, L. — Yale J. Biol. Med., 12, 433, 1940.
112. SANTOS RUIZ, A. — Fermentos, Madrid, 1944.

113. SAVI, C. — *Min. Ginec.*, 7, 622, 1955.
114. SCHWARTZMAN, J.; HENDERSON, A., KING, W. — *J. Pediatr.*, 33, 267, 1948.
115. SCHWARTZMAN, J., LEVBARG, M. — *J. Pediat.*, 36, 78, 1950.
116. SOLDI, A. — *Farmaco*, 6, 765, 1951.
117. SOM, M., SCHNEIERSON, S., SUSSMAN, M. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 70, 96, 1949.
118. SORCE, G. — *Lo Sperim.*, 93, 558, 1939.
119. SORIANO, M. y col. — *Sintesis Médica*, 9, 607, 1955.
120. SPOTO, P. — *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.*, 27, 1238, 1951.
121. TANZ, B y col. — *J. Am. Dent. Ass.*, 43, 555, 1951.
122. TASSMAN, I. S. — *Am. J. Ophth.*, 35, 683, 1952.
123. TAYLOR, J. R., ALCOCK, A. J. W., HILDES, J. A. — *Am. J. M. Sci.*, 230, 536, 1955.
124. TORRIELLI, F. — *Clin. Odont.*, 9, 330, 1954.
125. TUCHMAN, M. S., MOOLTEN, S. E. — *Am. J. Med. Sci.*, 219, 147, 1950.
126. VENCO, L. — *Rass. Ital. Oftalmol.*, 19, 317, 1950.
127. De VITA, E., GAGLIARDI, V. — *Boll. Acc. Med. Pistoiese «F. Pacini»*, 25, 195, 1954.
128. WALLENFELS, K. — *Angew. Chem.*, 63, 218, 1951.
129. WILD, H. — *Odontologisk Revy*, 5, 262, 1954.
130. WILLIAMS, S., BAZERLEY, P. L. — *Med. J. Australia*, 2, 690, 1950.
131. WOLGER, G. — *Comunicaciones Cientificas, Anuario Schering*, 90, 1953.