

Estudios sobre la acción antibiótica de las protaminas e histonas

III. Acción sobre las toxinas y enzimas. Poder protector "in vivo"

por P. Negroni e I. Fischer

En trabajos anteriores (1 y 2) nos hemos ocupado de la acción bacteriostática y bactericida del sulfato de protamina y de la histona extraída de los núcleos de los glóbulos rojos de pollo, así como de su mecanismo de acción.

En esta oportunidad expondremos el resultado de nuestras experiencias acerca de la acción de estas sustancias sobre ciertas toxinas y enzimas bacterianas, así como sobre el poder protector respecto a las infecciones experimentales en los animales de laboratorio.

A. — *Acción sobre las toxinas.* La mayoría de las toxinas fueron suministradas gentilmente por el Dr. R. Quiroga a quien expresamos nuestro sincero agradecimiento.

Utilizamos las siguientes toxinas: diftérica, tetánica, de *Clostridium septicus* y *welchii* y de *Staphylococcus aureus*. Un volumen de cada toxina, sin diluir, se mezcló con un volumen igual de la solución de sulfato de protamina al 0,4 %, observándose inmediatamente la formación de un precipitado.

La toxina así tratada fué empleada, después de haber permanecido 2 hs. a 37° y una noche en la heladera, diluyéndola, entonces, hasta la dosis mortal mínima para los animales correspondientes de laboratorio.

Resultados. — Tóxina diftérica: los cobayos de 250 gr. inoculados por vía subcutánea con una y dos dosis mortales mínimas de la toxina sin modificar y de la toxinaprotamina murieron en el mismo lapso de tiempo con síntomas de difteria.

El sulfato de protamina tampoco neutralizó la toxina tetánica ni la del *Cl. welchii*, inoculadas a ratones de 20 gr. de peso.

La toxina del *Cl. septicus* tratada por el sulfato de protamina, en la forma expuesta más arriba, inoculada en volumen de 2 ml. por vía intracardiaca a cobayos de 250 gr. provocó la muerte inmediata por "shock" anafilactoide.

Repitiendo las experiencias con la misma toxina adicionada de 1/2.500 y 1/6.250 de sulfato de protamina (la solución madre de protamina diluida al 1/10 y 1/25 respectivamente), pudimos comprobar que no modificaba su acción tóxica para el cobayo.

Toxina estafilococcica letal aguda para el conejo: utilizamos la cepa de *Staphylococcus* 209, comprobando que el sulfato de protamina no la neutraliza.

B. — *Acción sobre los factores preparatorio y reactivo de E. coli* del fenómeno de Sanarelli-Swartzman.

En estas experiencias utilizamos dos cepas de *E. coli* y el caldo utilizado en este Instituto para obtener la toxina diftérica, adicionado de mejoradores, llevado a un pH. 6,8, sembrado en forma tal que la *E. coli* desarrollara en amplia superficie y poca profundidad. Los filtrados obtenidos al cabo de 6 días de incubación a 37° fueron adicionados, una parte con diferentes proporciones de protamina y de histona y, otra parte, empleada sin tratamiento alguno.

La protamina o la histona adicionada en las proporciones de 1/1.250, 1/2.500, 1/3.750 y 1/5.000, *no neutralizan los factores preparatorio y reactivo de los filtrados de E. coli*. Las mezclas habían permanecido, como en las experiencias anteriores, 2 hs. a 37° y una noche en la heladera.

C. — *Acción sobre la estafilocoagulasa*. En estas experiencias utilizamos plasma citratado de conejo, diluido al 1/10 y cultivos de 24 hs. a 37° en caldo simple de la cepa 209 de *Staphylococcus aureus*. Colocamos en cada tubito 0,5 ml. del plasma diluido y 0,1 ml. del cultivo de estafilococo tratado o no por la solución de sulfato de protamina. En este último caso adicionamos al cultivo las siguientes proporciones de protamina 1/6.250, y doblando la dilución hasta 1/82.000, utilizando la mezcla inmediatamente o al cabo de 1, 2 y 3 hs. de permanencia en la estufa a 37° C.

Sus resultados están expuestos en el cuadro N° 1, que nos demuestra que *el sulfato de protamina en cierta concentración inhibe o retarda la acción de la estafilocoagulasa*.

D. — *Acción sobre la fibrinolisina del Streptococcus*. Empleamos la técnica ya expuesta en otro trabajo (3). El líquido sobrenadante de los cultivos de estreptococo (ensayamos dos cepas) provoca la disolución del coágulo al cabo de una hora de incubación en el bañomaria a 37°, en tanto que el mismo líquido adicionado de 1/1.250 de sulfato de protamina utilizado después de una hora de contacto a 37° permite la coagulación del plasma.

El sulfato de protamina inhibe pues la fibrinolisina del estreptococo.

E. — *Poder protector en la infección experimental* de los ratones con neumococo. En nuestras primeras series de experiencias tomamos lotes de 8 y 10 ratones de unos 20 grs. de peso inoculados por vía peritoneal con cultivo de 24 hs. de neumococo tipo III en caldo con 10 % de suero de conejo, diluido al 1/10.000, dosis límite que mataba a todos los ratones en 48 hs.

Las experiencias fueron dispuestas en la forma siguiente: 1) Un lote de ratones inoculado con una dosis m.m. 2) Un lote con 10 dosis m.m. 3) un lote inoculado con 100 dosis m.m. 4) lotes similares a los tres anteriores inoculados diariamente con 4 diez miligramos de sulfato de protamina por vía subcutánea, comenzando la víspera de la inyección de neumococo virulento. 5) lotes similares a los tres primeros inoculados simultáneamente y, luego, una vez por día hasta la muerte de los animales con 4 diez miligramos de protamina. 6) lotes similares a los tres primeros inyectados con protamina 1 hora después de la inoculación intraperitoneal de neumococo virulento y 7) igual que los anteriores, pero inyectados con la solución de protamina 3 hs. después de la inoculación de neumococo.

Los resultados sólo ofrecieron cierta constancia en los animales inoculados con 1 y 10 dosis m.m. y tratados con protamina 1) a partir de la víspera, 2) simultáneamente con la inyección de neumococo y 3) los lotes tratados 1 hora después.

Pensando que la inoculación del neumococo por vía intraperitoneal fuera demasiado violenta para poder apreciar los resultados de la acción protectora del sulfato de protamina, inoculamos 2 lotes de 10 ratones cada uno por vía subcutánea con material de un cultivo de 20 hs. convenientemente diluido. Uno de los lotes fué tratado por vía subcutánea, desde 24 hs. antes, con 0,0004 gr. de sulfato de protamina, renovando esta inyección diariamente hasta el final de la experiencia.

Resultado: Al cabo de tres días sobrevivían tres ratones en el lote no tratado por la protamina y seis en el lote tratado. Podemos, pues, decir que *el sulfato de protamina posee cierta acción protectora en la infección experimental de los ratones con neumococo virulento.*

F. — *Acción en las infecciones focales.* — Hemos inoculado varios conejos por vía intracorneal siguiendo la técnica descrita por Robson y Scott (4) y utilizando el *Staphylococcus aureus* 209. La solución de sulfato de protamina al 0,5 % fué instilada dos veces por día, únicamente: 1) inmediatamente después de la inoculación del estafilococo, 2) tres horas después y 3) 24 hs. después cuando ya se había producido una ulceración en la córnea.

Aunque el número de nuestras experiencias fué pequeño, tenemos la impresión de que la solución de protamina al 0,5 %, aplicada localmente, tiene una acción protectora y curativa en la infección de la córnea producida por el estafilococo dorado.

G. — *Inoculación del sulfato de protamina a ratones y cobayos*: Como un complemento de las investigaciones ya expuestas, diremos que los ratones de 18 a 20 grs. de peso, empleados por nosotros, resisten la inoculación diaria de 3 mg. de sulfato de protamina por cualquier vía, durante varios días (4 a 6) y los cobayos de 250 gr., más o menos, de peso, la de 4 mg. por vía subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; por vía intracardiaca les produce, en cambio, un shock anafilactoide mortal.

H. — *Acción sobre ciertas células animales*.

Los espermatozoides de rata suspendidos en una solución de protamina al 0,4 % entre porta y cubre objeto mantuvieron sus movimientos durante 10 minutos, que fué el término de la observación.

Suspendiendo material de un cultivo de *Leishmania brasiliensis* en una solución de protamina al 0,2 % pudimos comprobar que estas se aglutinaban inmediatamente y perdían su movimiento; ejerciendo la misma acción sobre ciertos ciliados del agua dulce.

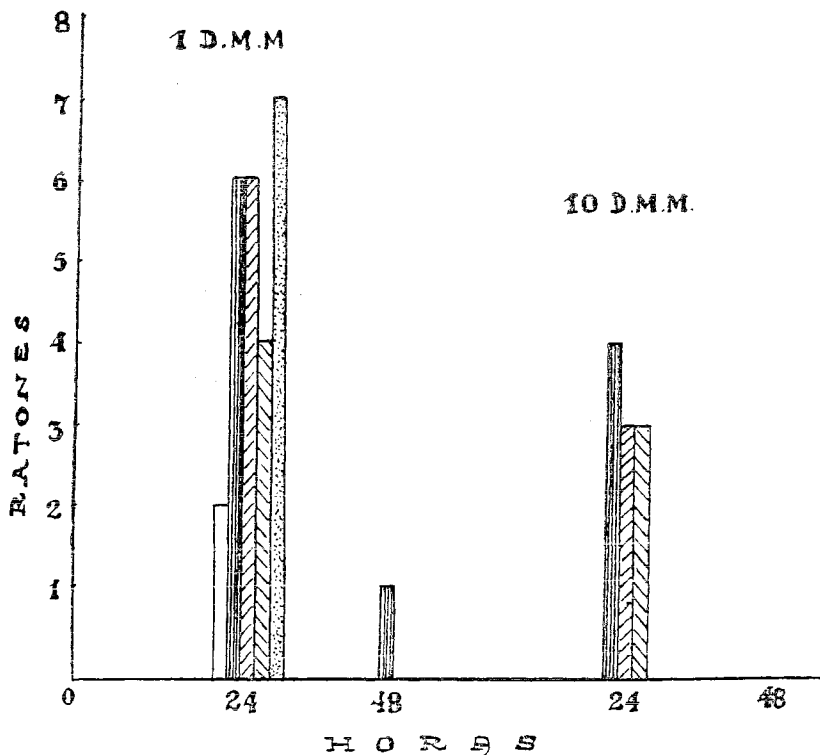
La Vahlkampfia debilis (Amoeba de tipo Limax) resisten, en cambio, la acción de una solución al 0,4 % tanto de sulfato de protamina como de histona, durante 24 hs. que fué el término de nuestra observación. La amoeba mantiene sus movimientos y se multiplica normalmente.





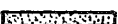
Sobre la biología de esta Amoeba ya hemos escrito en el año 1941 (5); solamente diremos ahora que esta propiedad de resistir la acción antibiótica de la protamina y de la histona se manifiesta tanto en los cultivos con *E. coli* como con *Pichia belgica* como elementos de nutrición.

CUADRO N.º 1

Plasma de conejo al 1/10	Cultivo en caldo <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> protamina	Resultados	<i>S. aureus</i> protamina 3 hs. 37°	Resultados
0,50 ml.	0,10 ml.	—	+++ 28°		
0,50		1/6.250	± 42'	1/6.250	± 75'
0,50		1/12.500	íd.	1/12.500	íd.
0,50		1/25.000	++ 40'	1/25.000	++ 40'
0,50		1/50.000	++ 35'	1/50.000	++
0,50		1/100.000	+++ 32'	1/100.000	+++
0,50		1/200.000	+++ 28'	1/200.000	+++

Explicación: Las cruces indican la intensidad de la coagulación. El cultivo en caldo del *S. aureus* control fué diluído con un volumen de sol. fisiológica y colocado en las mismas condiciones que el tratado con protamina.



Explicación:  N° de sobrevivientes no tratados con protamina.
 N° de sobrevivientes tratados 24 hs. antes.
 N° de sobrevivientes tratados simultáneamente.
 N° de sobrevivientes tratados 1 h. después.
 N° de sobrevivientes tratados 3 hs. después.

RESUMEN

El sulfato de protamina no neutraliza "in vitro" la toxina diftérica, tetánica, de los *Clostridium septicus*, *welchii*, ni la letal aguda del estafilococo dorado.

Ni la protamina ni la histona neutralizan en las condiciones experimentadas "in vitro", los factores preparatorio y reactivo de *Escherichia coli* en el fenómeno de Sanarelli-Swartzman.

El sulfato de protamina inhibe la estafilocagulasa y la fibrinolisis del estreptococo. Esta sustancia posee, también, cierta acción protectora en las infecciones experimentales con neumococo y estafilococo.

El sulfato de protamina a la dosis diaria de 3 mg. para el ratón y de 4 mg. para el cobayo es inocua, salvo cuando se la

inyecta por vía intracardiaca en este último animal, en el que produce, entonces, un shock mortal.

El sulfato de protamina y la histona no actúan sobre los espermatozoides de rata, siendo, en cambio, sensibles a su acción *Leishmania brasiliensis* y ciertos ciliados del agua dulce.

R E S U M É

Le sulfate de protamine ne neutralise pas "in vitro" les toxines diphtérique, tétanique, des *Clostridium* de la gangrène gazeuse et la toxine léthal aigüe du staphylocoque.

La protamine et l'histone manquent du pouvoir de neutraliser les facteurs préparatoire et réactif des filtrats de *E. coli* pour le phénomène de Sanarelli-Swartzman.

La protamine inhibe la staphylocoagulase et la fibrinolysine du streptocoque. Elle possède une certaine action protectrice dans les infections expérimentales avec le pneumocoque et le staphylocoque.

La *Vahlkampfia debilis* (Amoëbe du type Limax) et les spermatozoides de rat résistent à l'action antibiotique de la protamine et de l'histone. La *Leishmania brasiliensis* et certains ciliés de l'eau douce sont, au contraire, sensibles.

S U M M A R Y

Protamine sulphate does not neutralize "in vitro" the following toxins: diphtheriae, tetanus, *Cl. septicus, welchii*, and the acute lethal toxin of the *Staphylococcus aureus*.

Protamine and histone do not neutralize preparatory and reactive factors of *E. coli* cultures for the Sanarelli-Swartzman phenomenon.

Protamine sulphate inhibits the staphylocoagulase and the fibrinolys of the streptococcus and possesses some protectrix action in the experimental infections of the laboratory animals with pneumococcus and staphylococcus.

Vahlkampfia debilis (Amoeba of the Lyman type) and rat's spermatozoa withstand protamine and histone antibiotic action; *Leishmania brasiliensis* and water infusoria are sensitive.

BIBLIOGRAFÍA

1. NEGRONI, P. y FISCHER. — I. Rev. Soc. Arg. Biol., **20**, 1944, 307.
2. NEGRONI, P. y FISCHER. — I. Rev. Soc. Arg. Biol., **20**, 1944, 487.
3. NEGRONI, P. y BRIZ DE NEGRONI. — C. Rev. Arg. Dermatosisif., **23**, 1939, 234.
4. ROBSON, J. M. y SCOTT. — G. I. Lancet, **1**, 1943, 100.
5. NEGRONI, P. y FISCHER. — I. Rev. Inst. Bact., **10**, 1941, 66.