Sobre la acción antibiótica de la protamina e histona.

por Pablo Negroni e Ida Fischer

Recordaremos que las protaminas e histonas pertenecen a los albuminoides sencillos, cuyo punto iso-eléctrico se encuentra en el lado básico y que por hidrólisis proporcionan únicamente aminoácidos.

Los testículos de ciertas especies de peces son particularmente ricos en protaminas, agrupadas por Thompson ([1]) en: 1) *salmina* extraída de los testículos maduros del salmón, *clupeina* de los testículos de arenques; 2) *escombrina* obtenida del marqueril; 3) *esturina* del esturión y *ciclopterina* contenida en el esperma de Cyclopterus lumpus. Según Wladschmidt-Leitz la clupeina contiene 15 aminoácidos (figurando la arginina con 10 moléculas) y la salmina contiene 14 moléculas de este aminoácido.

Mc Clean ([2]), que se distinguió por sus estudios sobre el factor D-R de difusión extraído de los testículos de mamíferos, ensayó en 1930 la acción difusora en la piel del conejo del sulfato de clupeina, la esturina e histona de timo, utilizando como indicador el virus vaccínico y comprobó que la protamina aumenta, en forma comparable al extracto testicular, la permeabilidad dérmica. Pero al mismo tiempo advirtió, con sorpresa, que a la dosis de 0,04 mg. inhibe completamente al virus vaccínico sin producir difusión definida en la piel. La histona de timo no produjo difusión, pero sí una inhibición marcada sobre el desarrollo del virus vaccínico.

El mismo autor ([3]) demostró al año siguiente que el sulfato de clupeina inhibe también "in vitro" el desarrollo del Bacillus typhosus a la dilución del 1|10.000 y parcialmente al 1|100.000. Los subcultivos efectuados 24 hs. después le permitieron comprobar que este microorganismo estaba aún con vida, pero fueron negativos al cabo de 96 hs. El extracto testicular adicionado en la proporción del 10 % a los medios de cultivo, permitió, en cambio, el desarrollo de las bacterias.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 18 de julio de 1944.

El descubrimiento de Mc Clean permaneció, sin embargo, en la oscuridad hasta 1942, cuando Miller y sus colaboradores ([4]) estudiaron ciertas propiedades antibacterianas de las protaminas e histona. Estos investigadores comprobaron que el sulfato de protamina inhibe manifiestamente la respiración de *Escherichia coli* a un pH 7 o algo por encima, pero cuando se lo mezcla con la tirotricina es activo a un pH 5,3 y se nota un aumento del poder inhibidor que poseen cada una de estas substancias aisladamente.

Miller y sus colaboradores observaron que el sulfato de salmina inhibe el metabolismo anaerobio de numerosas bacterias gram negativas del grupo colitifo-disentérico; la *Neisseria catarrhalis* sería poco sensible e insensible el *Proteus vulgaris*. Una concentración de 1|24.000 a un pH 8.1 inhibe el desarrollo del *Clostridium histolyticum*, al 1|15.000 el de bacilos esporulados del grupo *subtilis* y al 1|3.000 parcialmente al *Staphylococcus aureus y totalmente* al *albus*. Según estos autores la presencia de sangre, suero o caldo reduce las propiedades antibacterianas de las protaminas e histonas.

La histona de timo sería más activa a un pH ácido, pero carece de acción bacteriostática sobre las bacterias gram negativas del grupo coli-tifo-disentérico.

Relacionadas con la acción antibiótica de las substancias que acabamos de mencionar, recordaremos que Fleming en 1922 descubrió que la piel, saliva, lágrimas y muchos otros tejidos, tanto animales como vegetales, contienen una enzima, la *lisozima*, capaz de disolver a ciertas bacterias. Desde hace tiempo se sabe que la harina de trigo contiene una proteína tóxica para las levaduras y ciertas bacterias lácticas y de la fracción albuminosa de la leche se obtuvo la *lactenina* muy activa contra los estreptococos (Dubos) ([5]).

La similitud de la estructura química de las protaminas, histonas, tirotricina (obtenida de los cultivos del Bact. brevis) y la proteína de trigo, parece indicar para Dubos, Hotchkiss y Miller y sus colaboradores que los polipéptidos simples son antibacterianos. Según Annau y Augustin (6) la acción tóxica de las protaminas e histonas, semejante en ciertos aspectos a la de los detergentes catiónicos, sería debido a la presencia de arginina en combinación péptida.

Hace un par de meses ensayando la influencia de la fuente nitrogenada sobre la producción de penicilina por el *Penicillium notatum*, sembramos esporos de este hongo en caldo conteniendo 1 por mil de sulfato de protamina (de salmón) gentilmente cedido por el Dr. O. Repetto, a quien estamos por ello muy agradecidos, y comprobamos que el P. *notatum* no se desarrolla, a pesar de haber repetido la siembra. Fué este el punto de partida de nuestras investigaciones. La revisión bibliográfica expuesta nos indica que se trata de un grupo de substancias cuya acción biológica ha sido aún poco explorada, ofreciendo un amplio campo de estudio lleno de posibilidades futuras.

EXPERIENCIAS PERSONALES

Utilizamos el sulfato de protamina y la histona extraída de los núcleos de los glóbulos rojos de pollo por el Dr. S. Lajmanovich, a quien mucho agradecemos su obsequio. Para la uniformidad de los resultados estas substancias fueron disueltas en una mezcla de fosfatos "buffer" pH 7 (0,10 gr. en 25 ml.) y filtradas por Seitz esterilizante.

Como material de siembra utilizamos cultivos en caldo de 24 hs. a 37° C. de estafilococos, estreptococos y bacterias gram negativas del grupo coli-tifodisentérico y *Proteus;* cultivos, en caldo lactosado al 05 %, de bacterias lácticas y en agar blando glucosado al 1 % de las bacterias y *Actinomyces* anaerobios o microaerófilos. Este material fué sembrado en la proporción de 0,1 ml. para 10 ml. de caldo, repartido en tubos de ensayo. Adicionamos la protamina e histona en las proporciones que figuran en los protocolos. De cada germen se dejó un tubo testigo sin antibiótico y las lecturas se efectuaron al cabo de 24 hs., 48 hs. y 5 días, según el tiempo requerido por los tubos testigos para presentar un desarrollo evidente.

Como puede apreciarse por los resultados expuestos, la protamina tiene una marcada acción inhibidora del desarrollo de las bacterias lácticas y del estafilococo. Sobre las primeras actúa en concentraciones superiores a 1 en 1 millón. Las bacterias no mueren sin embargo al cabo de 24 hs. puesto que el transplante de una pequeña porción del cultivo inhibido, a un medio nuevo, origina su desarrollo exuberante.

La acción inhibidora sobre el desarrollo de los *Clostridios* de la gangrena gaseosa, del tétano y los *Actinomyces* microaerófilos es poco marcada y falta para la mayoría de las bacterias gram negativas. El bacilo paratífico A es sensible hasta el 1|50.000 de la dilución de sulfato de protamina y los bacilos de Eberth y Flexner son inhibidos completamente con la dilución 1|25.000 y parcialmente con la de 1|50.000.

La histona se ha revelado, según nuestras experiencias, de escasa acción inhibidora, siendo influenciadas, por orden de sensibilidad las siguientes bacterias: *Staphylococcus albus, St. aureus y Lactobacillus.*

Según Miller y sus colaboradores los fosfolípidos inhiben la acción de la gramicidina y la falta de poder antibiótico de esta substancia frente a las bacterias gram negativas se debería, posiblemente, a los fosfolípidos de las mismas. Como el sulfato de protamina tiene la propiedad de precipitar a la cefalina, nos propusimos investigar, en otra serie de experiencias, si la protamina es capaz de modificar la sensibilidad de ciertas bacterias a la penicilina.

Partimos de una mezcla de volúmenes iguales de sulfato de protamina al 4 por mil y de penicilina bruta (30 unidades Oxford por ml.) efectuando las diluciones en progresión geométrica en tubos con caldo sembrado con las bacterias correspondientes.

Substancias y microrganismos			
	1/12.500	1/25.000	1/50.000
Prolamina			
Staph. aureus (209)	0	0	0
« albus (54)	0	0	0
Strept. pyogenes de intertrigo	0	0	0
Strept. fecalis	0	0	0
« verde de la piel ..	0	0	0
« thermophilus	0	0	0
Lactob. acidophilus	0	0	0
« helveticus	0	0	0
Clostridium histolyticum .	±	+	+
« perfringens ..	0	+	+
« septicum	+	+	+
« tetani	±	±	+
Act. israeli 126	+	+	+
« « 180	+	+	+
« discofoliatus	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+
Escherichia coli	+	+	+
S. paratyphi A	0	0	0
« « B	0	+	+
Eberthella typhosa	0	0	±
S. paradysenteriae	0	0	±
« stanley	+	+	+

Diluciones					Observaciones
1/100.000	1/200.000	1/400.000	1/800.000	Test.	
0	±	+		+	24 hs. 37°C
0	0	0		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
0	0	+		+	íd.
0	0	0		+	íd.
0	0	0		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	48 hs. 37°C
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	5 días 37°C
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	24 hs. 37°C
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.
+	+	+		+	íd.

Substancias y microrganismos	Dilu c			
	1/12.000	1/25.000	1/50.000	1/100.000
Histona				
Staph. aureus (209)	0	0	±	±
» albus (54)	0	0	0	+
Strept. pyogenes de intertrigo	+	+	+	+
Strept. fecalis	+	+	+	+
» verde de la piel ..	+	+	+	+
« thermophilus . ..	0	0	±	+
Lactob. acidophilus	0	0	±	+
« helveticum				
Clostridium histolyticum .	+	++	++	++
« perfringens ..	+	+	+	+
« septicum ...	+	+	+	+
« tetani	+	+	+	+
Act. israeli 126	+	+	+	+
« « 180	+	+	+	+
« discofoliatus	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+
Escherichia coli	+	+	+	+
S. paratyphi A	+	+	+	+
« « B	+	+	+	+
Eberthella typhosa	+	+	+	+
S. paradysenteriae	+	+	+	+
» stanley	+	+	+	+

iones				Observaciones
1/200.000	1/400.000	1/800.000	Test.	
+	+		+	24 hs. 37°C
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+ +	+ +		+ +	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	48 hs. 37°
+	+		+	íd.
+	+		+	5 días 37°C
+	+		+	íd.
+	+		+	íd
+	+		+	24 hs. 37°C
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	id.

Substancias y microrganismos	Diluc			
Penicilina	1/50	1/100	1/200	1/400
Staph. aureus (209)	0	0	0	0
« albus (54)				
Strept. pyogenes de intertrigo	+	+	+	+
Strept. fecalis	+	+	+	+
« verde de la piel	+	+	+	+
« thermophilus	+	+	+	+
Lactob. acidophilus	+	+	+	+
« helveticum	+	+	+	+
Clostridium histolyticum	0	+	+	+
« perfringens	0	0	+	+
« septicum	0	0	0	0
« tetani	0	0	0	±
Act. israeli 126	0	0	+	+
« « 180	0	0	0	+
« discofoliatus	0	±	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+
Escherichia coli	+	+	+	+
S. paratyphi A	+	+	+	+
« « B	+	+	+	+
Eberthella typhosa	+	+	+	+
S. paradysenteriae	+	+	+	+
« stanley	+	+	+	+

ione				Observaciones
1/800	1/1.600	1/3.200	Test.	
+	+		+	24 hs. 37°C
				íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	48 hs. 37°C
+	+		+	24 hs. »
+	+		+	48 hs. »
+	+		+	48 hs. »
+	+		+	5 días »
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	24 hs. 37°C
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.
+	+		+	íd.

Substancias y microrganismos	Diluciones									Observaciones
	1/12.500	1/25.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	1/800.000	1/600.000	Test.	
Penicilina más protamina ...	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400		
Staph. aureus (209)	0	0	0	±	+	++			+	24 hs. 37°C
« albus (54)										
Strept. pyogenes de intertrigo										
Strept. fecalis										
« verde de la piel ..										
« thermophilus	0	±	±	+	+	+			+	24 hs. 37°C
Lactob. acidophilus	0	0	0	0	0	0	0	0	+	íd.
« helveticum	0	+	+	+	+	+	+		+	48 hs. 37°C
Clostridium histolyticum .										
« perfringens ..										
« septicum										
« tetani										
Act. israeli 126										
« « 180										
« discofoliatus										
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+			+	24 hs. 37°C
Escherichia coli	+	+	+	+	+	+			+	íd.
S. paratyphi A	+	+	+	+	+	+			+	íd.
« « B	+	+	+	+	+	+			+	íd.
Eberthella typhosa	+	+	+	+	+	+			+	íd.
S. paradysenteriae	+	+	+	+	+	+			+	íd.
« stanley	+	+	+	+	+	+			+	íd.

Explicaciones: La primera serie de diluciones corresponde a la protamina y la inferior a la penicilina (título = 30 Unidades Oxford por ml.). El signo ± indica desarrollo escaso, + bueno y 0 ausencia de desarrollo.

Substancias y microrganismos	Diluciones									Observaciones
	1/12.500	1/25.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	1/800.000	1/1.600.000	Test.	
Histona más penicilina	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400		
Staph. aureus (209)	0	0	±	±	+	+			+	24 hs. 37°C
« albus (54)										íd.
Strept. pyogenes de intertrigo										íd.
Strept. fecalis										íd.
« verde de la piel ..										íd.
« thermophilus	+	+	+	+	+	+			+	íd.
Lactobacillus acidophilus .	0	0	+	+	+	+	+	+	+	íd.
« helveticum ..	+	+	+	+	+	+			+	48 hs. 37°C
Clostridium histolyticum .										48 hs. 37°C
« perfringens ..										48 hs. 37°C
« septicum										íd.
« tetani										
Act. israeli 126										5 días 37°C
« « 180										íd.
« discofoliatus										íd.
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+				+	24 hs. 37°C
Escherichia coli	+	+	+	+	+				+	íd.
S. paratyphi A	+	+	+	+	+				+	íd.
« « B	+	+	+	+	+				+	íd.
Eberthella typhosa	+	+	+	+	+				+	íd.
S. paradysenteriae	+	+	+	+	+				+	íd.
« stanley	+	+	+	+	+				+	íd.

Explicación: La primera serie de diluciones corresponde a la histona y la serie inferior a la penicilina.

Habiendo notado que la protamina precipita inmediatamente al líquido con penicilina bruta efectuamos otras experiencias tratando durante dos horas a 37° C. y también dos horas a esa temperatura y a continuación 22 hs. a temperatura ambiente, una suspensión de bacterias en diferentes diluciones de sulfato de protamina en la mezcla de fosfatos buffer pH 7. Al cabo de ese tiempo lavamos dos veces con solución fisiológica y vertimos en el sedimento caldo con diferentes concentraciones de penicilina, llevando los tubos a la estufa a 37° C. Los resultados obtenidos han sido los mismos, tanto empleando la mezcla simultánea de protamina-penicilina como sometiendo las bacterias a la acción sucesiva de estos dos productos.

Los estudios realizados hasta el presente nos indican que la protamina no modifica la sensibilidad de las bacterias frente a la penicilina, pudiendo por el contrario, reducirla. La protamina mezclada con la penicilina pierde algo de su actividad para determinadas bacterias (ver protocolos), debido, posiblemente, a la formación de un precipitado.

La mezcla de histona y penicilina origina también un precipitado y no modifican sus respectivas influencias sobre las bacterias ensayadas, salvo una reducción de la actividad de la penicilina sobre el *Staphylococcus aureus*.

CONSIDERACIONES

El sulfato de protamina posee una marcada acción bacteriostática sobre el estafilococo y ciertas bacterias lácticas y algo menor sobre el bacilo de Eberth, el paratifico B y el bacilo de Flexner. Según Miller y sus colaboradores y Reinier, Beer y Green ([7]) estas substancias actuarían inhibiendo la respiración bacteriana. La histona tiene una acción bacteriostática bastante menos marcada. Es posible que habiendo incorporado estas substancias al caldo, sus actividades hayan sido reducidas.

Por el momento es difícil pronunciarse sobre la posibilidad del empleo terapéutico de las protaminas e histonas, dado que según la experiencia de muchos autores la inyección por vía parenteral a los animales de laboratorio, provoca síntomas tóxicos con el cuadro de un shock anafilactoide y la muerte si la dosis inyectada ha sido grande.

Thompson ([1]) fué uno de los primeros investigadores que se ocupó de la acción fisiológica de las protaminas e histonas. Inoculando por vía venosa al perro anestesiado cloruro de protamina en solución al 1 %, notó una caída inmediata de la presión arterial y la muerte con dosis mayores. Para un perro de 10 Kg. de peso, 15-18 ctgs. de clupeina y 20-25 ctgs. de esturina representan dosis mortales. Cuando la dosis es menor, 25 a 30 minutos después de la caída inicial de la presión arterial, se produce su ascenso a los límites normales. Thompson notó una mayor tolerancia a una segunda inyec-

ción de protamina efectuada cuando el animal se hubo repuesto de los efectos de la primera. No solamente tiene lugar una caida de la presión arterial, sino, también, alteraciones respiratorias por acción tóxica sobre los centros nerviosos y sobre los músculos (inclusive sobre el corazón).

Kossel y Thompson observaron que la protamina retarda enormemente la coagulación sanguínea y produce una leucopenia, alcanzando el número de lencocitos un título mayor que el normal 3/4 de hora después de la inyección. Las protaminas no dañan, según Thompson, a los leucocitos tanto "in vitro' como "in vivo".

La esturina sería menos tóxica que la clupeina, salmina y escombrina.

La protamina hidrolizada pierde su acción tóxica. Los resultados de los estudios de Thompson fueron confirmados por Japelli (8) en 1933.

La histona posee una acción tóxica similar a la de la protamina (Thompson, Annau y Agustin).

Según Jorpes, Edman y Thaniig (9) el conejo tolera 10 a 50 mg. por kilo de sulfato de clupeina y el perro de 2 a 10 mg., pero estos investigadores disolvieron esa sal en HCl a un pH 2.7 y la esterilizaron en el autoclave, siendo muy probable que en esas condiciones haya sufrido un principio de hidrólisis. El sulfato de clupeina tiene la propiedad de neutralizar a la heparina.

Walter y Ammon (10) obtuvieron la producción de un shock anafiláctico en el cavia inoculado con protamina, pero Shelley y sus colaboradores niegan que este fenómeno pueda tener lugar.

Vartiainen y Marble (11) determinaron la dosis letal media, para ratones y conejos de la protamina, y comprobaron que era de 200 a 300 mg. por kilo, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Reinier, Beer y Green (7) quienes encontraron un valor de LD 50=94mg. por kilo de ratón para la protamina y de 255 mg. para la histona. Estos últimos investigadores estudiaron también la acción tóxica de la globina y establecieron la siguiente escala la toxicidad: protamina > histona > globina.

Por los datos expuestos sería posible emplear la protaminas localmente y tal vez por vía parenteral hasta 2 a 3 grs. para un adulto de 65 a 70 kg. de peso.

Shelley, Hodgkins y Visscher ([12]) observaron que la protamina enturbia "in vitro" al suero, precipita al plasma y aglutina a los hematies de hombre, perro, gato y rata. Los animales más sensibles a la acción tóxica de las protaminas serían aquellos cuyos hematies son aglutinados.

SUMMARY.

Protamine sulphate incorporated to culture media, has a strong inhibitory action on lactic bacteria and *Stapylococcus* and less marked on *B. paratyphosus* A, *B. typhosus* and *Flexner*. Other gram negative bacteria, the anaerobic bacteria (B. tetani, and gas gangrene bacilli) and the microaerophilic *Actinomyces*, are more tolerant.

Histone fron nuclea of chick erythrocyctes has a slight antibiotic property.

The simultaneous or succesive action of protamine and penicillin and of histone and penicillin does not modify the susceptibility of different bacteria either to protamine, histone or penicillin, reducing sometimes their action by the formation of a precipitate.

BIBLIOGRAFÍA

1. THOMPSON, W. H. — Die physiologische Wirkung der Protamine und ihre Spaltungprodukte. Hopp-Seylers' Zeitschr. f. Physiol. Chemie, **29**, 1900, H. 1, 1-19.
2. McCLEAN, *D.* — The influence of testicular extract on dermal permeability and the response to vaccine virus. The J. of Path. **33** (2) 1930, 1645-1670.
3. — Further observations on testicular extract and its effect upon tissue permeability. The J. of Pathol. and Bact., **34** (2), 1931, 459-470.
4. MILLER, B. F., ABRAMS, R., DORFMAN, A. y MORTON, K. — Antibacterial properties of protamine and histone. Science, **96**, 2497, 428-430. **124**, 1944, 10, 633.
5. DUBOS, R. — Antimicrobial agents of biological origin. J. Amer. Med. Ass., **124**, 1944, 10, 633.
6. ANNAU, E. y AUGUSTIN, V. — Pharmakologie der Histone. I. Mitt., Arch. f. Exper. Pathol. u. Pharmakol., **161**, 1931, 337-343.
7. REINIER, L. DE BEER, E. J. y MILTON GREEN. — Toxic effect of some basic proteins. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., **50**, 1942, 1. 70-74.
8. JAPELLI, A. DE. — Sull'azione fisiologica di un solfato de protamina. Boll. Soc. Ital. Biol. Experim. **8**, 1933, 788-782.
9. JORPES, E., EDMAN, P. y THANNIG, T. — Neutralization of action of heparin by protamine. The Lancet, **237**, 1939, 975.
10. WALTER, G. UND AMMON, R. — Anaphylaktischer schock nach Protamin. Kl. Wochens. 18 Jahrg., 1939, 8, 287.
11. VARTIAINEN, I. y MARBLE. A. — The effect of subcutaneous administration of protamine (salmine) to rabbits and mice. The J. Labor. and Clin. Med., **26** (1), 1941, 1416.
12. SHELLEY, W. B., HODGKINS, M. P. y VISSCHER, M. B. — Studies on the toxicity of protamine. Proc. Soc. Expr. Biol. & Med., **50**, 1942, 300-304.