

Cátedra de Farmacología de Barcelona
(Prof. Dr. Francisco García Valdecasas)

Contribución al estudio farmacológico de la fluoresceína

JOSÉ ANTONIO SÁLVA

Introducción

La fluoresceína hasta fecha reciente sólo se empleaba en medicina con finalidad diagnóstica. En 1941 MAY la propuso como el tratamiento de elección de las perniosis y acrocianosis. La constancia y efectividad de efecto, hecho confirmado por numerosos autores y por nosotros mismos, nos colocó ante el interrogante de cuál sería su mecanismo de acción. Al consultar la bibliografía mundial asequible, directa o indirectamente, nos dimos cuenta de la parvedad de su estudio farmacológico. En concreto sólo se dan datos de toxicidad, absorción, eliminación y distribución en el organismo. Los colorantes que derivan de ella se estudian, en cambio, mucho más.

La fluoresceína tiene una indicación principal, el eritema pernio o sabañón y algunos otros procesos semejantes como la acrocianosis. Dejando aparte cuestiones etiopatogénicas, que no es de nuestra incumbencia desarrollar, el substrato patológico de estas lesiones es un estado deficiente de aporte sanguíneo debido a la constricción de las arteriolas. Esto conduce a fenómenos asfícticos de los tejidos, con acúmulo de catabolitos que producen la dilatación de los capilares y el aumento de su permeabilidad; como consecuencia se forma edema y alteraciones tróficas de las zonas afectadas.

Antes de introducirse la fluoresceína en la terapéutica de estas afecciones, el tratamiento más eficaz de las mismas eran los vasodilatadores acetilcolínicos (acetilcolina, acetil metilcolina, carbaminoicolina, etc.), los extractos de tejidos vaso-dilatadores, complementados con calcio para combatir la extravasación, el ácido nicotínico como vasodilatador, etc. La fluoresceína se muestra superior a todos ellos porque su acción es más duradera, inocua, segura y por

tener igual actividad por vía oral que en inyección endovenosa. Numerosa bibliografía clínica da cuenta de los resultados obtenidos.

Se han dado varias interpretaciones al mecanismo de acción de la fluoresceína, pero sin base experimental que las avale. MAY sostenía la teoría de la fotosensibilización como responsable de la actividad terapéutica. Otros impugnan esta posición, por ejemplo, LEFÈVRE y colaboradores, atribuyendo a la fluoresceína una acción vasodilatadora fundándose en la observación del oculista BAILLIERT de que la sustancia estudiada dilataba los pequeños vasos del ojo.

Nosotros hemos creído de interés, estudiar la farmacología de la fluoresceína, contribuyendo así a completar las nociones que hoy día poseemos. En nuestro trabajo llevado a cabo bajo dirección del profesor GARCÍA-VALDECASAS a quien queremos expresar aquí nuestro agradecimiento, estudiamos experimentalmente la farmacodinamia de la fluoresceína por distintos métodos experimentales. Iniciaremos nuestro trabajo resumiendo los datos que hasta el momento actual poseemos sobre dicha sustancia y sus aplicaciones, y después expondremos el trabajo personal. Insertamos como apéndice las fuentes de información bibliográfica consultadas, en relación directa con el tema.

I. — ESTUDIO QUÍMICO

La fluoresceína o resorcinaftaleína es una sustancia colorante que se obtiene fundiendo el anhídrido ftálico con la resorcina.

Se presenta en forma de polvo rojo amarillento, que se descompone por encima de 290° sin fundir; casi insoluble en el agua y en el benzol, pero soluble con fluorescencia verdosa en el alcohol. Fué preparada por vez primera por BAEYER en 1871 y debe su nombre a la fluorescencia intensa que sus soluciones poseen. Esta propiedad ha permitido emplearla en Geología para seguir el curso de corrientes subterráneas, y como medio de identificar, mediante su formación, pequeñísimas cantidades de anhídrido ftálico, de resorcina y en general de m-difenoles.

Además de la formación del sistema trifenilmetánico, al igual que la fenolfataleína; la pérdida de una segunda molécula de agua entre dos de los hidróxilos de los núcleos de la resorcina, da lugar a la formación del sistema heterocíclico xantano-dibenzopirano. Las fluoresceínas, cuyos grupos-OH están substituidos por radicales-NH₂ constituyen el importante grupo de colorantes conocidos con el nombre de rodaminas.

Tratando la fluoresceína, disuelta en alcohol, por el bromo se produce la tetrabromofluoresceína o eosina de tanta utilización en tintorería, cosmética y microscopía.

El tetrayodo derivado correspondiente, es la critrosina. Otros derivados halogenados también tienen interés, como el rosa de bengala-dicloro tetrayodofluoresceína — que se obtiene fundiendo la resorcina con anhídrido ftálico diclorado y yodando después el compuesto resultante.

Estos compuestos han sido mejor estudiados, especialmente en lo que se refiere a su eliminación por el hígado, lo que ha hecho se empleen algunos derivados yodados como medio de contraste y otros en especial el rosa de bengala como prueba funcional hepática, iniciada por DELPRAT, EPSTEIN y KERR (10), quienes suponen se elimina exclusivamente por el hígado. De la desaparición del colorante en la sangre, deducen el estado funcional de la glándula. La bibliografía sobre este tema es extensísima, y no la recogemos por considerar que queda fuera de los límites de nuestro propósito.

Tratada la fluoresceína por solución de sosa, se forma la sal sódica o uranina que por la acción de un ácido, deja de nuevo fluoresceína libre.

A. — OBTENCION DE LA FLUORESCÉINA

Puede obtenerse fácilmente en el Laboratorio mediante la técnica que describimos.

El anhídrido ftálico y la resorcina (10 y 14 grs. respectivamente) se mezclan en cápsula de 50 cm³ y la mezcla se calienta varias horas en baño de aceite de 195-200 grados, hasta que cese el desprendimiento de vapores. La masa, líquida al principio, se solidifica completamente. Se tritura y pulveriza, se hierve con 300 centímetros cúbicos de agua, se decanta el agua y el residuo seco se disuelve en sosa diluida y se neutraliza casi totalmente el exceso con sulfúrico diluido. Se pasa a un embudo separador, se añaden 100 cm³ de éter y se precipita la fluoresceína añadiendo sulfúrico diluido en porciones de 1-2 cm³, agitando cada vez para que se vaya disolviendo en el éter. Se destila el éter hasta reducir a mitad de volumen. La operación se repite hasta que no precipita más fluoresceína. Del último resto de éter, dejado evaporar espontáneamente, después de añadir un poco de alcohol, se obtiene un producto amarillo soluble en alcohol, pero si se evapora totalmente después de añadir el alcohol se obtiene una modificación roja insoluble. El rendimiento es de unos 18 gramos.

1. — *Preparación de soluciones acuosas.* — La obtención de su sal sódica, necesaria para la preparación de soluciones acuosas, se realiza de la siguiente forma. En un matraz se colocan unos gramos de fluoresceína suspendidos en agua (unos 50 c. c. por gramo) y sobre la suspensión se vierte agitando una solución normal de sosa. La fluoresceína sódica formada, va disolviéndose; dejando de añadir el álcali, cuando queda sólo un pequeño residuo de fluoresceína sin disolver. Así se asegura la ausencia de sosa libre en la solución. Entonces se filtra y el filtrado se concentra, seca y pulveriza, obteniéndose un polvo rojizo muy soluble en el agua, a partir de la cual se preparan las soluciones. Cuando se destina a inyección, la solución se efectúa en suero fisiológico.

B. — APLICACIONES QUÍMICAS

En química se emplea la fluoresceína, además de como materia prima para la fabricación de importantes colorantes, eosina y derivados, como reactivo indicador en alcalimetrías, para titular oxalatos — WELLINGS (62) — para distinguir los alcaloides de sus genalcaloides — BOUTARIC y BOUCHARD (7) — preparar patrones para fluorimetría, etc. Por su capacidad tintórea, la sal sódica se usa en Hidrología para estudiar el curso de corrientes subterráneas, pues se reconoce fluoroscópicamente aún a diluciones de 1 por 10^7 .

Como fuente de información sobre características químicas y de preparación de la fluoresceína y sus derivados, nos remitimos a las obras de KARRER (38) HENLE (30) CAIN (8) ADAMS (2) FISHER (18) y WILLIAMS (65).

II. — DATOS HISTORICOS SOBRE LAS ACCIONES FARMACOLOGICAS

La fluoresceína posee, al igual que otras sustancias fluorescentes, la propiedad de atenuar la toxicidad de algunas toxinas vegetales al ser sometidas a iluminación intensa junto con el colorante. Así lo han comprobado TAPPEINER y JOLDBAUER (60) en el caso de la ricina, crotina, etc.

La fluorescencia de las soluciones de uranina varía en intensidad cuando éstas se ponen en contacto con distintas sustancias terapéuticas y con líquidos orgánicos normales o patológicos. BOUTARIC, ACHARD y BOUCHARD (1), han estudiado el comportamiento de la fluorescencia de las soluciones del colorante en presencia de suero sanguíneo normal y patológico, suero sanguíneo de ratas con cáncer por alquitrán, alcaloides y genalcaloides, etc.

A. — ACCION BIOLOGICA SOBRE ORGANISMOS VIVOS

Los organismos vivos se afectan de diversa forma por la fluoresceína.

1. — *Bacterias*. — El uso de sustancias colorantes como antisépticos, condujo también al ensayo de la fluoresceína para este fin. No posee propiedades antisépticas apreciables, ya que soluciones al 4 % son sólo tóxicas para algunas bacterias Gram positivas. EISENBERG (13) cree debida su poca actividad, a lo difícilmente que la fluoresceína penetra en algunas clases de células, especialmente en las vegetales. Mayor actividad tienen los derivados metálicos de la fluoresceína. Entre los más importantes señalaremos el «Caviblen» de BRUCK (4) o fluoresceína argéntica, que se ha empleado contra el diplococo de Neisser; la sal zincica que WOLF (66) recomendó en infecciones oculares, y los derivados mercuriales. Estos últimos son los de mayor interés. HAHN y KOSTENBADER (26), describieron uno activo sobre la esprilosis de las galli-

nas y modernamente es de uso común el mercurocromo — sal sódica de la mercuriodibromofluoresceína — o preparado soluble 220 de YOUNG.

2. — *Infusorios*. — Presentan los infusorios menor resistencia a la fluoresceína que las bacterias. Según TAPPEINER y JOLD-BAUER (60) los paramaecios en la obscuridad toleran concentraciones del 1 por 500 al 1 por 250, mientras que sometidos a iluminación, mueren en pocas horas con una dilución del 1 por 1.000. Por el contrario REITZ (51) afirma que aun a la luz del día, la fluoresceína es poco tóxica para los paramaecios.

3. — *Vertebrados*. — Los vertebrados son aún menos sensibles. ROST (55) ha comprobado que los peces pueden vivir varios días en diluciones al 1 y 2 por 100 de la substancia colorante. Algunas especies, como el «*rodeus amarus*» tienen menos resistencia.

En las ranas resulta inocua una dosis total de 0,01 gramo. De 20 a 30 minutos después de la inyección en el saco linfático dorsal, se observa además de la coloración cutánea, fluorescencia verdosa de los ojos, que aumenta progresivamente en intensidad y se mantiene varios días. DRESER (12) ha visto que durante este tiempo el animal elimina orina fluorescente.

4. — *Cultivos de tejidos: células*. — La fluoresceína inhibe el crecimiento de las células en los cultivos de tejidos. ROFFO y CALCAGNO (53) en el Instituto experimental del cáncer, en Buenos Aires, comparando la acción de la fluoresceína y sus derivados halogenados, sobre el crecimiento de tejidos normales y neoplásicos, han observado acción inhibitoria, más intensa en los bromo y yodo derivados en orden creciente. Esta acción es más manifiesta sobre las células neoplásicas que sobre los tejidos normales.

5. — *Sangre: hematies*. — La fluoresceína no posee según ROFFO y colaboradores (52) actividad hemolítica de por sí, pero en cambio la poseen sus cloro y bromo derivados. Esta acción podría deberse a la liberación de los halógenos por acción actínica, fenómeno que comprobó MURAKAMI (48). ROFFO y CALCAGNO (52) han visto que la acción hemolítica de los derivados halogenados de la fluoresceína es de igual intensidad sobre los hematíes normales que sobre los de animales cancerosos. MENKE (44) obtiene un derivado hemolizante de la fluoresceína, la fotofluoresceína, irradiando durante 300 horas con luz solar, una solución de fluoresceína sódica, hasta que pierda la fluorescencia. Entonces precipita con clorhídrico, para redissolver después en sosa y cristalizar. Los hematíes sometidos a la acción de la fotofluoresceína se hemolizan en la obscuridad, mientras en las mismas condiciones resisten a la fluoresceína. Una solución de fotofluoresceína al 1 por 2.000 hemoliza en la obscuridad en el plazo de dos horas a 1 c. c. de suspensión de hematíes al 1 por 100.

B. — TOXICIDAD Y TOLERANCIA EN LOS VERTEBRADOS

La toxicidad de la fluoresceína es distinta según las especies.

1. — *Animales de laboratorio.* — En las ranas, según Joldbauer y BUSCH (36), la dosis mortal, es de 0,90 gramos por cada 50 gramos de rana. DRESER (12), en cambio, afirma que es inocua una dosis única de 0,01 gramo. Los animales mueren presentando un cuadro de parálisis central progresiva.

La toxicidad en los ratones blancos, según los ya citados JOLD-BAUER y BUSCH, es distinta en los animales mantenidos en la obscuridad y en los sometidos a la iluminación. La dosis mortal es en la obscuridad de 0,0006 gramos por gramo del animal. Los cobayos, según sus observaciones, fallecen con un tercio menos, o sea 0,40 gramos por kilo de peso. La muerte se produce también con un cuadro de parálisis central.

Más resistentes son los conejos que, según ROST (55) soportan dosis de 2 a 3 gramos por kilo de peso. Los perros toleran también dosis elevadas.

2. — *Especie humana.* — En la especie humana se conoce la tolerancia de la fluoresceína a través de sus aplicaciones clínicas. HAMBURGER (27-28) recomienda dosis de 5 gramos de una sola vez por vía digestiva, con finalidad diagnóstica, dando idea de la tolerancia el hecho de que se hayan llegado a dar 15 gramos sin producir trastornos. Nosotros nos permitimos sospechar como mínimo, a las dosis descritas, la aparición de alteraciones digestivas y tal vez de trastornos vasculares, posiblemente de fácil recuperación.

En conjunto se puede considerar a la fluoresceína poco tóxica, decreciendo la toxicidad a medida que se asciende en la escala zoológica. Si tenemos en cuenta que las dosis terapéuticas en la especie humana son por término medio de 10 a 20 centigramos, podemos atribuir a este fármaco una zona manejable muy amplia.

C. — VIAS DE ADMINISTRACION

La fluoresceína ingerida, atraviesa el medio ácido gástrico sin alterarse. En el intestino pasa a fluoresceína sódica absorbiéndose en esta forma. Circula, como sucede con otros colorantes, por el medio sanguíneo en combinación con las proteínas plasmáticas. La fluoresceína sódica en solución inyectada subcutáneamente, se absorbe con facilidad (49). Con mayor rapidez aún es absorbida por las serosas, especialmente por el peritoneo. También se absorbe por el epitelio traqueal (ICARD (33). La absorción por la mucosa conjuntival interesa particularmente a los oftalmólogos. KLAR (39) ha visto que mientras los perros, monos y conejos absorben las soluciones de fluoresceína sódica al 0,4 %, pasando el colorante a la cámara anterior, el ojo humano normal sólo absorbe la fluoresceína en soluciones al 10 %, siendo apenas demostrable la absorción en solucio-

nes al 5 %. La solución al 0,4 % sólo es absorbida en circunstancias patológicas, de lesión corneal.

D — REACCIONES A LA ADMINISTRACION HIPODERMICA DE LA FLUORESCÉINA

Las soluciones relativamente concentradas, cuando se inyectan en el tejido celular subcutáneo, provocan fenómenos inflamatorios, que pueden llegar a la producción de abscesos y necrosis, especialmente en zonas expuestas a la luz, por ello deben tomarse, con las infusiones por vía venosa, las mismas precauciones que con la tripaflavina o los arsenicales, para evitar extravasaciones. Hemos comprobado este extremo personalmente al practicar inyecciones subcutáneas en cobayos, las que producían escara cuando se inyectaban a concentración del 1 por 100 muy superficialmente, por lo que recurrimos a soluciones más diluidas.

E. — ACCION DE LA FLUORESCÉINA SOBRE EL ORGANISMO

La fluoresceína una vez absorbida, produce, si la dosis es suficiente, coloración amarilla en todo el cuerpo, acompañada de fluorescencia verdosa de los ojos. Según nuestras observaciones, es suficiente, para producir estos efectos, la dosis de 0,01 gramo por kilo en perros y gatos. ERLICH (16) describió este fenómeno, como asimismo la aparición de una línea, que lleva su nombre, en el ángulo iridocorneal y que es debida a la secreción de la fluoresceína por los plexos coroideos, HERTEL (31) afirma que la fluoresceína que pasa a la cámara anterior del ojo, es la no unida a las proteínas plasmáticas, y que llega allí, por un proceso de ultrafiltración.

La línea de ERLICH aparece al cabo de 9 a 13 minutos de inyectar la substancia por vía subcutánea. ROSENOW (54) vió que esta aparición se retarda si los animales en que se experimenta se tratan previamente con calcio, de lo que dedujo que este ión producía una disminución de la permeabilidad capilar. Tras la inyección endovenosa, observó HARA (29) la línea de Erlich al cabo de 26 segundos; nosotros en los perros hemos obtenido resultados análogos. Introduciendo la fluoresceína por vía peritoneal se observa la línea de Erlich al cabo de un minuto y medio. Este plazo, varía según las condiciones en que se encuentra la serosa, por lo que permite formarse una idea de la reabsorción del peritoneo en diferentes estados: inflamaciones, éxtasis portal, etc.

F. — ELIMINACION

I. — *Orina.* — La fluoresceína absorbida se elimina en su mayor parte por la orina en forma de sal sódica, comunicándole fluorescencia. Así lo describen JOLDBAVER y BUSCH (37) y FLEIG (19).

Nosotros también lo hemos comprobado. ELLINGER (14 y 15) ha estudiado experimentalmente la eliminación renal de la fluoresceína y colorantes fluorescentes en diversas especies de anfibios. La fluoresceína sódica puede precipitarse de la orina por acidificación con ácido clorhídrico, extrayendo después la fluoresceína ácida con éter. Después de una dosis única, la eliminación dura varios días. La eliminación renal está en relación con el estado funcional del órgano.

2. — *Heces.* — Por las heces se elimina parte de la fluoresceína, principalmente a través de la vesícula biliar. Por eso se han empleado sus derivados yodados como medios de contraste vesicular. HIRT y colaboradores (32), han estudiado la eliminación hepática de la fluoresceína, mediante el microscopio luminiscente en ranas y ratas.

3. — *Secreción salivar y lagrimal.* — La fluoresceína, según WESTLI (63-63), únicamente se elimina por la saliva y las lágrimas, cuando se administran dosis muy fuertes. La cuantía de la eliminación no varía, aunque se excite la secreción salivar con pilocarpina.

4. — *Líquido céfalorraquídeo.* — Respecto al paso de la fluoresceína al líquido céfalorraquídeo, se sabe que en la especie humana administrada por os colorea dicho líquido de amarillo intenso. SALUS (56). Han estudiado también el paso de la fluoresceína al líquido céfalorraquídeo los cirujanos SCHALTENBRAND, GEORG TRACY y PUTNAM (57) del Laboratorio de Investigaciones Quirúrgicas de Harvard. En los conejos no pudo encontrarse ni aun después de inyectar la substancia por vía endovenosa. ERLICH (17).

5. — *Secreción láctea.* — Respecto a la eliminación por la glándula mamaria, existen datos discordantes. L. VAN ITALLIE (34), después de administrar fluoresceína a vacas, encontró el colorante en la leche, mientras KOLDEWIJN no pudo observar esto en el caso de las cabras.

6. — *Fetos.* — La fluoresceína inyectada a hembras grávidas, pasa a los fetos. ZARETZKY lo observó así en las ratas blancas y nosotros en los cobayos.

G. — ACCIONES FARMACOLOGICAS DE ALGUNOS DERIVADOS HALOGENADOS DE LA FLUORESCEINA: SOBRE ANAFILAXIA Y ALGUNAS CONSTANTES BIOLÓGICAS

Consideramos de interés consignar junto a las acciones farmacológicas de la fluoresceína, algunos de sus derivados halogenados. Merece señalarse una acción del eosinato de cesio. Este cuerpo, según GIRARD y PEYRE (22) posee acción protectora en el conejo y en la cobra sobre el colapso mortal, producido por la inyección endovenosa de arsenobenzol o bitartarato de bismuto. Asimismo protege a la cobra y al perro, de la sensibilización por inyecciones repetidas de suero de caballo. Afirman que tampoco aparecen fenómenos de anafilaxia, cuando se inyecta en animales sensibilizados al anafilactógeno junto con eosinato de cesio.

Más recientemente se ha estudiado la acción de la eosina sobre

diversas constantes biológicas, glucemia, cloremia, colesterinemia, temperatura corporal, glucógeno hepático y muscular, etc. En el conejo GATZANIUK (21) observa que la irradiación de los animales disminuye la glucemia, mientras que la irradiación de los que han recibido 2 c. c. de eosina al 5 %, provoca un aumento de glucosa en sangre. La eosina aumenta también la glucemia en los animales mantenidos en la oscuridad. La irradiación en los animales testigos, disminuye la colesterinemia, mientras la aumenta en los que han recibido eosina. A oscuras la eosina aumenta también la colesterinemia. La cloremia disminuye después de la administración de eosina, tanto en animales sometidos a irradiación, como en los mantenidos en la oscuridad.

III. — USOS MEDICOS DE LA FLUORESCEINA

A. — SOBRE EL FUNCIONAMIENTO RENAL

La eliminación renal de la fluoresceína es función del estado de la glándula. Está retrasada en las nefritis intersticiales, glomerulonefritis y esclerosis. Por ello STRAUSS (59) propuso la administración de un gramo de fluoresceína por vía oral, como prueba funcional del riñón. Cada 10 minutos se determina la eliminación urinaria del colorante, con lo que se construye su curva de eliminación de la que se deducen las consecuencias diagnósticas correspondientes. Esta prueba es actualmente poco usada, utilizándose de preferencia otros colorantes, como el indigocarmín. La eliminación renal de la fluoresceína ha sido estudiada mediante el microscopio fluorescente, por GRAFFLIN (25), constituyendo una importante técnica fisiológica para el estudio de la actividad glomerular.

B. — DIAGNOSTICO DE LA MUERTE

La observación de ERLICH (16) de que la fluoresceína teñía de amarillo la piel y mucosas, condujo a SEVERIANO ICARD, médico legista francés, a proponer la fluoresceína para el diagnóstico diferencial de la muerte real y la muerte aparente. Con ello ganó en 1897 el primer premio de la Academia de Medicina de París. La técnica de ICARD consiste en inyectar al presunto cadáver por vía subcutánea o intratraqueal una solución de fluoresceína alcalina, produciéndose la tinción de la piel en caso de supervivencia.

C. — APLICACIONES OFTALMOLOGICAS

Tal vez la oftalmología es la especialidad médica en que se ha hecho mayor uso de la fluoresceína hasta que modernamente se le han descubierto nuevas aplicaciones. HAMBURGUER (28) recomendaba la ingestión de 5 a 6 gramos de fluoresceína para el diagnós-

tico de procesos inflamatorios del iris. La coloración que se produce instilando solución de fluoresceína sódica en la conjuntiva, es muy persistente, y hace que se manifiesten con intensidad las pérdidas de sustancia. PFLUGER (50), STRAUB (58), FROM y GROSNOW (20), estudian su empleo para hacer visibles las ulceraciones corneales.

Otra prueba diagnóstica es la propuesta por KLAR (39), basada en que las soluciones de fluoresceína sódica al 0,4 % no se difunden hasta la cámara anterior cuando se aplican sobre la córnea normal, mientras pasan a la cámara anterior, en caso de ulceraciones, infiltrados, etc.

D. — CIRCULACION PERIFERICA

En 1941 MAY (43) añadió a las aplicaciones médicas descritas un nuevo e importante uso de la fluoresceína. Estudiaba este autor el estado de la circulación periférica, en enfermos afectados de perniosis y acrocianosis usando la sustancia que tratamos, cuando observó la inesperada mejoría de sus lesiones, lo que le indujo a introducir la fluoresceína como tratamiento de tales trastornos. Desde entonces su empleo en perniosis y afecciones similares se extiende, abundando los trabajos de tipo clínico, en que se estudian en todos sus aspectos prácticos la terapéutica fluoresceínica. LEFÈVRE (11), DUBARRY (46), HALLE (45), MILLIAN (47), JAUSSION (35), PEROT, LAFOURCADE, MERCADAL y DULANTO (46) y otros, TOURAINE (61), hacen destacar en sus trabajos la eficacia de la medicación, como asimismo su inocuidad, lo que no nos llama la atención teniendo en cuenta lo expuesto ya al hablar de la toxicidad de la fluoresceína en el hombre.

1. — *Perniosis*. — Por tener puntos de contactos en su mecanismo de producción la perniosis con las congelaciones y la enfermedad de RAYNAUD, el uso de la fluoresceína se ha extendido a las mismas por MAY, al parecer con buen éxito.

En conjunto caracterizan a la fluoresceína, según los datos bibliográficos recientes, la rapidez de sus resultados clínicos, que aventajan a cualquier otro de los fármacos empleados en circunstancias similares. Las molestias subjetivas, mejoran dentro de las veinticuatro horas, los movimientos se hacen fáciles, desaparece la infiltración y cicatrizan las ulceraciones en pocos días. La acción preventiva ha sido también comprobada por varios autores. Citaremos como interesantes los trabajos de BEN SALAH (3), GONIN (23), MERCADAL, DULANTO y PULIDO (46), LLORENS (42) y la revisión de MERCADAL (45). La vía de administración aconsejada por MAY es la endovenosa, empleando soluciones de fluoresceína sódica al 5 por 100. La norma corriente de administración es dar, una o dos veces a la semana, de 2 a 5 c. c. de la solución inyectable por vía endovenosa, siendo esta vía la empleada hasta el momento actual por todos los clínicos cuya bibliografía hemos consultado. Pero teniendo en cuenta la facilidad con que se absorbe la fluoresceína

por el intestino, sospechamos que la administración por vía oral sería igualmente provechosa, a más de ser más sencilla y segura, cosa que hemos comprobado irrefutablemente, pero sobre la que no insistimos, dada la índole experimental de nuestro trabajo.

Al exponer los conocimientos farmacológicos acerca de la fluoresceína, no hemos mencionado las teorías expuestas por distintos autores clínicos para explicar la acción de la misma en los procesos asfícticos de las extremidades, por carecer de base experimental. Ahora daremos algunas indicaciones sobre las hipótesis de trabajo emitidas, por lo que pueden orientarnos en el futuro desarrollo del tema.

MAY, gratuitamente, cree debida la acción de la fluoresceína sobre la circulación periférica a procesos de fotosensibilización, hipótesis fácil de admitir por tratarse de un cuerpo que posee estas propiedades. Pero a esta opinión se han opuesto varios clínicos, entre ellos LEFEVRE y colaboradores (41) que afirman la existencia de una acción directa sobre los vasos, fundándose en las observaciones del oftalmólogo BAILLIERT, quien observó que la fluoresceína dilataba los pequeños vasos del ojo. MERCÁDAL y DULANTO (46) se basan, para contradecir a MAY, en que se observa igual actividad terapéutica, en las partes cubiertas, que en las expuestas a la luz.

I. — ESTUDIO EXPERIMENTAL

A pesar del interés químico y terapéutico de la fluoresceína, salvando las publicaciones clínicas recientes a que nos referimos, es poco lo que se ha estudiado de su actividad farmacológica. Casi exclusivamente ha sido estudiada su absorción, distribución y eliminación con finalidad diagnóstica, su posible acción antiséptica y algún otro aspecto que ya hemos descrito. Incluso en los tratados más completos apenas se dedican dos páginas a su descripción. Por ello, queriendo contribuir a su estudio farmacológico, hemos realizado cuantos trabajos experimentales hemos creído adecuados para completar el conocimiento de las acciones de la droga y poder así interpretar su uso terapéutico.

En nuestro trabajo estudiaremos sucesivamente la acción de la fluoresceína sobre el fenómeno anafiláctico, sobre la presión arterial, sobre órganos de fibra lisa y las interacciones de la fluoresceína con otros fármacos.

II. — ACCION ANTIANAFILACTICA

Existiendo las referencias de GIRARD y PEYRE (22) y de DELAPLACE y MARINESCO (9) sobre la acción antianafiláctica del eosinato de cesio, cuerpo derivado de la fluoresceína, quisimos determinar en qué cuantía influía la fluoresceína sobre el shock anafiláctico.

Empezamos la experiencia estudiando la posible acción antianafiláctica sobre órgano aislado procedente de animales sensibilizados al suero sanguíneo de otra especie. Este método es más sensible que la provocación del shock anafiláctico en el animal, ya que la inyección intracardíaca del desencadenante puede producir a veces la muerte por lesión traumática, lo que dificulta el juicio sobre los resultados, mientras que los órganos aislados responden con extraordinaria sensibilidad a la introducción de anafilactógeno en el baño, siendo además el fenómeno absolutamente objetivo.

A. — EXPERIMENTACION ANIMAL «IN VITRO»

Se prepararon cobayos inyectándoles durante tres días consecutivos un c. c. de suero fresco de caballo por vía subcutánea. Transcurrido un lapso de quince días, se sacrificaban para estudiar la respuesta de su intestino recto, «in vitro», con el anafilactógeno, solo y en presencia de fluoresceína.

1. — *Sobre el recto.* — El recto de cobayo fué montado al

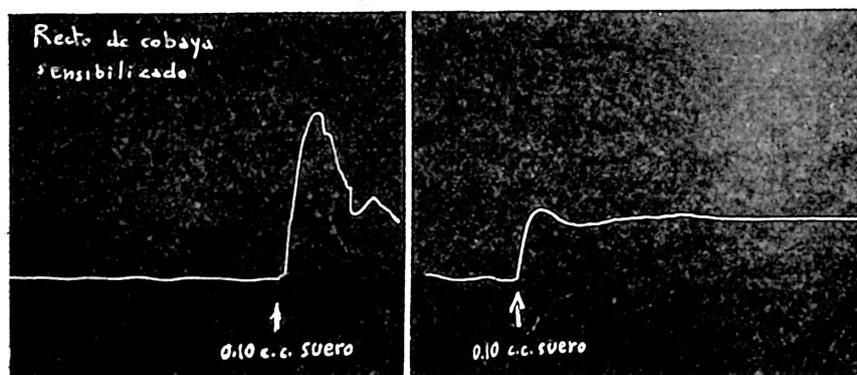


Fig. 1.

Fig. 2.

modo de MAGNUS, en termostato a 38° en baño de líquido de Tyrode y oxigenación por burbujeo de O₂. La capacidad de los vasos empleados era de 200 c. c. En el baño que contenía un fragmento de recto se introducía 0,10 c. c. de suero fresco de caballo, produciéndose una contracción. Al otro fragmento de recto del mismo animal se le sometía a igual prueba, después

de haber añadido al baño 0,005 grs. de fluoresceína sódica. La presencia de la fluoresceína no suprime la contracción, si bien suele ser de intensidad y duración algo menor. Como muestra de lo expuesto adjuntamos dos gráficas (figs. 1 y 2). En la primera se observa la contracción producida por la introducción en el baño del anafilactógeno, y en la segunda, el compor-

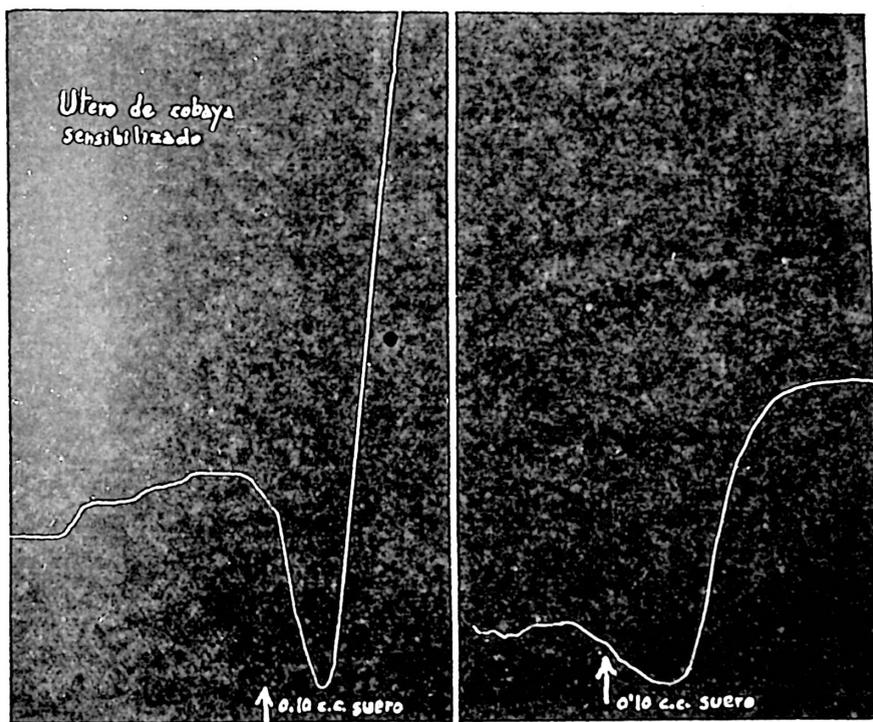


Fig. 3.

Fig. 4

tamiento de otro pedazo de recto del mismo animal, en baño con fluoresceína.

2. — *Sobre el útero.* — Otra experiencia se realizó con cobayos hembras. Estas se prepararon del modo descrito con suero fresco de ternera. Pasados quince días se sacrificaron los animales para observar la respuesta de su útero, habiendo previamente tratado la mañana antes a algunos de ellos con 0,01 gramos de fluoresceína subcutánea. Con ello queríamos averiguar si la inyección de fluoresceína en el animal vivo protegía

del desencadenamiento del shock anafiláctico «in vitro». Entonces montamos en baño con Tyrode, útero de animal no tratado con fluoresceína y en otro, útero de animal fluoresceinado. Se adicionó a los baños 0,10 c. c. de suero de ternera fresco, comparando la intensidad de las contracciones producidas. Parece que la preparación del cobayo con fluoresceína, disminuye la intensidad de la respuesta.

En las gráficas (figs. 3 y 4) puede observarse la variación de las respuestas al anafilactógeno en el útero de cobaya sin preparación y en el útero de cobaya que ha recibido fluoresceína. En la primera gráfica vemos la intensa contracción tetánica que produce el desencadenante introducido en el baño. En la segunda, procedente de animal preparado con fluoresceína, la contracción es de intensidad notablemente menor.

Después de estudiar la protección que pueda ofrecer la fluoresceína sobre el fenómeno anafiláctico «in vitro», estudiamos la acción antianafiláctica en animales vivos.

B. — EXPERIMENTACION ANIMAL «IN VIVO»

Para ello sensibilizamos a 10 cobayos al suero fresco de caballo por el procedimiento descrito. Dejando tres animales testigos, se inyectaba a los demás durante tres días 0,01 gramo de fluoresceína sódica en inyección subcutánea. Pasados estos tres días se desencadenaba el shock anafiláctico en los cobayos inyectándoles intracardiácamente un c. c. de suero fresco de caballo. Todos los testigos sin excepción fallecieron con el cuadro típico del shock anafiláctico, entre los tres y siete minutos consecutivos a la inyección. Los cobayos tratados por la fluoresceína, respondían al anafilactógeno introducido por vía intracardiaca, con fenómenos atenuados de anafilaxia. Se mostraban inquietos durante 10 a 15 minutos, pasados los cuales se reponían fácilmente. Sólo uno de los cobayos que había recibido fluoresceína, fué encontrado muerto a la mañana siguiente en la jaula. Este fallecimiento no puede atribuirse a la acción del anafilactógeno, porque la muerte se produce en caso de shock, inmediatamente. Además, necropsiado el animal observamos un derrame sero-sanguinolento en el pericardio, de probable origen traumático que fué seguramente la causa de su muerte.

C. — COMENTARIO

La fluoresceína sobre intestino aislado de cobayos sensibilizados, no evita la aparición de contracciones por introducción del anafilactógeno en el baño, pero disminuye algo la intensidad y duración de la respuesta. El efecto parece ser mayor, cuando la fluoresceína se inyecta a los animales veinticuatro horas antes de experimentar «in vitro» la respuesta de sus órganos al anafilactógeno. La fluoresceína no impide la respuesta anafiláctica, pero disminuye su magnitud.

Mayor protección parece ejercer en los animales vivos. El shock anafiláctico mortal, que se produce por la inyección intracardiaca del anafilactógeno, no se produce cuando los animales han sido tratados previamente con fluoresceína. Únicamente se observan fenómenos atenuados de anafilaxia — los animales están intranquilos, se frotan las narices —, pero estos fenómenos son poco intensos. Los animales no caen como los testigos y únicamente un cobayo entre siete falleció, teniendo en cuenta las salvedades hechas en cuanto a la etiología de su muerte. De ello deducimos que en el animal vivo existe un grado de protección bien manifiesto, especialmente en lo que se refiere a evitar la aparición del shock anafiláctico mortal.

III. — ACCION DE LA FLUORESCÉINA SOBRE LA PRESION ARTERIAL

El estudio de la influencia que la fluoresceína pueda tener sobre la presión arterial es tanto más interesante, cuanto que se emplea en terapéutica esta sustancia en trastornos de la circulación periférica. Es de interés recordar la observación de BAILLIERT de que la fluoresceína dilataba los pequeños vasos del ojo. Como no conocíamos la existencia hasta el momento actual de base experimental en este aspecto, emprendimos el estudio de la acción fluoresceínica sobre la presión arterial, medida cruentemente.

A. — EXPERIMENTACION ANIMAL

Estudiamos los efectos de la fluoresceína sódica al 1 % en solución salina isotónica en perros y gatos. Han sido en total

estudiados quince perros y doce gatos con los resultados y técnicas siguientes:

1. — *En el perro.* — Los perros de 10 a 15 kilos de peso eran anestesiados al principio con Evipan sódico, y posteriormente, por haber terminado las existencias de esta droga, con 1/4 c. c. de Dial y 0,01 gramo de morfina por kilo. Algunos perros se hicieron con respiración artificial y otros con respiración libre. La cantidad de fluoresceína inyectada fué de 0,01 gramo por kilo de peso por vía endovenosa.

La inyección de fluoresceína iba seguida en todos los casos de un descenso de tensión pasajero de unos 20 mms. de Hg. Durante el descenso y hasta la recuperación desaparecen del trazado las ondas respiratorias. Esta respuesta se produce tantas cuantas veces se inyecta fluoresceína. Cuando se realizan en un mismo animal varias inyecciones del fármaco estudiado, se observa a lo largo del trazado de tensión un aumento de la pendiente. Este fenómeno se ha observado con constancia a lo largo de nuestras experiencias, por lo que creemos constituye regla.

Una segunda fase de la experiencia consistió en la atropinización del perro preparado para el registro de presión, y en el que previamente se comprobaba la respuesta hipotensora de la fluoresceína. La atropinización, con un mgr. por kilo, disminuye notablemente la respuesta a la fluoresceína, esperando va progresivamente con el tiempo reapareciendo el fenómeno fluoresceínico. La atropinización con dosis fuertes, abole completamente la respuesta a la fluoresceína dentro de la primera hora de la atropinización, reapareciendo después con lentitud.

En otro grupo de perros administramos un mgr. de acetilcolina por vía endovenosa, por dos veces consecutiva, para probar la similitud de la hipotensión producida. Entonces administrábamos fluoresceína que producía la respuesta citada, y a continuación de nuevo un mgr. de acetilcolina. La caída de tensión acetilcolínica era en este caso algo más íntesa que antes de administrar fluoresceína al animal. Como complemento de esta observación en otros perros, dábamos primero fluoresceína, a los pocos minutos acetilcolina, y una vez normalizada la tensión, fluoresceína de nuevo, con lo que obteníamos descen-

ses mayores que antes de administrar la acetilcolina, y esto cuando ya la acetilcolina inyectada no dejaba sentir sus efectos sobre la presión arterial y habida cuenta de que las respuestas a la fluoresceína, que varían de un animal a otro, son sensiblemente de igual intensidad en el mismo animal sin preparación.

Del material documental recogido reproducimos dos gráficas: la primera de ellas (fig. 5) correspondió a un perro de 13 kilos, anestesiado con dial-morfina. Puede apreciarse la res-

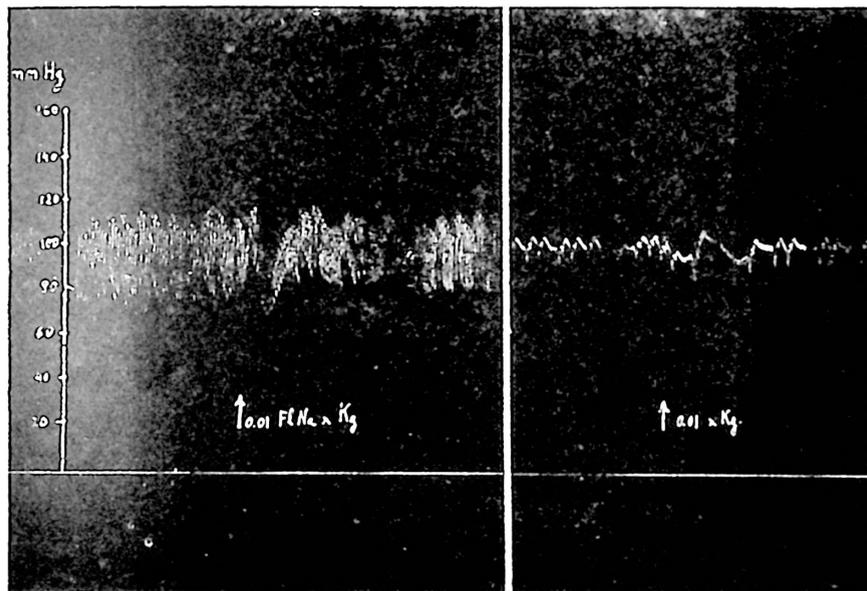


Fig. 5

puesta a la inyección de 0,01 gr. por kilo de fluoresceína sódica por vía endovenosa. La respuesta fluoresceínica ofrece con constancia este tipo de trazado. Para que pueda apreciarse la diferencia, mostramos el efecto de una segunda inyección de la misma cantidad de fluoresceína, efectuada 30 minutos después de atropinizar al animal con 1 mgr. de valerianato de atropina por kilo de peso.

La otra gráfica reproducida (fig. 6) ilustra la influencia de la atropinización del animal, a través del tiempo sobre la respuesta fluoresceínica. Un perro de 12 kilos de peso recibió 2,5 miligramos de valerianato de atropina por kilo de peso. A la

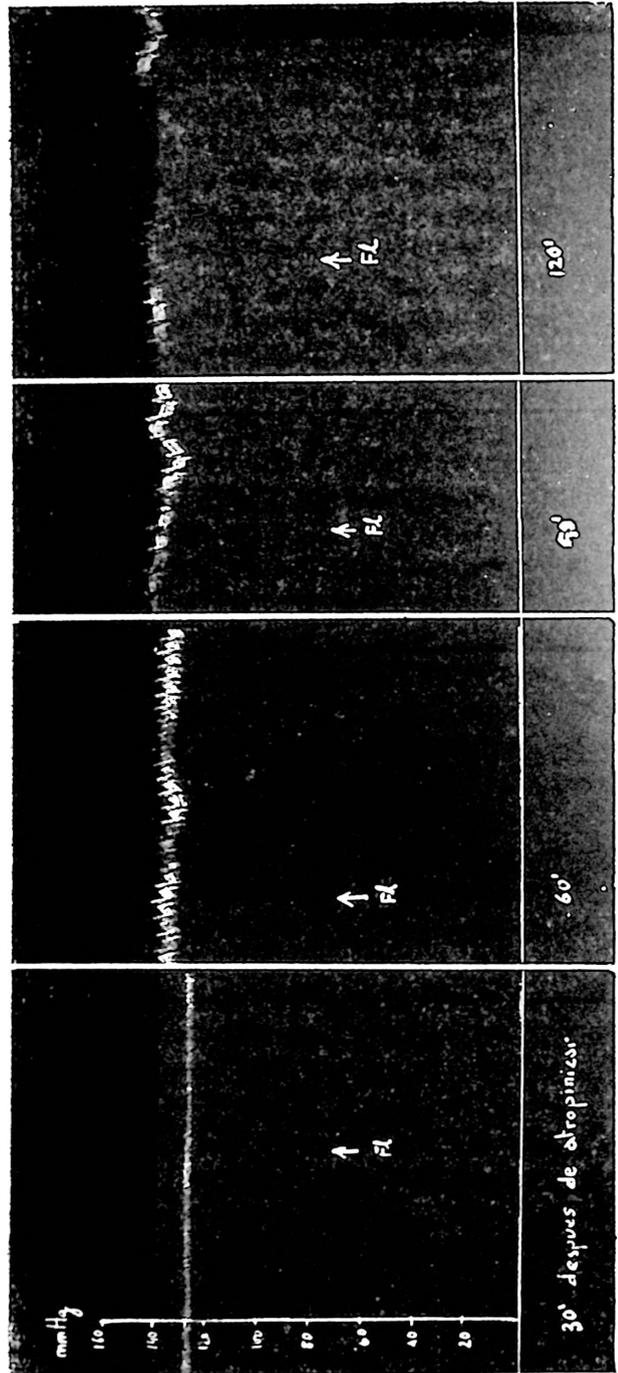


Fig. 6.

media hora de atropinizar se inyecta fluoresceína por vía endovenosa. La respuesta, como puede apreciarse, es prácticamente nula. A la hora, una nueva inyección de fluoresceína en igual cantidad, provoca ya una pequeña respuesta. A la hora y media la respuesta es algo mayor, y a las dos horas ha aumentado todavía sin que aun sea de la magnitud de las producidas por la fluoresceína en el animal intacto.

2. — *En el gato.* — El gato, animal de presión arterial más regular que el perro, nos sirvió para comprobar y valorar las observaciones anteriores. Los gatos de 2.500 a 3.000 gramos, con anestesia etérea y respiración artificial, fueron sometidos a las mismas experiencias que los perros.

La inyección de fluoresceína produce asimismo un descenso de tensión pasajero que se repite cuantas veces es inyectado el fármaco estudiado en el sistema circulatorio del animal. La forma de inflexión es característica, semejante a la que se producen en el perro y fácilmente distinguible de la producida por la acetilcolina. En la respuesta fluoresceínica, el descenso es más gradual y el ascenso suave.

Con la atropinización, ocurre lo mismo que en el perro. La atropina influye disminuyendo la respuesta fluoresceínica y variando su aspecto. A dosis fuertes la suprime por completo.

En el gato es claramente demostrativa la influencia de la acetilcolina sobre la fluoresceína. Después de administrar acetilcolina al gato, la respuesta fluoresceínica adquiere caracteres semejantes a la de la acetilcolina, y aun al cabo de quince a veinte minutos se percibe esta influencia, observándose que progresivamente hasta un cierto límite, dentro de este tiempo, la respuesta fluoresceínica aumenta de intensidad. Parece que existe una influencia mutua entre la acetilcolina y la fluoresceína.

Como ilustración de las observaciones realizadas, reproduciremos dos trazados de presión de gatos de nuestro material experimental.

En el primero (fig. 7) a un gato de tres kilos de peso, sometido a anestesia etérea con respiración artificial, le inyectamos por vía endovenosa 20 gammas de acetilcolina para apreciar la respuesta producida, e inmediatamente de recuperada la presión, 20 gammas más que producen una caída semejante.

La inyección de fluoresceína — 0,01 gramo por kilo — produce una inflexión distinta de la que habitualmente se observa en animales no preparados y semejante, pero de menor intensidad

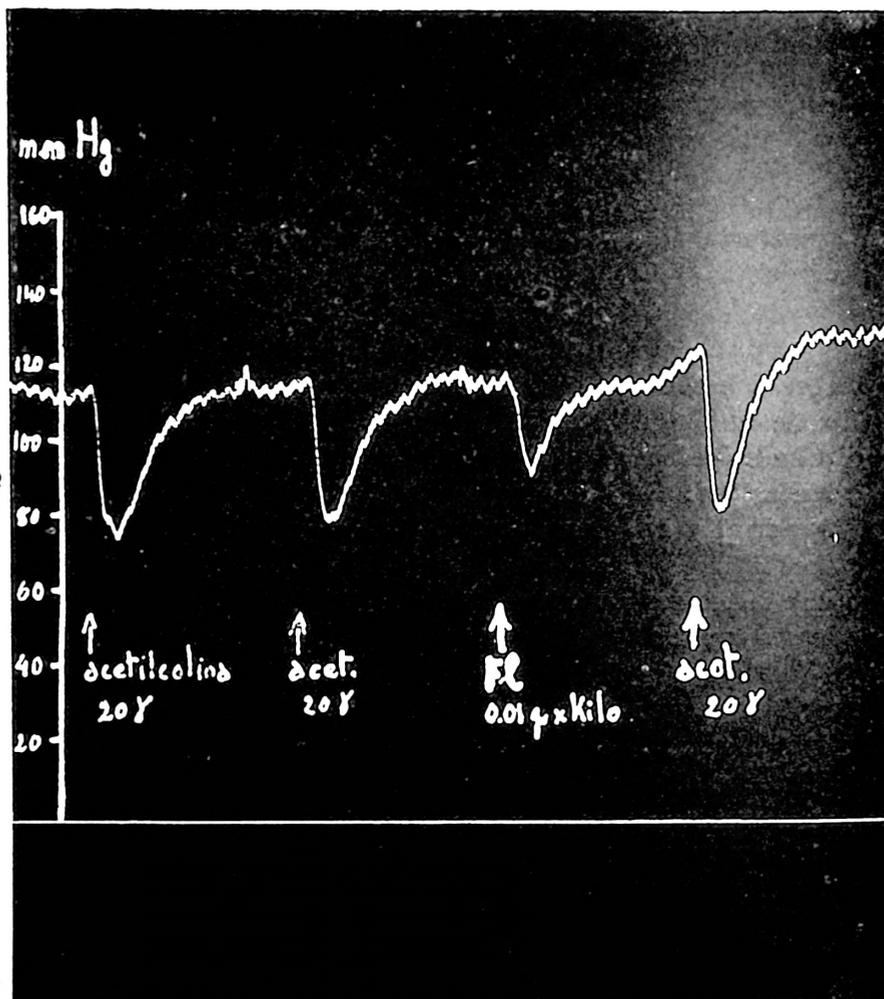


Fig. 7.

que la de la acetilcolina. Observamos en la respuesta a la fluoresceína, la presencia de dos inflexiones. Una primera incisión breve, que da paso a la segunda, de mayor profundidad y en la que la vuelta a la normalidad se realiza lentamente. Por la

acción de la acetilcolina esta primera incisura adquiere caracteres más agudos; a medida que transcurre el tiempo la segunda inflexión se acentúa mientras disminuye la primera. La atropinización al principio suprime la respuesta a la fluoresceína, y cuando la parálisis vagal va desapareciendo, reaparece progresivamente, pero en forma de inflexión única poco acusada. (Ver figs. 5, 6, 7 y 8.)

En la segunda gráfica (fig. 8), vemos primero la inflexión fluoresceínica típica en un gato de 3.200 gramos con anestesia etérea y respiración artificial. Al cabo de unos veinte minutos inyectamos 30 gammas de acetilcolina e inmediatamente de producirse la recuperación 0,01 gr. de fluoresceína sódica por kilo de peso. Compárese la distinta forma de inflexión producida con la anterior a la acetilcolina. Esperamos quince minutos y la inyección de una nueva dosis de fluoresceína produce una acción hipotensora notablemente más larga e intensa que las anteriores, lo que llama la atención teniendo en cuenta lo constante que suele ser la magnitud de la respuesta dentro de un mismo animal y en las mismas condiciones.

Inmediatamente después atropinizamos al animal y a la media hora inyectamos la fluoresceína. La gráfica demuestra claramente la disminución de la respuesta.

B. — COMENTARIO

A pesar de haberse atribuido la acción terapéutica de la que MAY atribuía a fenómenos de fotosensibilización y LEFFEVRE a una actividad directa, se carecía de bases experimentales en apoyo de cualquiera de dichas manifestaciones. Con nuestra experimentación creemos puede afirmarse una acción directa de la fluoresceína sobre la tensión arterial, en la que produce un descenso característico de la disminución de las resistencias periféricas. Esto no excluye naturalmente la posibilidad de que además los fenómenos de fotosensibilización influyan posteriormente en la circulación periférica. Tiene un interés particular la influencia negativa en la atropinización, que hace suponer el punto de ataque de la fluoresceína en las terminaciones colinérgicas vasculares. Existe además el curioso fenómeno de la influencia mutua de la fluoresceína y la acetilco-

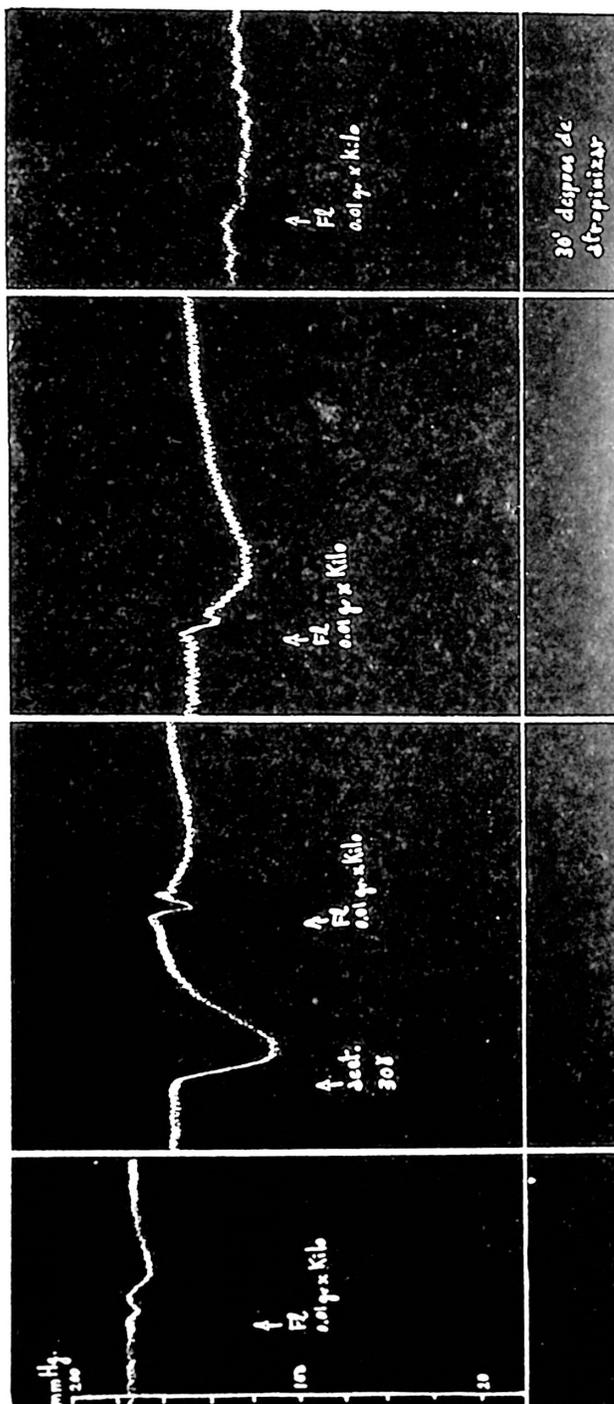


Fig. 8.

lina, que actúan sinérgicamente, observándose especialmente variaciones en la respuesta a la fluoresceína después de inyectar acetilcolina, y aún largo rato más tarde. Esto induce a sospechar que las variaciones de respuesta a la fluoresceína en animales distintos, o en el mismo animal con grandes intervalos, pueda ser debido a la distinta cantidad de acetilcolina existente en aquel momento en el organismo.

Bajo nuestro punto de vista la base de la acción terapéutica de la fluoresceína en la perniosis y procesos semejantes debería consistir en este reforzamiento mutuo de la acción de la acetilcolina por la fluoresceína. Naturalmente los hechos son susceptibles de distintas interpretaciones, limitándonos nosotros a reseñar el fruto de nuestros trabajos.

IV.—ACCION DE LA FLUORESCÉINA SOBRE ORGANOS AISLADOS

Un compuesto químicamente afín a la fluoresceína, la fenoltaleína posee propiedades purgantes por estimulación del intestino. Esto nos indujo a sospechar la posibilidad de que la fluoresceína poseyese alguna acción sobre la fibra lisa intestinal y con este objeto iniciamos nuestras observaciones en órganos aislados. Después extendimos el campo de observación al útero aislado y a la posible influencia de la fluoresceína sobre algunos fármacos activos sobre la fibra lisa.

A. — EXPERIMENTACION ANIMAL «IN VITRO»

1. — *Sobre el intestino delgado del conejo.* — Iniciamos nuestras observaciones con intestino aislado de conejo, montado al modo de MAGNUS, en termostato grande y baño de 200 c. c. Como líquido nutricio empleamos solución de Tyrode. La oxigenación se aseguraba por burbujeo de oxígeno en el baño, cuya temperatura se mantenía a 38 grados con el termostato. Elegíamos las primeras porciones del delgado del conejo, utilizándolas inmediatamente o mejor después de 12 horas de permanencia en Tyrode conservando en vaso Dewar con hielo.

El intestino aislado de conejo era montado en el baño,

esperando hasta que adquiriera una ritmicidad normal. Entonces se adicionaba, 0,01 gramo de fluoresceína sódica disuelta en Tyrode. Podía observarse un aumento ligero del tono del intestino, que disminuía con el lavado, no desapareciendo completamente. Esta estimulación se producía también con cantidades menores de fluoresceína, aunque con menor intensidad. La concentración de fluoresceína que en el baño produce aumento de tono apreciable oscila como límite inferior entre 5 y 15 gammas por c.c. del líquido de perfusión. A la concentración de 50 gammas por c.c. el efecto estimulante era bien manifiesto.

2. — *Sobre el recto de cobaya.* — También sometimos a idéntica experiencia, fragmentos de recto de cobayo. El recto de cobayo respondía de manera semejante al delgado de conejo, aunque con intensidad algo menor. Las concentraciones activas eran prácticamente las mismas que para el intestino de conejo.

3. — *Sobre el útero de cobaya.* — Sometimos por fin a idéntico tratamiento a útero aislado de cobayas vírgenes de 200 gramos de peso. La adición de fluoresceína sódica en las proporciones descritas — 5 a 50 gammas por c. c. de líquido de perfusión — no provocaba en el útero virgen contracciones, y sólo un pequeño aumento de tono. El útero de cobaya grávida al que se había provocado contracciones rítmicas con acetilcolina se influenciaba por la fluoresceína con un aumento de intensidad de las contracciones.

B. — COMENTARIO

El hecho de que la fluoresceína posee una acción estimulante de la fibra lisa, nos parece evidente y comprobado en intestino delgado de conejo, recto de cobaya y útero, especialmente en el grávido. Puede a primera vista extrañar que a pesar de haberse administrado por os cantidades grandes — varios gramos — de fluoresceína con finalidad diagnóstica no se hayan descrito acciones catárticas, como la que describió ZOLTAN VON VAMOSSY para la fenolftaleína. Esto se explica por la rapidez con que la fluoresceína ácida es disuelta en el jugo intestinal y la rapidez con que se absorbe, debido a lo cual no

deben permanecer grandes cantidades en la luz intestinal, como ocurre con la fenoltaleína.

V. — INTERACCIONES DE LA FLUORESCÉINA CON OTROS FARMACOS

Apreciada una acción directa de la fluoresceína, sobre los órganos de fibra lisa, quisimos estudiar la posibilidad de que pudiera modificar la respuesta de algunas drogas activas sobre estos órganos. Al efecto realizamos las experiencias que a continuación se describen.

A. — EXPERIMENTACIÓN ANIMAL «IN VITRO»

1. — *Sobre fragmentos de intestino delgado.* — Procedimos al montaje de las técnicas de órgano aislado en baño como se ha descrito en el apartado anterior. Iniciamos la experimentación montando en dos vasos sumergidos en el mismo termostato fragmentos contiguos de intestino, e inscribiendo los trazos correspondientes, mediante palanca frontal sobre el mismo kimógrafo. Adicionábamos al baño, en uno de los vasos, cantidades de fluoresceína que oscilaban entre 20 y 50 gammas por c. c. de líquido nutritivo. El aumento de tono producido por la fluoresceína se compensaba cargando la palanca, para obtener trazados aproximadamente de la misma amplitud y frecuencia, repitiendo el montaje cuando estas condiciones eran difícilmente conseguibles. Entonces se introducía en cada baño cantidades idénticas del fármaco cuya conducta frente a la fluoresceína quería estudiarse, comparando los trazados así obtenidos.

a) Cloruro bórico. — La primera substancia que se estudió fué el ión bario, en forma de cloruro, como substancia típica e intensamente estimulante de la musculatura lisa. Desde las primeras observaciones apreciamos una respuesta destacadamente mayor en el pedazo de intestino sumergido en baño fluoresceinado. Adjuntamos (fig. 9) uno de los trazados obtenidos. La curva superior pertenece al intestino sumergido en Tyrode que contiene 50 gramos de fluoresceína sódica por centímetro cúbico. La inferior solución de Tyrode sola. En los

puntos indicados se adiciona al baño 0,2 c. c. de una solución de cloruro bórico al 3 %. Puede apreciarse claramente la mayor intensidad de la respuesta en el trazado superior, aumentando la magnitud de la contracción alrededor del triple.

b) Histamina. — Otra serie de observaciones semejantes se llevaron a cabo para estudiar el comportamiento de la

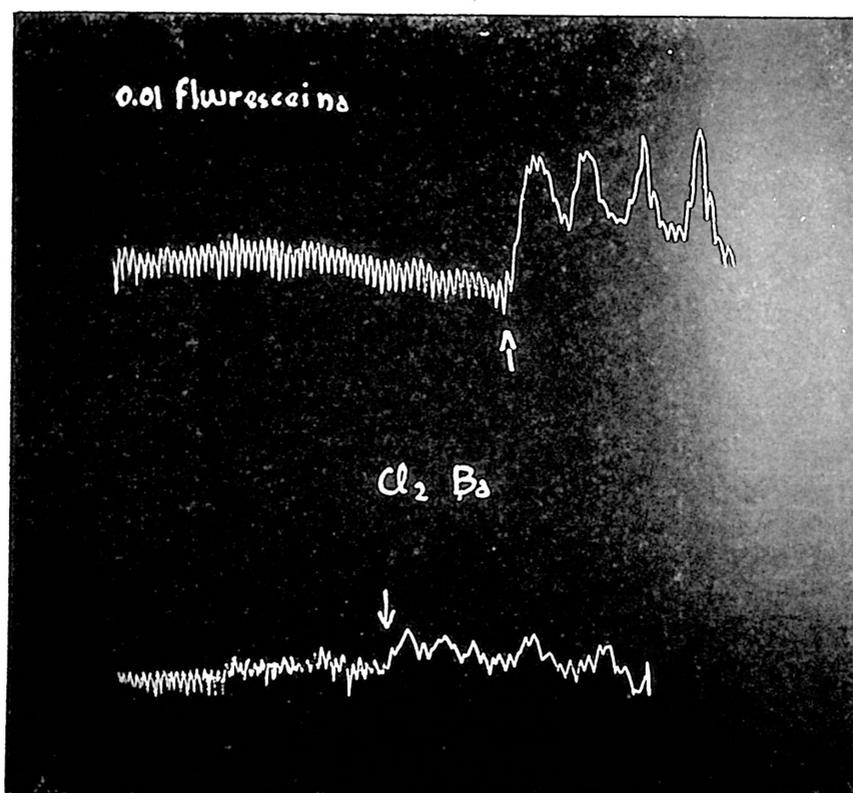


Fig. 9.

Histamina en estas condiciones. El intestino aislado de conejo, sumergido en baño fluoresceinado responde con contracciones de amplitud notablemente mayores que el testigo.

La gráfica adjunta (fig. 10) ilustra con suficiente claridad lo expuesto. En el trazado superior el intestino está sumergido en Tyrode con 50 gammas por c. c. de fluoresceína sódica. La curva inferior en Tyrode solo. En los puntos indicados por la flecha se introducen en los baños 0,1 c. c. de una solución de

Histamina al 1 por 1.000. Mientras que en presencia de la fluoresceína aumenta mucho la amplitud de las contracciones; en el trozo testigo el aumento de tono no va acompañado de un aumento semejante en la amplitud de contracción.

c) Acetilcolina. — Particular interés tenía para nosotros estudiar «in vitro» el comportamiento de la fluoresceína frente a la acetilcolina, dados los resultados obtenidos sobre la presión arterial en animales enteros y que hemos expuesto ya. Empleando técnicas idénticas a las descritas pudimos obtener «in vitro» resultados similares a los que la experiencia «in vivo» nos inducía a suponer. La respuesta a la acetilcolina del intestino

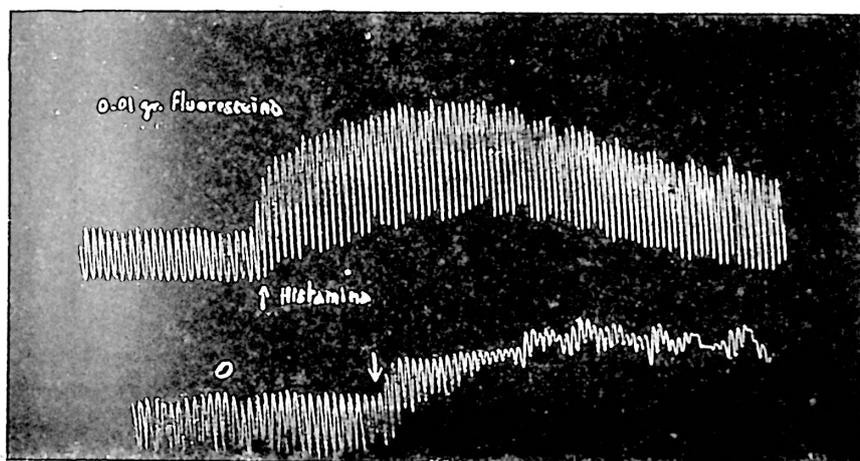


Fig. 10.

tino aislado sumergido en Tyrode fluoresceinado es de magnitud intensamente mayor que la que produce en el testigo. La reproducción de una de las gráficas obtenidas (fig. 11) demuestra este fenómeno. En el trazado superior intestino en baño con 50 gammas de fluoresceína por c. c., la curva inferior del trozo testigo. La adición de 1/20 de c. c. de una solución de acetilcolina al 1 por 250.000 a los baños, en los puntos señalados, produce en el trozo testigo un discreto aumento de tono y de la amplitud de las contracciones, mientras que el fragmento fluoresceinado responde con un aumento de tono intensísimo de 5 a 6 veces mayor, el que progresivamente va disminuyendo.

Todas estas observaciones han sido repetidas un número suficiente de veces, para garantizar la realidad de lo observado. Asimismo se ha comprobado, lavando el trozo testigo y añadiendo fluoresceína al baño, con lo que una segunda adición de las drogas estudiadas provoca respuestas notablemente mayores y en un todo semejantes a las obtenidas con trazados paralelos según hemos descrito.

d) Adrenalina. — La acción inhibitoria de la adrenalina

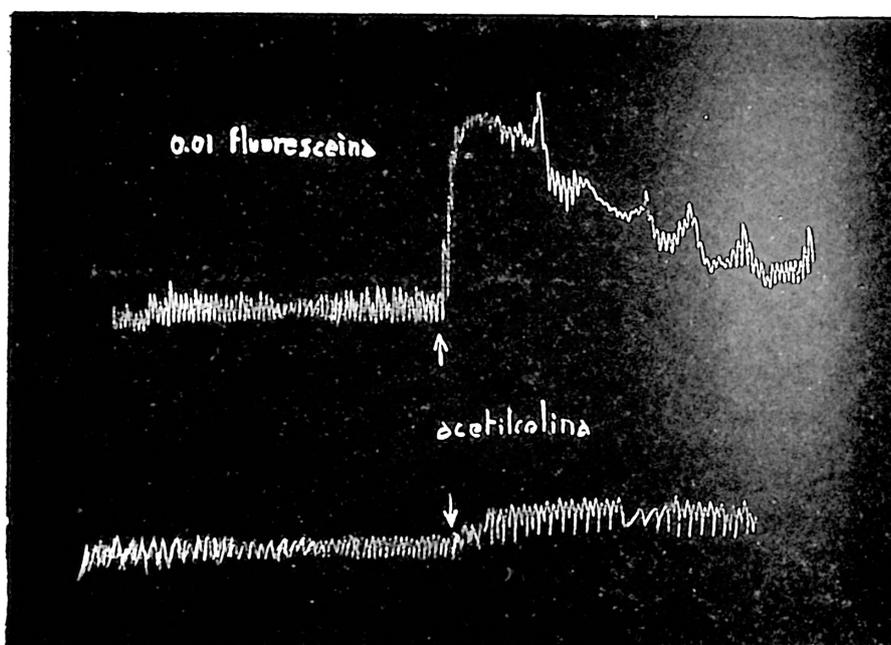


Fig. 11.

no hemos percibido que sufriese influencia alguna por la fluoresceína.

2. — *Sobre el recto.* — Repetimos las experiencias anteriores, utilizando recto de cobaya, en las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos son esencialmente los mismos. Exponemos una de las gráficas (fig. 12) obtenidas con recto de cobayo y cloruro bórico. En el trazado superior correspondiente al fragmento de recto sumergido en baño fluoresceinado se percibe claramente el gran aumento de tono en comparación con el trazado del trozo testigo.

3. — *Sobre el útero.* — Otro órgano de musculatura lisa, el útero de cobaya, se empleó para estudiar la influencia de la fluoresceína en este órgano sobre las drogas anteriormente citadas.

a) *Útero virgen.* — Utilizamos en unos casos, úteros de cobayas vírgenes de 200 a 250 gramos de peso, y en algunos casos úteros grávidos. La técnica seguida fué montar un cuerno uterino en baño con solución de Tyrode, observar la acción de la droga objeto de estudio, lavar, esperar la vuelta a la nor-

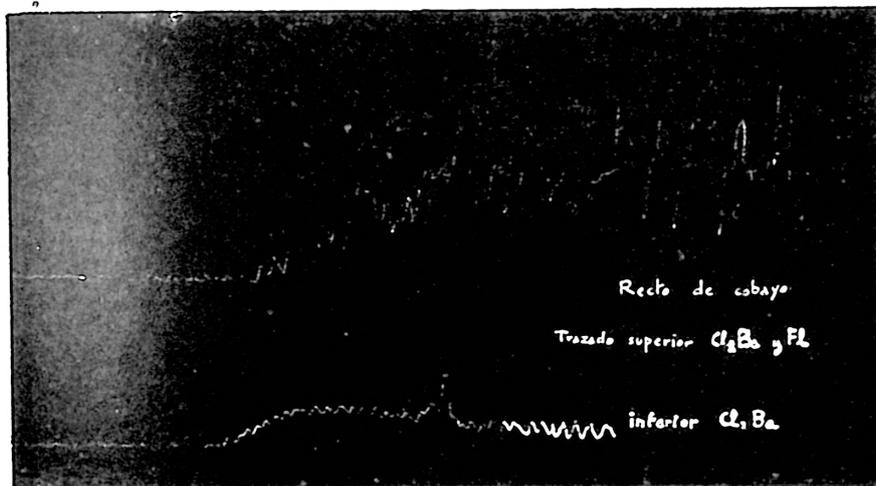


Fig. 13.

malidad, añadir fluoresceína al baño e introducir de nuevo en el mismo, idéntica cantidad de la droga que la primera vez. Por este procedimiento pudimos observar que la musculatura uterina responde con mayor intensidad a la acetilcolina, histamina y pituitrina después de introducir en el baño, cantidades de fluoresceína de 20 a 50 gammas. En las gráficas adjuntas (figura 13) puede observarse la variación que imprime a la respuesta del útero virgen a la pituitrina, la introducción de 50 gammas de fluoresceína en el baño. Los trazados expuestos pertenecen a útero de cobaya virgen de 240 gramos de peso. En los dos primeros podemos observar la contracción producida por 0,02 U. I. de pituitrina. Después de lavar se introdujeron en el baño 50 gammas de fluoresceína por c. c. del líqui-

do de perfusión. Una vez relajado el útero, se repitió la experiencia con la misma cantidad de pituitrina, obteniéndose las respuestas que se exponen.

b) Útero grávido. — En útero de cobaya preñada estu-

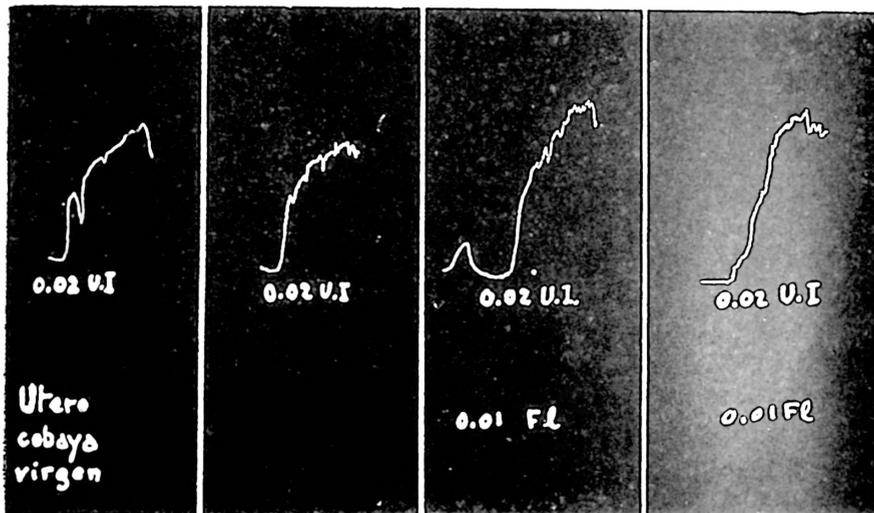


Fig. 13.

diamos la respuesta a la acetilcolina, antes y después de introducir fluoresceína en el baño. En la gráfica (fig. 14) puede



Fig. 14.

apreciarse como el número de contracciones rítmicas que producen 2 gammas de acetilcolina introducidas en el baño, aumentar en número y duración después de añadir fluoresceína al mismo.

B. — COMENTARIO

La fluoresceína que posee de por sí una ligera acción estimulante de la musculatura lisa del intestino delgado del conejo, recto de cobaya y útero del mismo animal, produce un aumento de la acción de las drogas excitantes de dicha fibra, cuando concurren en presencia simultánea en el baño. Este fenómeno es constante en cuanto a su calidad, variando cuantitativamente según los casos la relación entre las magnitudes de la contracción del fragmento fluoresceinado y la del testigo. Especialmente la acción potenciadora de la acetilcolina puede tener a nuestro juicio importancia, como uno de los posibles mecanismos que expliquen la acción terapéutica de la fluoresceína. Esta acción es inmediata y se produce sin relación con la iluminación a que está sometido el baño, por lo que creemos no había lugar a la producción de fenómenos de fotosensibilización.

Sobre el útero aislado de cobaya virgen, produce una potenciación de poca magnitud sobre la pituitrina. La sinergia con la acetilcolina es más evidente, especialmente en el útero grávido, en que provoca contracciones rítmicas de mayor intensidad y duración que las desencadenadas por idéntica cantidad de acetilcolina antes de introducir la fluoresceína en el baño.

VI. — CONCLUSIONES

En el curso de nuestra experimentación hemos podido apreciar las siguientes propiedades de la fluoresceína :

1.^a La fluoresceína posee acción protectora «in vivo» frente al shock anafiláctico mortal en la cobaya, e «in vitro» disminuye la intensidad de la respuesta a la introducción del anafilactógeno.

2.^a La fluoresceína produce en perros y gatos una caída de tensión manifiesta y constante, tantas cuantas veces sea inyectada. Esta inflexión en la curva de presión arterial, es modificada en sentido negativo y aun anulada por la atropinización, reapareciendo después paulatinamente.

3.^a La caída de tensión producida por la fluoresceína después de haber inyectado acetilcolina, ofrece características dis-

tintas en forma e intensidad, aumentando la magnitud de la caída. Este efecto se prolonga hasta media hora después de la inyección de acetilcolina, inversamente la respuesta acetilcolínica es algo más intensa en el animal fluoresceinado.

4.^a La fluoresceína estimula la fibra lisa de intestino delgado de conejo, recto de cobaya y en menor magnitud la del útero de este animal.

5.^a La fluoresceína refuerza la acción sobre los órganos citados de la acetilcolina, histamina y cloruro de bario. En el útero virgen aumenta ligeramente la acción de la pituitrina, en el grávido ofrece clara sinergia con la acetilcolina.

Summary

In the course of our experiments we have been able to observe the following qualities of the fluoresceine :

The fluoresceine possesses a protective action «in vivo» against the deadly anaphylactic shock in the cobaye, and it diminishes «in vitro» the intensity of the reply to the anaphylactic agent introduction.

The fluorescein causes in dogs and cats a constant and clear tension fall, all the times that it will be injected. This inflection on the arterial pressure curve, is modified in a negative sense and annulated by the atropine influence, reappearing slowly after wards.

The tension fall produced by the fluoresceine after having injected acetylcholine, offers several characteristics in form and intensity, increasing the fall magnitude. This effect lasts half an hour after the acetylcholine injection. On the otherhand the acetylcholinic reply is some more intense in the fluoresceinated animal.

The fluoresceine does stimulate the, smooth fiber of thin bowels of rabbit, rect of cobaye and in less proportion, those of the uterus of this animal.

The fluoresceine reinforces the action of acetylcholine upon the above mentioned organs, hystamine and barium chloride. In the virginal uterus increases slightly the pituitaric action and in the gravidics it offers a clear synergics with the acetylcholine.

Zusammenfassung

Im Laufe unserer Versuche haben wir folgende Eigenschaften des Fluoresceins feststellen können :

r) Das Fluorescein beugt den tödlichen anafilaktischen Schock

beim Meerschweinchen vor und vermindert in vitro die Reaktionsstärke gegenüber der Einführung des anafilaktischen Stoffes.

2) Das Fluorescein verursacht bei Hunden und Katzen einen deutlichen und konstanten Blutdrucksturz, so oft es eingespritzt wird. Dieser Fall der Blutdruckkurve wird durch das Atropin aufgehoben und sogar aufgehoben, aber erscheint nach und nach wieder.

3) Wird vorher Acetylcolin eingespritzt, dann zeichnet sich der Blutdrucksturz durch besondere Eigenschaften, was Form und Stärke anbelangt, aus und ist viel tiefer. Diese Wirkung dauert eine halbe Stunde nach der Einspritzung des Acetylcolins fort, und umgekehrt die Reaktion auf das Acetylcolin ist etwas stärker beim mit Fluorescein behandelten Tier.

4) Das Fluorescein regt die glatte Muskelfaser des Dunndarms des Kaninchens des Mastdarms des Meerschweinchens und in fleinerem Masse die des Uterus desselben an.

5) Das Fluorescein verstärkt die Wirkung des Acetylcolins, Hysamins und Bariumchlorids auf die genannten Organe. Im nicht schwangeren Uterus verstärkt es etwas die Wirkung des Pituitrins, im schwangeren Uterus zeigt es eine deutliche Synergie mit dem Acetylcolin.

Bibliografía

1. ACHARD BOUTARIC y BOUCHARD. — «Action des serums sur le pouvoir fluorescent des solutions d'urarine». C. R. Acad. Sc. Paris, T. 199, p. 903-906, 1934.
2. ADAMS, JOHNSON. — «Elementary Laboratory Experiments in organic Chemistry». p. 315, Nueva York, 1939.
3. BEN-SALAH. — Tesis, Paris 1941.
4. BRUCK. — Deutchst. Med. Wochs. p. 2073, 1913.
5. BOUTARIC y BOUCHARD. — «Action de quelques liquides normaux ou pathologiques et de quelques produits thérapeutiques sur la fluorescence des solutions d'urarine.» C. R. Soc. Biol. Paris, T. 118, p. 1188-1189, 1935.
6. BOUTARIC y BOUCHARD. — «Action du serum de souris porteuses de cancer de goudron sur le pouvoir fluorescent des solutions d'urarine.» C. R. Soc. Biol. Paris, T. 120, p. 293, 1935.
7. BOUTARIC y BOUCHARD. — «Action comparée des alcaloides ordinaires et des gencalcaloides sur la fluorescence des solutions d'urarine.» C. R. Acad. Sc. Paris, T. 201, p. 629-631, año 1935.
8. CAIN, THORPE. — The Synthetic Dyestuffs. p. 377, Londres 1933.

9. DELAPLACE y MARINESCO. — *Comp. Ren.* T. 183, p. 1106, año 1926.
10. DELPRAT EPSTEIN KERR. — *Cit. : von BERGMANN, «Tratado de Medicina Interna.» Tomo III. 1944.*
11. DEROT LAFOURCADE y col. — *Bull. Soc. Fr. D. et S.* p. 282, año 1942.
12. DRESER. — *Zeitz. f. Biologie.* T. 21, p. 60, 1885.
13. EISENBERG. — *Zentr. f. bakterien.* T. 71, p. 490, 1913.
14. ELLINGER. — «Die Ausscheidung des fluoresceins in der Froschniere.» *Citado en Berichte,* T. 55, p. 646, 1930.
15. ELLINGER. — «Die Ausscheidung von Fluorescein und Trypaflavin durch die Niere des winterfrosches.» *Citado en Berichte,* T. 59, p. 615, 1931.
16. ERLICH. — *Med. Wss.* p. 21, 1882.
17. ERLICH. — *Terap. Monatshefte.* p. 88, 1888.
18. FISHER. — *Laboratory Manual of organic Chemistry.* Nueva York, 1941.
19. FLEIG. — *Jour. d. Pharmacol. et de Chimie.* T. 29, p. 513.
20. FROM y GROSENOW. — *Archiv. f. Augenheilk.* T. 22, p. 247, año 1891.
21. GATZANIUK. — *Med. z. Allad. Nauk. URSS,* T. 10, p. 397-409.
22. GIRARD y PEYRE. — «Consequences physiologiques de la dispersion et de la protection des micelles plasmatiques par certains colorants fluorescents. Protection vis a vis du choc — medicamenteux et serique — abolition de l'anaphylaxie.» *Comp. Ren.* T. 183, p. 84, 1926.
23. GONIN. — *Rev. Med. Suisse Romand.* p. 23, 1944.
24. GOTO. — «Fluorometry of fluorescein and eosine.» *Citado en Berichte.* T. 121, p. 311, 1940.
25. GRAFFLIN. — *J. Cell. a. com. Physiol,* T. 12, p. 167-70, 1938.
26. HAHN y KOSTENBADER. — *Zeitschr. f. Chemot.* T. 2, p. 71, año 1913.
27. HAMBURGER. — *Berliner Kli. Wsch.* p. 1402, 1909.
28. HAMBURGER. — «Über die Ernährung des Auges.» Leipzig, año 1914.
29. HARA. — *Bioch. Zeitz.* T. 120, p. 28, 1921-22.
30. HENLE. — «Anleitung für das organisch-chemische.» *Praktikum,* p. 176, 1921.
31. HERTEL. — «Über die Bedeutung der Erlischen Fluorescein versuche.» *Arch. Augenheit.* T. 100-101, p. 460-469, 1929.
32. HIRT ANSORGE y MARKSTAHLER. — «Luminizensmikroskopische Untersuchungen an der lebenden Frosch- und Rattenleber. Die Ausscheidung von Fluorescein und Trypaflavin.» *Z. Anat.* T. 109, p. 1-32, 1938.

33. ICARD. — «La mort réelle et la mort apparente.» Paris. Alcan. Edit. 1897.
34. VAN ITALLIE. — Arch. d. Pharmazie, T. 246, p. 594, 1908.
35. JAUSION GIRARD y CALOP. — Bull. Soc. Fr. Der. Syph. p. 222, año 1942.
36. JOLDBAUER y BUSCH. — Arch. Inter. d. Pharmacol. et d. Ther. T. 15, p. 267, 1905.
37. JOLDBAUER y BUSCH. — Archives int. Pharmacol. et Ther., T. 15, p. 372, 1905.
38. KARRER. — «Tratado de Química Orgánica.» Barcelona, 1942.
39. KLAR. — «Beobachtungen und Untersuchungen über die Diffusion von Fluorescein am menschlichen und tierischen Auge.» Klin. Mbl. Augenheit. T. 102, p. 29-34, 1939.
40. KOLDEWIJN. — Arch. de Pharmacie. T. 248, p. 693, 1910.
41. LEFEVRE y DUBARRY. — Bull. Soc. Fr. Der. et Syp. p. 217, 1941, y Bull. Soc. Fr. Der. dt Syph. p. 365, 1942.
42. LORENS. — Actas Dermo-Sifiliográficas. T. 35, p. 930, 1944.
43. MAY. — Bull. Soc. Med. Hopitaux. 7 marzo 1941.
44. MENKE. — «The hemolytic action of photofluorescein.» Biol. Bull. (Trabajo del Inst. Carnegie Whas.), T. 68, p. 360-362, año 1935.
45. MERCADAL PEVRI. — Síntesis Médica, 1943-1944.
46. MERCADAL, DULANTO y PULIDO. — Actas Dermo-Sifiliográficas, T. 34, p. 308, 1943.
47. MILLIAN. — París. Med. p. 365, diciembre 1941.
48. MURAKAMI. — Okayama Igakkai Zasshi. T. 43, p. 1662-69, año 1931.
49. NOTORI HIROZO. — Citado en Berichte, T. 36, p. 108, 1926.
50. PFLÜGER. — Klinich. Monatsblatt f. Augenheilk. T. 20, p. 69, 1882.
51. REITZ. — Zentr. F. Back. u. Parasitenk. T. 45, p. 270, año 1908.
52. ROFFO y CALCAGNO. — Bol. Ins. med. exp. cáncer. Buenos Aires. T. 8, p. 595-96, 1932.
53. ROFFO y CALCAGNO. — Bol. Ins. med. exp. cáncer. Buenos Aires. T. 9, p. 69-86, 1932.
54. ROSENOW. — Zeitz. f. d. ges. exp. Med. T. 4, p. 247, año 1916.
55. ROST. — Arbaiten a. d. Kais. Gesund. T. 196, p. 40, 1912.
56. SALUS. — Citado por ROTKY en Zeit. f. klin. med. T. 75, p. 498, 1912.
57. SCHALTENBRAND, GEORG, TRACY PUTNAM. — Laboratory f. surg. research. Harvard. Citado en Berichte, T. 41, p. 239, año 1927.

58. STRAUB. — Zentralb. f. prak. Augenheilk. T. 12, p. 75, año 1888.
59. STRAUSS. — Berl. Klin. Wochs. p. 2226, 1913.
60. TAPPEINER y JOLDBAUER. — Citado por HEFFTER, «Handbuch der exp. Pharmakologie». T. 1, p. 1251.
61. TOURAINE. — Intervención a la comunicación de LEFEVRE y col. Loc. cit.
62. WELLINGS. — Faraday Soc. T. 28, p. 565-566, 1932.
63. WESTLI. — Archiv. f. Anatom. und Physiol. p. 527, 1903.
64. WESTLI. — Ergbe. d. Physiol. T. 4, p. 527, 1905.
65. WILLIAMS y BREWSTER. — A laboratory Manual of organic Chemistry, Nueva York, 1939.
66. WOLF. — Munch. Med. W'ssch. p. 2002, 1914.
67. ZARETZKY. — Archiv. f. patho. Anat. T. 75, p. 498, 1910