

CATEDRA DE BACTERIOLOGIA
E INMUNOLOGIA

de la
Universidad de Chile
Prof. Dr. Hugo Vaccaro

**El lisozima y su importancia en la defensa
del organismo**

por

Hugo Vaccaro y Juan Cabezas

(Recibido por la Redacción el 21-IV-44)

Las primeras referencias con respecto a este principio inhibidor y lítico se encuentran en los trabajos publicados por Laschtchenko en 1909 y por Rettger y Sperry en 1912, quienes establecen que la clara de huevo contiene una substancia que inhibe el desarrollo de ciertas especies microbianas saprófitas.

Alexander Fleming, 1922, comprueba que la mayoría de los tejidos y secreciones animales, como asimismo ciertos tejidos vegetales, tienen la propiedad de lizar algunas especies microbianas saprófitas aisladas del aire.

Un año más tarde, este mismo autor y su colaborador V. D. Allison completan el estudio de dicho principio lítico el que determinan como una diastasa y lo denominan "lisozyma". Demuestran su presencia en la casi totalidad de los tejidos y humores del cuerpo humano, con excepción del líquido céfaloraquídeo, orina, sudor, deposiciones normales, humor acuoso y cristalino, comprobando que el fermento lítico se encuentra en mayor abundancia en las lágrimas y en el mucus nasal. Así mismo establecieron que la acción inhibidora o lítica es efectiva no solamente frente a los micro-organismos saprófitos, sino también frente a muchas especies microbianas patógenas.

Una emulsión concentrada de una sarcina saprófita, el *Micrococcus lysodeikticus*, al adicionarla de algunas gotas de emulsión de clara de huevo al 1%, a una temperatura de 50°, se hizo totalmente transparente en menos de 30 segundos.

Los exámenes microscópicos de este líquido y las siembras en medios adecuados, demostraron la ausencia total de gérmenes.

Del mismo modo, al depositar una gota de la dilución de clara de huevo sobre un cultivo de la misma especie microbiana, sembrada en placa de Petri, se produjo, a la temperatura de 45°,

la disolución del cultivo en este punto, en menos de un minuto.

Con estas experiencias, **Fleming** y **Allison** demostraron en forma concluyente el alto poder bacteriolítico del lisozima contenido en la clara de huevo. Evidenciaron esta propiedad hasta con diluciones del $1 \times 50.000.000$ a 37° y en 24 horas de contacto.

NATURALEZA QUIMICA Y PROPIEDADES DEL LISOZIMA

Fué **Wolff** en 1927 quien por primera vez logró aislar este principio, precipitando la clara de huevo diluída con hierro coloidal, filtrándola y vaporizando el filtrado a pequeño volumen, de donde precipitaba el lisozima con acetona, y lo purificaba en seguida mediante dialisis repetidas. Obtenía así un polvo blanco, soluble en agua e insoluble en los disolventes orgánicos comunes, que daba la reacción de **Mölish** y era exento de N, S, y P. La reacción del biuret fué débilmente positiva.

En 1936, **K. Meyer**, **J. W. Palmer** y **R. Thompson** obtienen un producto de apariencia cristalina cuya actividad era de 3,200 U. por mgr.

En 1937, **Roberts** consigue un producto homogéneo de, aproximadamente, 2,000 U. por mgr., determinadas por el método de **Goldsworthy-Florey**.

Abraham, en 1939, siguiendo la técnica de **Roberts**, logra obtener, en forma de polvo blanco, un producto amorfo y otro cristalino, los dos de potencia semejante, alrededor de 2,000 U. por mgr., y de un peso molecular de 18,000. No consiguió verificar el análisis químico cuantitativo del producto cristalino, pero determinó en la substancia amorfa 16,4% de N. y 3,2% de S. y, en cuanto a los amino-ácidos, evidenció la presencia de los siguientes: arginina 11,6%, cistina 7%, lisina 5,8%, tirosina 4,4% e histidina 2,6%.

Una de las preparaciones más altamente purificadas de **Meyer**, de aspecto cristalino bajo el microscopio de polarización, dió el siguiente resultado centesimal: C 48,65; N 15,33; H 6,44; P 0,25; S 0,65; y cenizas 3,3%. Su peso molecular aproximado fué de 25,000.

El lisozima es muy resistente al ácido, aunque actúa mejor en medio neutro. A pH ácido atraviesa la bujía **Berkefeld V**, siendo muy difícil su filtración a pH neutro. No es dializable. Se comporta como un coloide electropositivo. Es absorbido por el carbón vegetal, caolín, celulosa y no por el hidróxido de hierro coloidal, hidróxido de aluminio coloidal y fosfato tricálcico.

Gildemeister le asignó un tamaño molecular inferior a 30 milimicrones.

Los rayos ultravioletas destruyen el lisozima.

La temperatura necesaria para anular su acción varía, según **Fleming** y **Allison**, con la secreción del organismo que lo contiene.

En cuanto al grado de conservación, el lisozima es muy estable; sus soluciones se mantienen activas, tanto a la estufa como al refrigerador, durante un tiempo prolongado.

Los fermentos digestivos no disminuyen su poder lítico. La concentración salina del medio tiene gran influencia sobre la velocidad de la bacteriolisis la que es retardada y hasta inhibida por una concentración alta, mientras una tasa baja (0,5%) la favorece. Los antisépticos pueden anular completamente la acción del lisozima; pero la adición de sulfamidados parece reforzarlo en su poder bacteriostático.

Varios autores, en estudios comparativos de las propiedades y constitución química del principio lítico, contenido en la clara de huevo y en los diversos humores del organismo, han llegado a demostrar muchas semejanzas aunque existan también pequeñas diferencias. Así, Meyer y Abraham, que consideran el lisozima, a diferencia de Bordet, como un antígeno, establecen que se comporta, según su origen, antigénicamente distinto. Pero Thompson, después de examinar minuciosamente todas las semejanzas y diferencias aducidas por los diversos autores, llega a la conclusión que es justificado incluir todos estos diferentes agentes líticos bajo el término común de "lisozima".

MECANISMO DE ACCION DEL LISOZIMA

Fleming y Allison consideraron el lisozima como una diastasa, no logrando demostrar su calidad enzimática ni el sustrato sobre el cual ejercía su acción.

Hallauer sostiene que esta acción enzimática se realiza sobre la fracción mucóide de las membranas microbianas, ya que la lisis se acompaña de un aumento del N no proteico, del P inorgánico y de substancias reductoras de origen protoplasmático puestas en libertad. Este concepto es el que goza de mayor aceptación.

K. Meyer, J. W. Palmer y R. Thompson demostraron, experimentalmente, que el mecanismo de acción del lisozima no obedece a una modificación físico-química en relación con un descenso de la tensión superficial. Del mismo modo descartaron totalmente la actividad proteasa, kinasa, amilasa, lipasa y fosfatasa del lisozima. Según ellos, la acción se ejercería específicamente sobre uno de los eslabones azucarados de ciertos mucoides de naturaleza desconocida.

L. A. Epstein y E. Chain, en 1940, llegan a la conclusión que el lisozima es un enzimo que hidroliza a un polisacárido insoluble contenido en el protoplasma de las bacterias sensibles y que contribuye a mantener intactas sus estructuras morfológicas.

Su acción correspondería a la de una carbohidrasa que, en un pH entre 2 y 9, da como productos de hidrolisis una N. amino exosa acetilada y una keto hexosa, no siendo demostrable la presencia de otros azúcares.

En aquellos casos en que el polisacárido es el único elemento mantenedor de la estructura morfológica de la bacteria sensi-

ble al lisozima, la acción diastásica determina la completa lisis microbiana. Pero, cuando estén presentes otras estructuras, el lisozima ejercería un poder bactericida o bacteriostático ya que, aun siendo el polisacárido de importancia vital para la bacteria, la mantención de su estructura está a cargo de otros elementos.

NUESTRAS INVESTIGACIONES

En vista de la importancia del lisozima como factor inespecífico en la defensa del organismo, se decidió en nuestra Cátedra la investigación de este agente inhibidor-lítico, proyectando su estudio integral, es decir, en sus diversos aspectos desde el punto de vista de la bacteriología, inmunología, quimioterapia, como también de la patología experimental y la clínica.

Es así como en el año 1940 abordamos por primera vez este problema cuyo estudio aun no hemos terminado. Por lo tanto, la presente exposición es sólo un resumen de los resultados obtenidos hasta el presente. Para todas nuestras investigaciones hemos empleado, como especie microbiana sensible, la *Sarcina* test, aislada por L. Rosenthal en 1930.

También Paul S. Prickett del Laboratorio de Mead Johnson and Company, Evansville, Indiana, la ha utilizado en sus trabajos sobre el lisozima y fué él quien gentilmente nos envió una cepa para poder realizar nuestras investigaciones sobre este principio inhibidor-lítico.

En el año 1942 realizamos el estudio de la morfología, fisiología y caracteres de cultivo de esta especie microbiana y, al mismo tiempo, el estudio bioquímico del lisozima contenido en el huevo de gallina.

En aquel primer trabajo comprobamos en gran parte las propiedades del lisozima anteriormente descritas y fijamos las normas para las investigaciones siguientes en relación con la clínica, en parte ya realizadas y en parte aun en curso.

Los trabajos clínicos-experimentales ya terminados son los siguientes:

1) "El lisozima como factor de defensa en Otorrinolaringología. Su estudio en las mucosas nasal y paranasales". Trabajo realizado en colaboración con la Clínica Universitaria de Otorrinolaringología.

2) "Investigación e importancia del lisozima en Oftalmología". Trabajo efectuado en colaboración con la Clínica Universitaria de Oftalmología del Prof. Espildora Luque.

3) "Investigación y estudio comparativo del lisozima en la leche humana y en diferentes clases de leche de mamíferos".

4) "Importancia del lisozima en el tracto digestivo del recién nacido y lactante. Su influencia en la flora intestinal". Trabajo realizado en colaboración con la Clínica de Pediatría del Prof. Cienfuegos.

5) "El lisozima como factor inespecífico de defensa en Ginecología y Obstetricia". Trabajo efectuado en colaboración con las Clínicas Universitarias correspondientes.

EL LISOZIMA COMO FACTOR DE DEFENSA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA

Ha llamado la atención de los otorrinólogos el alto poder defensivo y microbicida de las mucosas nasales y paranasales. Las intervenciones quirúrgicas, por cruentas y laboriosas que sean, sólo excepcionalmente se complican con infecciones adicionales.

Comparando los individuos clínicamente normales con los enfermos, se observa un aspecto cuali y cuantitativamente muy diferente de la flora microbiana a nivel de las distintas zonas de las fosas nasales y cavidades anexas dependientes, lo que se explica por la concurrencia de diversos factores inespecíficos de defensa localizados en esta región y entre ellos parece corresponder al principio lítico de Fleming un papel de alta importancia.

En colaboración con la clínica universitaria del Prof. Barroillet, verificamos el estudio del contenido lisozímico de la secreción nasal — a nivel de las diferentes zonas: meato, cornete y tabique nasal — de individuos normales y de enfermos con rinitis aguda (coriza) y rinitis alérgica. Del mismo modo investigamos el poder inhibidor-lítico de la secreción de los senos frontales y maxilares normales y patológicos.

Estudiamos el poder bactericida y bacteriolítico de cada una de estas variedades de secreciones, frente a la sarcina test y a las especies microbianas saprófitas y patógenas más frecuentemente aisladas de aquellas regiones, variando el grado de dilución de cada tipo de secreción y los tiempos de contacto entre secreción y emulsión bacteriana.

Las conclusiones a que llegamos son las siguientes:

Queda demostrada la presencia del lisozima en las secreciones nasales y paranasales normales y su modificación en las secreciones patológicas.

El contenido lisozímico de la secreción normal varía según los individuos y, en cada uno de ellos, según la zona analizada. Tuvimos la impresión de que la secreción del cornete medio sea la más activa, de acuerdo con las conclusiones de Cahn y Bronner.

De las especies microbianas que sometimos a la acción del principio lítico, la Sarcina test demostró ser la más sensible; siguieron en orden decreciente: el estafilococo apatógeno, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus haemolyticus* y estafilococo patógeno. El *Diplococcus pneumoniae* se reveló resistente.

En la secreción nasal de naturaleza inflamatoria (rinitis aguda y crónica), el contenido lisozímico resultó ser francamente menor al normal y variaba de un paciente a otro y, en un mismo individuo, según las zonas investigadas.

La secreción nasal de naturaleza alérgica demostró poseer una concentración lisozímica mayor que la de los individuos normales y se comprobó activa aun para los neumococos. Consideramos importante hacer notar que la casi totalidad de las muestras de esta variedad de secreción resultó negativa al examen directo y al cultivo, tanto de las secreciones recientemente extraídas como de aquellas controladas con posterioridad.

La secreción de los senos paranasales normales tiene un contenido lisozimico superior al de la secreción nasal.

En las inflamaciones agudas y crónicas de los senos paranasales se observa, igualmente, una franca disminución del poder lisozimico de sus secreciones.

EL LISOZIMA COMO FACTOR DE DEFENSA EN OFTALMOLOGIA

En colaboración con la Clínica Oftalmológica del Prof Espildora investigamos la existencia y el poder del lisozima en la secreción lacrimal normal y patológica.

Llegamos a los siguientes resultados:

Es efectivo que la secreción lacrimal normal contiene lisozima.

Su acción lítica frente a la Sarcina test fué total con diluciones de 1 x 2,000 en 24 horas de contacto.

Hubo acción parcial con diluciones del 1 x 200 en 3 horas.

En diluciones por debajo de 1 x 100, la acción lítica se verificó en menos de 10 minutos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Venko en 1932.

Con respecto a la secreción lacrimal patológica observamos lo siguiente:

En las conjuntivitis agudas y crónicas, en la conjuntivitis angular, y en las dacriocistitis simples y supuradas, el contenido lisozimico de la secreción decrece notablemente entre el primer y tercer día y llega hasta a desaparecer. Durante el periodo de estado aumenta de nuevo, pero queda por debajo de su valor normal, para alcanzar a sobrepasar la tasa normal en la convalecencia.

Las lesiones traumáticas, presencia de cuerpos extraños, etc., por lo general, no parecen alterar la situación normal, pero en algunos casos se produce, desde el comienzo, un aumento del contenido lisozimico.

INVESTIGACION Y ESTUDIO COMPARATIVO DEL LISOZIMA EN LA LECHE HUMANA Y EN LA LECHE DE ALGUNOS MAMIFEROS

De este trabajo se desprende:

La leche humana contiene lisozima.

Su acción fué evidente, frente a la Sarcina test, hasta con diluciones de 1 x 10,000 en una hora de contacto.

El calostro humano contiene lisozima de igual potencia.

La leche de burra contiene lisozima con la misma actividad que posee la presente en la leche humana.

En la leche de yegua también se encuentra lisozima que se comporta en todo igual al de la leche humana y de burra.

La leche de vaca y de cabra no contiene lisozima.

Están aun en curso investigaciones sobre el contenido lisozímico de la leche de otros mamíferos, cuyos resultados daremos a conocer en un posterior trabajo de conjunto sobre este tema.

EL LISOZIMA EN EL TRACTO DIGESTIVO DEL RECIEN NACIDO Y LACTANTE

Su influencia en la flora intestinal

Basándonos en un trabajo de Rosenthal y Lieberman sobre el mismo problema, procedimos a examinar el meconio y las deposiciones de recién nacidos y lactantes en cuanto a su posible contenido lisozímico. Sometimos a este control niños criados con leche materna o humana y niños con alimentación mixta y artificial, a fin de determinar la procedencia del principio lítico. Finalmente investigamos el efecto más frecuente que ejerce este elemento sobre algunos de los gérmenes más frecuentes en el tracto digestivo, para así comprender su influencia sobre la flora intestinal.

Nuestras investigaciones condujeron a los siguientes resultados:

Quedó demostrada, en la totalidad de los casos investigados, la ausencia del lisozima en el meconio.

Por el contrario, se evidenció su presencia en todas las deposiciones de los recién nacidos alimentados con leche materna.

En todos los casos controlados, el lisozima apareció al tercer día, coincidiendo con la iniciación del amamantamiento.

Los lactantes alimentados con leche humana ordeñada, presentaron en sus deposiciones un alto título lisozímico, semejante al observado en los niños alimentados con leche materna.

No se encontró ninguna relación entre el contenido lisozímico en las deposiciones y la edad del niño alimentado con leche humana.

En las deposiciones de los lactantes alimentados en forma mixta, se comprobó la existencia de lisozima en un grado que guarda relación directa con la cantidad de leche humana ingerida.

En cuanto a los lactantes alimentados en forma artificial, no se pudo demostrar, en ninguno de los casos investigados, la presencia de lisozima en sus deposiciones.

Resumiendo todos estos resultados, podemos concluir que el lisozima contenido en las deposiciones de los lactantes proviene de la leche humana ingerida, ya que no se encuentra ni en el meconio ni en las deposiciones de los niños con alimentación artificial.

Si recordamos ahora lo anteriormente dicho de que, según Fleming y Allison, este principio inhibidor-lítico no es disminuído ni alterado por los jugos digestivos, debe aceptarse que el lisozima ejerce su acción microbiana en forma eficaz a lo largo de

todo el tracto digestivo del lactante. Contribuiría así a la simplificación de la flora normal y favorecería el predominio del *Lactobacillus bifidus*, especie resistente a su poder lítico.

Con el objeto de ver si, paralelamente a este efecto, pueda suponerse también una actividad bactericida frente a especies patógenas del intestino, sometimos a la acción de este lisozima obtenido de las deposiciones, algunos gérmenes aislados de trastornos intestinales de lactantes. Obtuvimos los siguientes resultados:

a) El *Proteus morgani* demostró la mayor sensibilidad al lisozima fecal. A concentraciones de 1×10 y a las 3 horas de contacto, se observó la inhibición total de su desarrollo. Efecto parcial se comprobó aun frente a diluciones de 1×100 después de 24 horas.

b) La *Escherichia coli* fué inhibida en su desarrollo en formar total a concentraciones de 1×10 y después de 6 horas de contacto. A concentraciones de 1×50 se reveló una acción muy leve a las 24 horas.

c) La *Salmonella paratyphi* A también sufrió la inhibición total de su desarrollo a concentraciones de 1×10 y después de 6 horas de contacto. Al 1×20 el efecto inhibitorio fué sólo parcial y después de 24 horas.

d) La *Eberthella typhosa* fué inhibida en forma total a concentraciones de 1×10 después de 24 horas de contacto. A concentraciones de 1×20 se observó, en el mismo tiempo, una acción inhibitoria lítica incompleta.

e) El *Streptococcus faecalis* (enterococo) se demostró como una cepa muy resistente a la acción del lisozima fecal. A las concentraciones de 1×10 se observó una inhibición parcial sólo a las 18 y 24 horas.

f) La *Shigella paradysenteriae* (Bacilo de Flexner) se reveló aun más resistente. Con la concentración de 1×10 se produjo la inhibición parcial sólo después de las 24 horas.

EL LISOZIMA COMO FACTOR INESPECIFICO DE DEFENSA EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

A fin de poder formarnos un concepto sobre el papel y la importancia del lisozima en estas especialidades, examinamos las secreciones genitales tanto de la mujer sana, como también de la mujer con afecciones ginecológicas y de la embarazada.

De nuestro trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

I) Mujeres ginecológicamente normales.

1.—La secreción vaginal total de mujeres normales contiene lisozima a alto título.

2.—La secreción sólo de la pared vaginal presenta una tasa lisozímica considerable.

3.—La secreción cervical reveló un contenido lisozímico menor y en algunos casos no fué posible demostrarlo.

4.—Puede encontrarse en una misma persona, junto a un alto contenido lisozímico de la pared vaginal, una existencia escasa o nula en el cuello uterino.

5.—La secreción vaginal sin previa dilución demostró su poder inhibidor-lítico, frente a la Sarcina test, en menos de 5 minutos.

6.—La secreción cervical sin previa dilución tenía, por lo general, un índice de actividad comparativamente menor.

7.—La secreción vaginal desarrolló su acción lítica hasta en diluciones de 1 x 800 en 6 horas de contacto.

8.—La secreción cervical fué eficaz hasta al 1 x 400 en el mismo tiempo.

II) Mujeres con afecciones ginecológicas.

La secreción genital de estas enfermas, comparada con la secreción normal, presentó diferencias notables en cuanto a su contenido lisozímico.

Trabajando en condiciones idénticas a las de la serie anterior, pudo establecerse, por lo general, una disminución apreciable del poder inhibidor-lítico. Sólo en escasos ejemplos se comprobó la acción lítica de la secreción sin previa dilución en menos de 5 minutos. La mayor dilución eficaz a contacto prolongado, fué de 1 x 400. En algunos casos no se pudo evidenciar acción alguna.

III) Mujeres embarazadas.

1.—La secreción genital de las embarazadas contiene lisozima y, generalmente, a alto título.

2.—La tasa lisozímica no varía mayormente con la edad del embarazo.

3.—En el puerperio se observa un decrecimiento del contenido lisozímico aun más intenso que en las enfermas de ginecopatía.

4.—El líquido amniótico no revela la presencia de lisozima.

RESUMEN

Nuestras experiencias confirman la existencia y amplia distribución del principio inhibidor-lítico, descubierto por Fleming en 1922, y demuestran, al mismo tiempo, la gran importancia de su presencia en las diversas secreciones del organismo humano normal y sus modificaciones en el organismo enfermo.

Creemos que los resultados obtenidos hasta el momento en nuestras investigaciones, justifiquen y, aun más, exijan la continuación de estos estudios en la forma más completa posible,

trabajo este que en nuestra Cátedra nos hemos impuesto como obligación.

Esperamos que la importancia del elemento lítico presentado justifique también ante Uds. el haber ocupado, talvez por un tiempo excesivo, esta tribuna de las brillantes Jornadas Biológicas de vuestra Universidad.

