Estudios sobre la acción antibiótica de las protaminas e histonas

II. Modo de Acción.

por P. Negroni e I. Fischer.

En un trabajo anterior [1]) comunicamos nuestros estudios sobre la acción bacteriostática y bactericida del sulfato de protamina y de la histona obtenida de los núcleos de hematies de pollo, sobre diferentes bacterias gram positivas aerobias y anaerobias y sobre bacterias gram negativas. En esta oportunidad exponemos el resultado de nuestras investigaciones tendientes a aclarar el mecanismo de acción de estos antibióticos, para lo cual estudiamos la influencia de la concentración bacteriana, de la edad del cultivo, del tiempo de contacto, de la composición del medio de cultivo utilizado, así como la de diversas substancias adicionadas como ser: extractos bacterianos, fosfatidos, colesterina, urea, guanidina, plasma y hematies. Expondremos sucesivamente cada una de estas experiencias y el concepto final sobre su mecanismo de acción.

1) *Influencia de la concentración bacteriana* (de la cantidad de siembra).

Las siembras, como las experiencias que a continuación se detallarán, fueron efectuadas con la cepa sensible de estafilococo blanco (nº 54) y con una cepa de *Lactobacillus acidophilus* (nº 83). Las soluciones madres de sulfato de protamina e histona fueron hechas en la mezcla de fosfato buffer pH. 7 al 0,4 % y esterilizadas por filtración por Seitz.

En estas experiencias utilizamos cultivos de estafilococo nº 54 de 24 horas, a 37°C en caldo simple, cuyo título, por opacidimetría, arrojó un valor aproximado de 21.000 millones de cocos por ml. Se sembraron lotes de 20 ml. de caldo, con 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 ml. de cultivo y, después de mezclarlos cuidadosamente, se repartieron en tubos en volumen adecuado, para efectuar luego las correspondientes diluciones de las soluciones madres de protamina o de histona. El

Presentado en la reunión de comunicaciones del 17 de octubre de 1944.

CUADRO N.° 1

Bacteria: *Staph albus* N.° 54.

Diluciones de protamina		1/6.250	1/12.500	1/25.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	Control
Cantidad de siembra	0,1	0	0	0	0	0	0	±	++
	0,2	0	0	0	0	0	±	±	
	0,4	0	0	0	0	0	±	+	
	0,8	0	0	0	0	0	+	++	

CUADRO N.° 2

Bacteria: *Staph albus* N.° 54.

Diluciones de protamina		1/12.500	1/25.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	Control
Edad del cultivo:	4 hs.	0	0	0	0	±	+	+
	15 hs.	0	0	0	0	+	+	+
	48 hs.	0	0	0	+	+	+	+

CUADRO N.° 3

Bacteria: *Staph. albus* N.° 54.

		Recuento inmediato (15 minutos)				Recuento a las 3 hs. a 37° C.		
Edad: 6.30 hs.								
Concentración de protamina 1/25.000		21 colonias				2 colonias		
Control		108 »				560 »		
Edad: 15 hs.	Rec. inmediato	2 hs.	5 hs.	8 hs.	11 hs.	14 hs.	24 hs.	33 hs
Protamnia: 1/25.000	> 200 col.	0	0	0	0	0	0	0
« 1/100.000	> 200 col.	0	0	0	2	0	1	2
Testigo	> 200 col.	65	195	> 200	∞	∞	∞	∞

CUADRO N.° 4

Solución de protamina al 1/1.250 tratada 1 a 3 veces durante 1 h. a 37° con sedimentos de cultivos de *Staphylococcus albus* y tituiada luego con este germen.

Dilución de protamina	1/12.500	1/25.000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	1/800.000	Testigo
Testigo (lectura a las 17 hs a 37°)	0	0	0	0	0	0	0	+
absorbida 1 vez	0	0	0	0	0	0	+	
« 2 veces	0	0	0	+	+	+	+	
« 3 veces	+	+	+	+	+	+	+	

CUADRO N.° 5

Bacteria: *Lact. acidophilus*

Diluciones de protamina	1/6.250	1/12.500	1/25 000	1/50.000	1/100.000	1/200.000	1/400.000	1/800.000	Testigo
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	+	+
+ e. alc. acid. ..	0	0	0	0	0	0	+	+	
+ resid. acid. ...	0	0	0	0	0	+	+	+	
+ e. alc. proteus.	0	0	0	0	+	+	+	+	
+ resid. proteus .	0	0	0	0	0	+	+	+	
+ e. alc. Staph..	0	0	0	+	+	+	+	+	
+ resid. Staph. .	0	0	0	0	+	+	+	+	

Explicaciones: e. alc. acid. = extracto alcohólico de acidophilus, resid. = residuo, Staph. Staphylococcus.

volumen final en cada tubo fué de 2 ml. de caldo sembrado con la correspondiente dilución de protamina o histona. Siempre hemos dejado un tubo testigo sin antibiótico. Las experiencias se repitieron varias veces antes de considerar sus resultados como definitivos, y las lecturas se efectuaron al cabo de 24 horas de incubación a 37°C para el estafilococo, y de 48 horas para el *Lact. acidophilus.*

En el cuadro n° 1 figura un ejemplo de los resultados obtenidos, donde puede apreciarse que *la acción antibiótica se reduce proporcionalmente a la cantidad de siembra.*

2) *Influencia de la edad del cultivo.*

En estas experiencias utilizamos un cultivo de estafilococo blanco n° 54 en caldo simple de 4, 15 y 48 horas, de incubación a 37°, sembrando 0,1 ml. para lotes de 10 ml. de caldo, igualando previamente la opacidad de todas las semillas; vale decir tomando al cultivo de 4 hs. como patrón .

El resultado de esta segunda serie de experiencias queda traducido en el cuadro n° II, donde vemos que *el aumento de la edad del cultivo utilizado como semilla reduce en forma proporcional la acción de estos antibióticos* (por lo menos hasta las 48 hs.).

3) *Influencia del tiempo de contacto.*

Utilizamos en estas experiencias cultivos del estafilococo n° 54 en caldo de 6,30 hs. de 15 y de 24 hs. de incubación a 37°C diluído en forma tal que la siembra de 0,1 ml. en caja de Petri con agar caldo, diera un máximo de 200 colonias.

Los resultados obtenidos están expresados en el cuadro n° III y se refieren exclusivamente a la acción de *la protamina,* la cual a la concentración de 1/25.000 manifiesta una *rápida acción bactericida.* A la concentración de 1/100.000 tiene una acción bactericida sobre más del 90 % de los cocos y una *acción bacteriostática* que dura de 9 a 10 horas.

4) *Influencia del medio de cultivo.*

Utilizamos los siguientes medios de cultivo: caldo simple, caldo con 2,5 % de hidrolizado de caseína, agua corriente peptonada al 1 % (con Bactopeptona Difco y con Bactotriptona) y agua extracto de carne (extracto de carne 0,3 g. ClNa 0,3 gr. agua corriente 100 ml.) para el estafilococo y los mismos medios con 1 % de glucosa para el *Lactobacillus acidophylus.* Por los resultados obtenidos, *el extracto de carne parece contener una substancia que reduce la acción de los antibióticos estudiados,* puesto que tanto el estafilococo como el *Lactobacillus* desarrollaron a una concentración dos a cuatro veces más fuerte que en los tubos testigos con caldo.

5) *Fijación de la protamina por las bacterias.*

Pusimos en contacto durante dos horas a 37°C, 10 ml. de la solución madre de protamina diluída al 1/5 (1/1.250) con el sedimento obtenido de un cultivo de 20 ml. de caldo del estafilococo n° 54 incubado a 37°C. Al cabo de ese tiempo (2 hs.) centrifugamos nuevamente y filtramos por Seitz. En igual forma procedimos, uti-

lizando el sedimento de un cultivo de *Proteus vulgaris*. Un tubo testigo con protamina diluída en la misma forma, pero sin tratar por bacterias, sirvió como término de comparación. La titulación del poder antibiótico de la protamina la efectuamos con el estafilococo y con el *Lactobacillus acidophilus*.

El resultado de estas experiencias nos ha revelado que las *bacterias remueven la acción antibiótica de la protamina* y en mayor proporción el estafilococo (sensible) que el *Proteus* (insensible). Cuadro nº IV.

6) *Influencia de la adición de extractos bacterianos.*

Comportándose la protamina, según algunos autores, como un detergente catiónico, nos propusimos investigar la acción neutralizante de los extractos y filtrados de cultivos en caldo de bacterias sensibles: el estafilococo nº 54 y el *Lactobacillus acidophilus* y de otra no sensible, el *Proteus*, en la forma siguiente: a) fracción soluble en alcohol etílico a 95 % en ebullición, b) residuo de la operación anterior, y c) filtrados de cultivos en caldo simple o glucosado de 12, 24 y 48 hs. de incubación a 37°C.

Para la preparación de los extractos alcohólicos y de sus correspondientes residuos cultivamos las bacterias en medio sólido de gran superficie (en frascos del tipo Povinski, de 1 litro), recogiendo el desarrollo con solución fisiológica al cabo de 24 hs. de incubación a 37°C. El sedimento fué extraído varias veces con alcohol en ebullición, se reunieron los extractos y desecaron, emulsionando el producto así obtenido en agua destilada, adicionada en pequeñas fracciones y frotando con un tapón de caucho bien limpio contra las paredes del recipiente. El extracto de cada frasco fué así emulsionado en 15 ml. de agua destilada y esterilizado por ebullición en ampolla cerrada.

El residuo de la operación anterior fué suspendido en un volumen de agua 10 veces mayor, debido a su gran concentración y esterilizado en la misma forma.

Estos extractos bacterianos, se agregaron en forma variable: a) a una solución de protamina, b) al caldo con protamina prolongando su contacto de 1 a 24 hs. a temperatura ambiente o a 37°C., antes de efectuar la siembra para titular la acción antibiótica comparativamente con caldo testigo sin la adición de extractos bacterianos, c) simultáneamente al caldo adicionado con antibióticos; y d) adición del antiobiótico 15 horas después del contacto a temperatura ambiente del caldo, extractos bacterianos y semilla.

Resultados: *El extracto alcohólico neutraliza parcialmente* la acción antibiótica del sulfato de protamina y de la histona, siendo más efectivo el de una bacteria sensible (estafilococo) que el de la insensible (Proteus). *El residuo tiene un poder neutralizante menor* que el extracto alcohólico. Cuadro nº V.

Los filtrados por Seitz EK. neutralizan también, en cierto grado, la acción antibiótica de la protamina y de la histona. El filtrado de un cultivo de *L. acidophilus* de 48 hs. se ha revelado el más activo en este sentido.

7) *Influencia de la adición al medio de cultivo de los siguientes ingredientes*: a) extracto de levadura, crudo, preparado según la técnica de Woods, 1940, b) ácido para-amino-benzoico, c) urea, d) nitrato de guanidina, e) colesterol, f) ácido desoxicólico, g) lecitina. De los cuales se prepararon soluciones acuosas o suspensiones al 0,5 %, salvo para el ácido para-amino-benzoico que lo fué al 0,1 %. Del colesterol se preparó una solución clorofórmica que se adicionó gota a gota a un volumen adecuado de agua destilada hirviendo, obteniéndose así una emulsión opalescente. La lecitina fué disuelta en alcohol, evaporada a sequedad en una caja de Petri y luego emulsionada en un volumen adecuado de agua destilada, adicionada en pequeñas fracciones y frotando con un tapón de caucho bien limpio. Estas soluciones y emulsiones fueron esterilizadas en ampolla cerrada, por ebullición.

Se hicieron dos series de experiencias, varias veces repetidas: en una se agregaron estos ingredientes al caldo sembrado con estafilococo o con el *Lact. acidophilus* con las diferentes diluciones de protamina o de histona, en la proporción de 0,1 ml. de las soluciones madres para cada 2ml. de medio de cultivo, vale decir que todos los ingredientes eran adicionados simultáneamente.

En otras experiencias se procedió en la misma forma, pero sembrando al cabo de 1h. de contacto a 37°C y, finalmente, en otras se mezcló una solución de protamina al 1/1.250 o de histona al 1/250 con igual volumen de una dilución al 1/1.000 de los ingredientes (a) a (g) que aquí se mencionan (dilución al 1/5 de las correspondientes soluciones madres) y, después de dejarlos una hora en contacto a 37°C., se hicieron las correspondientes diluciones en caldo sembrado con estafilococo o con *Lact. acidophilus*.

Resultados: el extracto de levadura preparado con la técnica de Woods y el ácido para-amino-benzoico no modifican la acción de la protamina e histona.

La *urea acentúa la acción de la protamina* tanto sobre el estafilococo como sobre el *Lact. acidophilus*, no modifica, en cambio, la acción antibiótica de la histona.

El nitrato de guanidina parece acentuar algo la acción de la protamina sobre el estafilococo y el *Lact. acidophilus*, produciendo un efecto inverso sobre la histona.

El *colesterol y el ácido desoxicólico reducen la acción antibiótica* de la protamina en pequeño grado, siendo este efecto más aparente con el colesterol. Sobre la histona los resultados han sido variables y poco nítidos.

Finalmente la *lecitina neutraliza nítidamente el poder antibiótico* de la protamina y de la histona.

En vista de estos resultados indagamos si el colesterol, el ácido desoxicólico, la lecitina, urea y el nitrato de guanidina estimulaban el crecimiento microbiano en las condiciones de nuestras experiencias. Utilizamos el *Staphylococcus* cepa n°54 efectuando los recuentos en cajas de Petri, comprobando que únicamente la guanidina a la concentración de 0,1 de mg. por ml. de caldo sembrado

dobla la población microbiana al cabo de 24 hs. de incubación a 37°C.

8) *Influencia del plasma y de los eritrocitos.*

Utilizamos sangre defibrinada de conejo, adicionando por un lado el plasma al caldo en la proporción del 10 % y, en otra serie, los hematíes lavados en la misma proporción. La protamina y la siembra con la cepa nº 54 del *Staphylococcus,* fueron empleadas en la misma forma que en las experiencias anteriores, en una serie de experiencias simultáneamente y, en otra, se sembró 1 hora después de incubación a 37°°C.

Resultados: *El plasma de conejo reduce marcadamente el poder antibiótico* de la protamina y en menor grado los hematíes, siendo más notable este efecto cuando los elementos han permanecido 1 hora en contacto antes de la siembra de prueba.

9) *Estudio de la acción antibiótica de la mezcla de protamina e histona.*

Dado que la protamina es mucho más activa que la histona, que ésta carece de acción sobre las bacterias gram negativas y recordando que ambas tienen un máximo de acción a pH. distintos (la protamina hacia el lado alcalino y hacia el lado ácido la histona), nos propusimos investigar si la histona fuera anión. Con este objeto mezclamos volúmenes iguales de una solución de protamina al 1/1.250 y de histona al 1/250 para guardar relación con su actividad sobre el estafilococo blanco cepa nº 54, titulando la acción antibiótica de la mezcla al cabo de 30 minutos de incubación a 37°C, con este germen y con el *L. acidophilus.*

Resultados: la mezcla de protamina e histona conserva íntegra su actividad antibiótica, lo cual parecería indicar que ambas substancias se comportan como detergentes del mismo signo.

10) *Estudio de la neutralización del poder difusor de la protamina en la piel del conejo.*

En estas experiencias utilizamos la solución de protamina inoculada simultáneamente o después de 1 hora de contacto a 37° con las substancias empleadas en las experiencias nº 7 y con el extracto alcohólico del estafilococo nº 54, adicionadas de hemoglobina isotónica según la técnica de Bacharach y colaboradores (1940).

Resultados: Unicamente el extracto del estafilococo mezclado previamente con la protamina, redujo en un 50 % su actividad difusora.

10) *Adsorción por el agar.*

El *L. acidophilus* no desarrolla en caldo glucosado adicionado de 1/100.000 de protamina, substancia que pierde totalmente su acción antibiótica cuando se incorpora a un tubo de agar blando glucosado (con 0,5 % de agar) sembrado en las mismas condiciones.

Hemos notado el mismo efecto adicionando diferentes cantidades de protamina al agar caldo fundido, inclinado luego y sembrado con el estafilococo nº 54.

Finalmente, las pruebas en cajas de Petri sembradas con el estafilococo depositando en su superficie cinco anillos de vidrio en los cuales vertimos soluciones de protamina de distintas concentraciones, nos revelaron que *el agar inhibe totalmente su acción antibiótica.*

DISCUSIÓN

La acción antibiótica de la protamina e histona, a semejanza de la que poseen las sulfamidas, se reduce proporcionalmente a la cantidad de bacterias presentes, como si a cada bacteria correspondiera un determinado número de moléculas del antibiótico. Esta acción es bactericida a fuertes concentraciones y bacteriostática en las débiles.

Los cultivos jóvenes son marcadamente más sensibles que los viejos y el líquido de cultivo neutraliza parte de su acción antibiótica. Todo lo cual parece indicar que la protamina e histona se unen con acentuada afinidad a cierta substancia contenida en el cuerpo microbiano que difunde al medio de cultivo, previa lisis bacteriana o sin ella (nos inclinamos al primero de estos mecanismos). Esta substancia parece estar contenida en mayor proporción en las bacterias sensibles (*L. acidophilus* y *Staphylococcus*).

Mediante el alcohol etílico a 95 % en ebullición se consigue extraer gran parte de esta substancia neutralizante y, como la lecitina se comporta en la misma forma, creemos que esta acción está ligada a ciertos lípidos microbianos. La protamina es totalmente adsorbida por el agar. El ácido desoxicólico reduce, como en los detergentes catiónicos, la potencia antibiótica de la protamina e histona. El colesterol posee el mismo poder y, es probable, que la marcada reducción de la actividad antibiótica en presencia del plasma de conejo y del extracto de carne al 0,3 % se deba, también, a la presencia de esta substancia.

La protamina e histona parecen comportarse como detergentes del mismo signo (catiónicos), puesto que su actividad no se anula al mezclarse.

A semejanza de lo que ocurre con ciertas sulfamidas, la urea refuerza la acción de la protamina e histona, lo cual parecería indicar que está ligada a una posición determinada de los grupos aminos en la molécula.

RESUMEN

En este trabajo se estudia el mecanismo de la acción antibiótica de la protamina e histona.

La acción antibiótica se reduce proporcionalmente al número de bacterias presentes. Los cultivos jóvenes son más sensibles que los viejos. El filtrado de los cultivos en medios líquidos, neutraliza, en cierto grado, la acción antibiótica.

Mediante el alcohol etílico en ebullición se consigue extraer gran parte de la subsancia neutralizante.

La lecitina de huevo, el ácido desoxicólico ,el colesterol reducen la acción antibiótica. Es probable que la misma acción ejercida por el plasma de conejo y el extracto de carne, se deba a la presencia de colesterol.

La urea refuerza y el agar suprime la acción antibiótica.

La protamina e histona no se anulan al mezclarse; son bactericidas a fuertes concentraciones y bacteriostáticas en las débiles. Parecen comportarse como detergentes catiónicos.

RESUMÉ

Nous étudions le mécanisme de l' action antibiotique du sulfate de protamine et de l' histone.

L' action antibiotique diminue proportionnellement au nombre de bactéries présentes. Les cultures jeunes sont plus sensibles que les plus âgées. Le liquide de culture filtré neutralise partiellement l' action antibiotique. L' alcool éthylique en ebullition extrait la plupart de la substance neutralisante. La lécitine d' oeuf, l' acide desoxicholique, le cholesterol, le plasma et l' extrait de viande, neutralisent, aussi, le pouvoir antibiotique.

L' urée renforce et l' agar anule l' action de la protamine et de l' histone. Ces substances semblent se comporter comme des détergents cathioniques. Elles sont bactéricides ou bactériostatiques selon leur concentrations.

SUMMARY

We have studied the mechanism of the antibiotic action of protamine sulphate and histone. Their antibiotic action is reduced proportionally to the amount of bacteria. Young cultures are more sensitive than older ones. The filtrates from cultures in liquid media partially neutralize the antibiotic action.

Boiling ethylic alcool remouves the bulk of the neutralizing substance. Egg lecitine, desoxicholic acid, cholesterol, plasma and beef extract also neutralizes the antibiotic action. Urea enhances and the agar supresses the antibiotic action.

Both protamine and histone seem to act as cathionic detergents. They are bactericidal or bacteriostatic according to their concentrations.

BIBIOGRAFÍA

Bacharach, A. L., Change, M. R. A. and Middleton, T. R. Bioch. J., 1940, **34**, 1464-1471.

Negroni, P y Fischer, I. Estudios sobre la acción antibiotica de las protaminas e histonas. Trabajo comunicado en las reuniones científicas del "Instituto Bacteriológico Dr. Carlos G. Malbrán" y en la Sociedad Arg. de Biol. En prensa.