

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DISCURSO INAUGURAL

DEL AÑO ACADÉMICO 1971 - 72

LEIDO EN LA SESIÓN CELEBRADA EL DÍA 17 DE NOVIEMBRE DE 1971

POR EL ACADEMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. D. FLORENCIO BUSTINZA LACHIONDO



M A D R I D
DOMICILIO DE LA ACADEMIA:
VALVERDE, 22 — TELÉFONO 221-25-29
1 9 7 1

Depósito Legal M. 27.410. -1971

ALLERES GRÁFICOS VDA. DE C. BERMEJO. — J. GARCÍA MORATO, 122. — TEL. 233-06-19. — MADRID

EN EL CINCUENTENARIO DEL DESCUBRIMIENTO DE LA LISOZIMA

Potest e casa vir magnus exire

El 6 de agosto de 1881 nació en *Lochfield Farm*, cerca de Darvel, en Escocia, una criatura, un niño, Alexander Fleming, predestinado para una gran empresa, pues la Providencia le tenía reservado hacer dos grandes descubrimientos: uno el de la *Penicilina*, bien conocido de todos, que marcó un hito en la historia de la terapéutica, y el otro, tan importante como el anterior, fue el descubrimiento de la Lisozima, realizado hace precisamente medio siglo, otoño de 1921, el cual preparó la mente de Fleming para la realización en 1928 del descubrimiento de la penicilina, que elevó a su descubridor a la categoría de Bienhechor de la Humanidad.

Como bien dijo nuestro inolvidable don Gregorio Marañón: *Sin un conocimiento aproximado del hombre es difícil darse cuenta del significado de su obra.*

La clase de vida de Alexander Fleming durante su infancia hizo de él un muchacho vigoroso y sano, con mente fértil, y alerta por la contemplación continua de los seres y fenómenos naturales. Aprendió mucho en el *Libro de oro de la naturaleza*, y se fue haciendo poco a poco *naturalista*; y sus cualidades destacadas cuando mayor, curiosidad insaciable, capacidad para asombrarse, extraordinario espíritu de observación capaz de percibir detalles al parecer nimios y agudeza para interpretarlos correctamente, sin duda alguna nacieron y se fueron desarrollando durante su infancia (1).

La característica de Fleming fue la sencillez; la sencillez en todo: en su persona, en su manera de vivir y hasta en las técnicas de investigación que empleó, muchas de ellas ingenizadas por él mismo. Asombra cómo con técnicas y experimentos tan sencillos pudo llegar a resultados tan trascendentales y es que fue un investigador genial, que supo analizar, comprender y vislumbrar el alcance de los fenómenos que puso la providencia ante sus ojos y de aquellos otros que él provocó con finalidad experimental para analizarlos

y estudiarlos. Todo está claro en sus trabajos, donde no hay más que las frases necesarias para describir las técnicas seguidas y analizar los fenómenos observados, deducir las consecuencias y formular las conclusiones. Ya lo dijo Eurípides: *el lenguaje de la verdad es sencillo*.

En varias ocasiones Sir Alexander Fleming dijo que la mejor serie de experimentos que él hizo fue la realizada en *slide cells*, que demostraron la toxicidad relativa de diversas sustancias frente a leucocitos humanos y frente a bacterias y que consideraba como *his most interesting work that on lysozyme*.

Estimo que tanto sus investigaciones sobre la acción de los antisépticos sobre las bacterias y sobre los leucocitos, como su descubrimiento de la lisozima, prepararon su espíritu para el trascendental descubrimiento de la penicilina y no hay duda de que las técnicas que él ideó para estudiar la acción de los antisépticos y para la investigación de las propiedades de la lisozima fueron precisamente las que luego empleó para analizar experimentalmente y minuciosamente el fenómeno de antagonismo natural que se le presentó providencialmente, en una placa de cultivo, en el otoño de 1928 y como consecuencia de dicho análisis surgió el descubrimiento de la penicilina, que tanta resonancia internacional tuvo y que tanto ha contribuido y contribuirá a ahorrar lágrimas y sufrimientos a la humanidad.

Analizaré con algún detalle el trabajo del descubrimiento de la lisozima y los trabajos posteriores sobre dicha enzima, que ocuparon buena parte de la actividad investigadora del profesor Fleming desde 1922 a 1928, y además se puede afirmar que nunca dejó de estar interesado en su lisozima e incluso pocas semanas antes de su muerte manifestó el deseo de volver a ocuparse de dicha enzima.

DESCUBRIMIENTO DE LA LISOZIMA

Otoño de 1921. Fleming trabaja en una pequeña habitación del *St. Mary's Hospital*, en el piso segundo de *Clarence Wing*, que hace esquina a *Praed Street* y *Cambridge Place*, hoy llamada *Norfolk Place*, en el mismo pequeño laboratorio donde siete años más tarde descubriría la penicilina (1).

Fleming padece un resfriado nasal e intenta aislar alguna bacteria de su propio exudado nasal y, después de una serie de investigaciones meticolosas, llega al descubrimiento de una enzima lítica, la *lisozima*, dotada de extraordinaria actividad frente a una bacteria saprofita, que ha contaminado una de sus placas de cultivo y a la cual bautizó con el nombre de *Micrococcus lysodeikticus* por la facilidad con que muestra la lisis.

En diciembre de 1921, o sea, hace cincuenta años, Fleming dio cuenta de su descubrimiento, por primera vez, en *The Medical Research Club*, y el 13 de febrero de 1922, su maestro, el profesor A. Wright, presentó el trabajo de A. Fleming a la Royal Society, en cuyos Proceedings, B. vol. 93, páginas

306-317 (1922) se publicó con el título de: *On a Remarkable Bacteriolytic Element found in Tissues and Secretions.*

A continuación se reproduce fotográficamente la primera página de dicho histórico trabajo, y en ella he subrayado las palabras *Lysozyme* y *Micrococcus lysodeikticus*.

On a Remarkable Bacteriolytic Element found in Tissues and Secretions.

By ALEXANDER FLEMING, M.B., F.R.C.S.

(Communicated by Sir Almroth Wright, F.R.S. Received February 13, 1922.)

(From the Laboratory of the Inoculation Department, St. Mary's Hospital.)

[PLATE 9.]

In this communication I wish to draw attention to a substance present in the tissues and secretions of the body, which is capable of rapidly dissolving certain bacteria. As this substance has properties akin to those of ferments I have called it a "Lysozyme," and shall refer to it by this name throughout the communication.

The lysozyme was first noticed during some investigations made on a patient suffering from acute coryza. The nasal secretion of this patient was cultivated daily on blood agar plates, and for the first three days of the infection there was no growth, with the exception of an occasional staphylococcus colony. The culture made from the nasal mucus on the fourth day showed in 24 hours a large number of small colonies which, on examination, proved to be large gram-positive cocci arranged irregularly but with a tendency to diplococcal and tetrad formation. It is necessary to give here a very brief description of this microbe as with it most of the experiments described below were done, and it was with it that the phenomena to be described were best manifested. The microbe has not been exactly identified, but for purposes of this communication it may be alluded to as the Micrococcus lysodeikticus.

El 21 de diciembre de 1945 visité por primera vez a Sir Alexander en el St. Mary's Hospital y hablándome de su lisozima me dijo así:

«En el primer trabajo que publiqué sobre la Lisozima en 1922, hice alusión a un enfermo que padecía de coriza agudo; pues bien, ese enfer-

mo fui yo mismo. De mi secreción nasal sembré en medio de cultivo sólido —agar sangre— en días sucesivos, y en la superficie de las placas sembradas en los tres primeros días nada especial observé, pero en la placa resultante de la siembra en el cuarto día de mi mucus nasal tuve una contaminación por un microbio cuyas colonias son de color amarillo-limón, y al cual más adelante le designé con el nombre de *Micrococcus lysodeikticus*. Pero lo extraordinario fue que las colonias de ese microbio en las zonas donde yo había extendido el mucus nasal desaparecían, es decir, deduje que algo había en la secreción que se difundía por el medio de cultivo sólido de la placa y que al parecer ejercía una acción lítica sobre dicho microbio.»

La capacidad para asombrarse mide al investigador y Fleming se asombró, porque su mente estaba preparada para ello por sus investigaciones anteriores sobre la acción de los antisépticos sobre las bacterias y sobre los leucocitos, ante el fenómeno lítico del microbio banal contaminante y sintió curiosidad, y puso todo su entusiasmo —sin el cual nada trascendente se logra— por aclarar lo que allí pasaba y ése fue el primer movimiento de su espíritu hacia el descubrimiento.

Se puede afirmar que muchos hombres de valía han tenido delante de sus ojos fenómenos raros sin darse cuenta de su importancia, porque como bien dice J. Bénard: *El reflejo del asombro no se produjo en ellos a tiempo.*

Fleming preparó una suspensión de su mucus nasal en suero fisiológico estéril, la centrifugó y puso una gota del sobrenadante sobre placa de cultivo bien sembrada con el *Micrococcus lysodeikticus*, incubó a 37° durante veinticuatro horas, y observó que el microbio no crecía alrededor de la gota y hasta cierta distancia.

Adicionó una gota de mucus nasal a una suspensión opaca de *M. lysodeikticus* contenida en un tubo y observó que a 37° en pocos minutos quedaba completamente clarificada.

Depositó una gota del mucus nasal sobre un cultivo de *M. lysodeikticus* bien desarrollado en medio sólido y vio que se aclaraba la zona donde había puesto el mucus nasal.

De estos y otros muchos experimentos dedujo que la sustancia activa no solamente inhibía el crecimiento del *M. lysodeikticus*, sino que tenía también actividad bactericida y bacteriolítica.

Al principio pensó si se trataría de un bacteriófago, pero descartó esa posibilidad cuando observó que la sustancia contenida en el mucus nasal actuaba lo mismo sobre células vivas que sobre células muertas del *M. lysodeikticus* y además la sustancia lisante se difundía a través del agar.

Después de numerosos ensayos, entre ellos el estudio de su solubilidad en agua y en disoluciones de ClNa, su insolubilidad en disolventes orgánicos, la influencia de la reacción del medio en su actividad, la influencia de la temperatura en la velocidad de su acción que se aceleraba hasta los 60° C, para luego

decrecer, e inactivarse por ebullición de la disolución, por fin llegó a la conclusión de que se trataba de una enzima y la llamó *Lisozima*.

Estudió la distribución de la lisozima en el cuerpo humano y descubrió que además del moco nasal, las lágrimas y los esputos eran ricos en dicha enzima, especialmente las lágrimas. El contenido lisozímico de la saliva varía según los individuos. También poseían actividad el suero y el plasma sanguíneo, los leucocitos y la fibrina del coágulo sanguíneo y a propósito de esto dice:

It is conceivable that this is a protective mechanism for open wounds, which rapidly become covered with a layer of fibrin and leucocytes, both of which are rich in Lysozyme.

No halló lisozima ni en el líquido céfalo-raquídeo, ni en el sudor, ni en la orina normal.

Entre los órganos, los cartílagos son muy activos. También halló gran actividad lisozímica en la clara de huevo, apreciándose la lisis aún a diluciones de 1 en 50 millones, siendo también activa la clara de huevo comercial desecada.

Estudió la distribución de la lisozima en tejidos y órganos de diferentes animales.

En las plantas observó actividad lisozímica en el *nabo*.

Observó al microscopio una mezcla de lágrimas y de *M. lysodeikticus* y vio que los cocos rápidamente pierden su perfil, se hinchan y desaparecen gradualmente y al mismo tiempo aparecen como los gránulos.

Fleming se formuló la siguiente pregunta: *¿Does lysozyme act on Bacteria other than M. lysodeikticus?*

Observó actividad de sus extractos frente a muchas estirpes de bacterias saprofitas aisladas del aire y sobre el *B. abortus* de Bang y sobre *B. pseudotuberculosis rodentium*, sobre 16 estirpes de 22 ensayadas de *Streptococcus intestinales* y sobre dos estirpes de cuatro ensayadas de *Estafilococos*, pero no revelaron actividad sobre el grupo *coli-tífico*.

Al referirse a la acción de la lisozima contenida en los esputos o lágrimas sobre bacterias aisladas del cuerpo humano, ya dice que la tabla que presenta es incompleta y que:

it may well be that by altering the conditions of the experiment somewhat, a much higher percentage of the bacteria will be dissolved.

También quiero reproducir por su interés las siguientes líneas:

«It was noticed that with different microbes, different fluids in their lysozyme-content did not always bear the same ratio to one another. Thus, while tears were apparently the most powerfully lytic to M. ly-

sodeikticus, they had a less powerful lytic effect on some other cocci than had sputum or synovial fluid. This may be the explanation of the immunity of certain tissues to certain infections, or conversely the well-known predilection of certain infections for certain tissues.»

«The view has been generally held that the function of tears, saliva and sputum, so far as infections are concerned, was to rid the body of microbes by mechanically washing them away. Metchnikoff in his treatise on "*Immunity and Infectious Disease*", expresses himself very clearly and precisely on this point. From the experiments detailed above, however, it is quite clear that, these secretions, together with most of the tissues of the body, have the property of destroying microbes to a very high degree.»

El trabajo en el que dio cuenta Fleming del descubrimiento de la Lisozima, y que he analizado a grandes rasgos, es ordenado, claro, preciso, detallado y donde cada frase es una observación. *Multa paucis*—mucho en pocas palabras. Es una pieza didáctica magistral, que me atrevo a calificar por su sencillez y por lo que enseña como *trabajo modelo*. He reproducido gran número de los experimentos que en él describe Fleming y los puede reproducir cualquier buen estudiante de Bacteriología, pues el material que contiene la lisozima: lágrimas, exudado nasal, saliva, esputos, cartílago, clara de huevo, etc., así como el germen de prueba *Micrococcus lysodeikticus* están al alcance de cualquiera (*).

Y anticipo al que nunca ha ensayado la acción de las lágrimas o de la clara de huevo sobre el *M. lysodeikticus*, que quedará profundamente impresionado ante la rapidez de su lisis y al recomendar hagan dicho ensayo, me viene el recuerdo de mi primera visita a Sir Alexander el 21 de diciembre de 1945, en el St. Mary's Hospital en Londres, cuando me dijo:

«La acción de la lisozima es mucho más espectacular que la de la penicilina, y lo verá usted en seguida. Aquí tenemos una placa en la cual puede apreciar colonias de color amarillo-limón; son las de *Micrococcus lysodeikticus*.»

Tomó con asa de platino flameada y enfriada cierta cantidad de dicho microbio y la suspendió en disolución de cloruro sódico estéril; la suspensión así preparada estaba turbia y la repartió por partes iguales en dos peque-

(*) En mis ensayos sobre actividad lisozímica además del *M. lysodeikticus* de Fleming, he empleado también el llamado *Coccus P.* aislado por Beumer del aire, y que me facilitó el Dr. L. Colobert, distinguido bacteriólogo francés que ha realizado interesantes investigaciones sobre la lisozima y quien refiriéndose al *Coccus P.* dice así:

«Elle est très voisine de *Micrococcus lysodeikticus* et possède, comme cette dernière, les caractères génériques de *Sarcina flava* dont elle semble constituer une variété» (2).

También pueden emplearse como germen de prueba estirpes lisozim-sensibles de *Sarcina lutea*.

nos tubos que los introdujo en un baño maría regulado a 45° C. Entonces me dijo:

Necesito material que contenga lisozima: lágrimas.

Yo le vi hacer una maniobra como para tomar de sus propios ojos e inmediatamente le dije: *Here I am* («Aquí estoy yo. Tome de mí»). Flameó una pipeta fina, fundió su borde y cuando ya estaba fría, se acercó hacia mí. Yo estaba en ese momento sentado; quizá me vio algo nervioso y me dijo: *I will not hurt you* («No le voy a lastimar»). Tomó un poco de mis lágrimas e introdujo una gotita en uno de los tubitos que contenía la suspensión del *M. lysodeikticus*. Dejó pasar unos treinta segundos y entonces sacó ambos tubos del baño maría y me los mostró y pude apreciar con asombro que el contenido del tubo que había recibido la gotita de lágrimas estaba perfectamente claro, lo que indicaba que la lisozima de mis lágrimas había disuelto a las células del *M. lysodeikticus*. El tubo testigo estaba turbio como al principio del ensayo.

¿Qué le ha parecido la rapidez de la acción de la lisozima? me preguntó el Maestro. En efecto —le contesté—, ha sido algo tan espectacular que nunca olvidaré.

En la época del descubrimiento de la lisozima trabajaba en el pequeño laboratorio de Fleming, Mr. V. D. Allison, que disfrutaba por entonces del *Research Scholarship* del *Institute of Pathology and Research* del *St. Mary's Hospital* (*). Mr. Allison se contagió del entusiasmo de Fleming y muy pronto cooperó con él en las investigaciones sobre lisozima y juntos publicaron en 1922, 1924 y 1927 los siguientes trabajos:

1. *Observations on a bacteriolytic substance («Lysozyme») found in tissues and secretions.* «Brit. J. Exp. Path.», 3, 252 (1922).
2. *Further Observations on a Bacteriolytic Element found in Tissues and Secretions.* «Proc. Royal. Soc. B.», 94, 142 (1922).
3. *On the antibacterial power of egg-white.* «Lancet», I, 1303 (1924).
4. *On the development of strains of bacteria resistant to lysozyme action and the relation of lysozyme action to intracellular digestion.* «Brit. J. Exper. Path.», 8, 214 (1927).

Voy a referirme brevemente a dichos trabajos.

En el primero se señala la gran estabilidad de la lisozima y su insolubi-

(*) Hacia finales de 1922, Mr. Allison recibió a *Beit Memorial Research Fellowship* por tres años para proseguir las investigaciones sobre lisozima y además de los cuatro trabajos sobre dicha enzima en colaboración con Fleming publicó otros dos más y su tesis doctoral dirigida por el profesor Fleming llevó por título *Lysozyme, A Bacteriolytic Element present in Tissues and Secretions*.

lidad en la acetona, disolvente que precipita sin inactivar a la enzima de los materiales que la contienen y emplearon acetona para deshidratar los diferentes tejidos y órganos que después de secos se conservan con su actividad lisozímica inalterada durante mucho tiempo.

Dan cuenta de que los huevos de *Pike* —lucio— tienen lisozima, de que las meninges poseen elevada actividad, pero en cambio el tejido cerebral —*brain tissue*— tiene actividad muy débil y que no hay lisozima en las heces normales.

Observaron que después de la disolución de gran número de células de *Micrococcus lysodeikticus* hay aumento del contenido lítico del fluido y ello depende del número de células del microbio disueltas, lo que les hace decir:

It appears, therefore, that the lysozyme acts on the bacteria in such a way that there is liberated from them a lytic substance to the same strain of bacterium.

Este aumento del poder lítico después de la disolución de gran número de células microbianas les recuerda algo el fenómeno de la lisis por el bacteriófago, pero establecen diferencia entre lisozima y bacteriófago, ya que la acción de este último es relativamente lenta y sólo se ejerce sobre bacterias jóvenes y activas, en tanto que la acción de la lisozima es muy rápida, muy espectacular y la lisis tiene lugar tanto frente a células vivas como muertas del *M. lysodeikticus*. Además, con la lisozima les fue imposible la *transmisión en serie de la lisis*, como se logra con el bacteriófago y en los cultivos de *M. lysodeikticus* en medio sólido, con la lisozima no se aprecia nunca las pequeñas áreas redondas de lisis tan características de la acción del bacteriófago (*).

En este trabajo mencionan a R. Turró, que señaló la presencia de sustancias bacteriolíticas en los tejidos animales, pero apoyándose en que según Turró la sustancia lítica en los leucocitos no es estable y que en cambio sí lo es la lisozima, piensan que no es lisozima la sustancia lítica de Turró (**).

(*) Es interesante consignar que hace pocos años, en 1958, se ha demostrado que ciertos fagos —ignoro si todos— utilizan una lisozima para perforar por disolución la pared de la célula bacteriana y luego inyectar el material genético fágico en el interior del citoplasma bacteriano (3). También se estima que se elabora lisozima en el interior de la bacteria —parasitada por el fago— al mismo tiempo que se forman los nuevos fagos y esta lisozima sintetizada *de novo* interviene en la disolución, estallido, de la pared de la célula bacteriana en el momento de liberarse los viriones e incluso se ha conseguido la síntesis *in vitro* de la lisozima del bacteriófago (4).

(**) Pero por la referencia que dan de Turró (C. R. Soc. Biol. Vol. 84, 1921), deduzco que no consultaron los trabajos del ilustre investigador y pensador catalán Ramón Turró, publicados en los comienzos del siglo, y en donde ya se ocupa nuestro compatriota de la *actividad bacteriolítica de diversos extractos de órganos* y también de la *clara de huevo*. Se puede estimar que al menos parte de la actividad de los extractos de órganos preparados por Turró fuera debida a su contenido en lisozima.

En las conclusiones dicen así:

«This lytic substance is especially active towards some non-pathogenic bacteria (and in all probability it is the cause for such bacteria being non-pathogenic), but it is active also on certain pathogenic species. So far as the indicator microbe (*M. lysodeikticus*) is concerned lysozyme is present in greatest amount in such secretions as tears, nasal mucus and sputum; in the tissues especially in the cartilage; while it is present in very large amount in egg-white.»

Y agregan:

«It may be noted that it is in just such situations that protection from bacterial contamination is required. The conjunctiva is constantly coming in contact with air-borne bacteria, as also is the nasal mucous membrane and the lining of the air —passages, and it is in the secretions covering these membranes that the lytic substance is present in greatest abundance. Cartilage also is lacking in the protection which normally comes from an abundant blood supply, while has little protection, from contamination other than its inherent anti-bacterial power.»

En el trabajo 2 dan cuenta de haber obtenido con facilidad estirpes de *M. lysodeikticus* resistentes a la lisozima y de que dicha resistencia no es específica porque el *M. lysodeikticus* resistente al mucus nasal es resistente a cualquiera de los materiales que contienen lisozima, sea hígado, lágrimas, clara de huevo, nabo, etc., de donde deducen:

«This would seem to show, therefore, that the lysozyme (affecting the *M. lysodeikticus*) contained in such widely different substances as liver, tears, egg-white and turnip is essentially the same.»

En este trabajo emplearon para estudiar la resistencia cruzada la técnica del *streak method*, que años después la utilizaría Fleming en sus investigaciones con su *Penicillium*.

El trabajo número 3 está dedicado al estudio del poder antibacteriano de la clara de huevo.

Mencionan a Laschtschenko (1909) y a Rettger y Sperry (1912), quienes habían señalado que la clara de huevo tiene propiedades antibacterianas, pero sin demostrar claramente su extraordinaria actividad y sin que establecieran conexión entre dicha actividad y la acción similar de los tejidos y secreciones de aves y otros animales.

Ensayaron la actividad bacteriolítica de las claras de huevo de varias aves: gallina, *trush* (zorzal), *wagtail* (lavandera) y *moor-hen* (polla de agua) y observaron que todas tenían actividad, pero que la más activa era la clara de huevo de gallina.

La clara de huevo de pata posee actividad lítica del mismo orden que la de la gallina.

En estas determinaciones emplearon la técnica de los pocillos en medio sólido que luego utilizó A. Fleming en sus investigaciones sobre la penicilina.

Señalaron que la lisozima podía ser precipitada por el etanol y del precipitado, separado y desecado, se podía extraer la sustancia activa con disolución salina fisiológica.

La actividad de la clara de huevo de gallina fue investigada frente a bacterias aisladas del cuerpo humano y hallaron que a la dilución de 1 en 10 producía bacteriolisis casi completa del *meningococo* y parcial del *B. diphtheriae*, y a la dilución de 1 en 100 bacteriolisis parcial del *B. anthracis* y del *B. pyocyaneus*, *B. paratyphosus A y B*, y *B. dysenteriae* (Flexner) y que dicha clara tenía marcado efecto bactericida sobre *Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis* y *B. coli* y menor actividad, pero patente, frente a *B. typhosus*, *vibrión cólerico*, etc.

La susceptibilidad de los organismos fecales y especialmente de los *Streptococos* a la acción bacteriolítica de la clara de huevo de gallina les condujo a investigar si tomada por vía oral ejerce algún efecto sobre los estreptococos del intestino, pero antes averiguaron que ni la digestión péptica ni la triptica tenían efecto nocivo frente a la lisozima contenida en dicha clara.

Luego escogieron a un individuo cuyas heces habían sido examinadas muchas veces y siempre acusaba preponderancia de *Streptococci* en los cultivos. Se le administró dos claras de huevo dos horas antes del desayuno y por la noche otras dos claras cuatro horas después de la última comida. Ensayaron la actividad lítica de las heces, previamente deshidratadas con acetona y observaron la presencia de sustancia lítica a partir del tercer día y hasta el final del tratamiento. Antes de la ingestión de la clara de huevo esas heces no revelaban ninguna actividad lítica.

A continuación reproduzco las siguientes líneas:

«Clinically we have recommended the ingestion of egg-white to a considerable number of patients who had a large number of streptococci in the faeces and who suffered from feelings of lassitude, headache, etc., which so often accompany a streptococcal intestinal flora. In most cases they have reported a very definite temporary improvement in their symptoms. This may, of course, have been merely a psychological effect, or it may have been a temporary action on the streptococci.»

Observaron también utilizando la técnica del *slide cell*, con la que tan familiarizado estaba A. Fleming, que la clara de huevo, en marcado contraste con los antisépticos químicos, no ejercía efecto destructivo sobre los leucocitos y que mezclada con la sangre a una concentración final de 1 por 100 inhibía

completamente al *Strep. faecalis* y permitía solamente un escaso desarrollo de organismos tales como *Staphylococci* y *B. diphtheriae*.

Este hecho de que la clara de huevo mezclada con sangre tenía propiedades antibacterianas bien patentes les condujo a investigar el resultado de la inyección intravenosa de dicha clara y observaron que confiere al suero sanguíneo del animal tratado marcado poder antibacteriano.

Veamos lo que concluyen:

«No ill-effects followed the injection into the rabbit of sufficient egg-white (suitable diluted) to make in the blood a concentration of almost 1 per cent., and it is possible that in cases of a generalised infection with a microbe susceptible to the bacteriolytic action of egg-white-e. g., *Streptococcus faecalis*-the intravenous injection of a solution of egg-white might be beneficial.»

El trabajo núm. 4 trata del desarrollo de estirpes de bacterias resistentes a la lisozima y de la relación entre la acción de la lisozima con la digestión intracelular.

La resistencia a la lisozima no es específica y las bacterias resistentes a un tejido lo son también en mayor o menor grado a la acción de los otros.

Micrococcus lysodeikticus y *Strep. faecalis* hechos resistentes a determinados tejidos lo son también a la acción de la lisozima de la clara de huevo, y por resiembras repetidas en concentración cada vez mayor de ésta, se logran cepas considerablemente resistentes a la acción bacteriolítica de la lisozima y al mismo tiempo adquieren resistencia al poder bactericida de la sangre y a la digestión intracelular por los leucocitos.

Pensaron que el aumento de resistencia quizás fuera acompañado de aumento de virulencia, pero es el caso que los gérmenes *M. lysodeikticus* y *Strep. faecalis* con los que realizaron la investigación no eran virulentos y por eso no pudieron observar aumento de virulencia.

Es interesante reproducir de dicho trabajo las líneas que siguen:

«Having shown that the strains of streptococci which had been made resistant to egg-white are less susceptible to the bactericidal power of the blood, it was interesting to see whether they were also less susceptible to intracellular digestion than were the normal cocci. Bacterial suspensions of agar cultures of the normal and resistant strains were made. These were mixed with equal volumes of normal human defibrinated blood and incubated for 3 hours at 37° C, in capillary tubes, after which films were made and stained and the state of the bacteria inside the leucocytes was observed.»

«There was found to be much more intracellular digestion of the normal strain than there was of the resistant strain...»

«This phagocytic experiment was made in 1924, and the cultures were put aside and not opened for two years, when subcultures were made and a similar phagocytic experiment was performed with the same result,

showing that the streptococci which had been made resistant to the lysozyme of egg-white, had maintained their resistance to intra-cellular digestion by human leucocytes for two years.»

«From these results it would appear that there may be some connection between the bacteriolytic power of egg-white and the power of leucocytes to digest microbes which have been phagocytized; in other words, the intracellular digestion of bacteria by leucocytes may be due to a ferment similar to that which we have described as occurring in many animal secretions and tissues, and which we have called lysozyme.»

El trabajo anterior fue entregado para su publicación el 5 de abril de 1927 y poco más de un año después, el 8 de junio de 1928, Mr. Frederik Ridley, *Research Student* en el Sr. Mary's Hospital, que realizaba investigaciones sobre la lisozima bajo la ayuda y consejo de Fleming, presentó en la Sección de Oftalmología de la *Royal Soc. of Medicine* un trabajo titulado *Lysozyme: An Antibacterial Body present in Great Concentration in Tears and its Relation to Infection of the Human Eye* (5).

Del trabajo de Ridley reproduzco las líneas que siguen:

«It follows from these experiments that an eye whose tears contain a normal concentration of lysozyme is immune to infection by the staphylococci, streptococci, pneumococci, or cholera tested. It will be recalled that among other pathogenic bacteria the *gonococcus*, *meningococcus* and *B. anthracis* are readily killed by a concentration of Lysozyme equal to that of tears. Thus, normal tears present a barrier to infection by any of these organisms. The tubercle bacillus which is not dissolved is nevertheless killed by a concentration equal to twice tears, as was shown by Wolff.»

Refiriéndose a un enfermo estudiado y tratado por él, Ridley dice:

«This case indicates, firstly, that a chronic infection may invade a previously immune tissue area if the lysozyme titre in that area falls below 50 per cent., secondly, that the lachrymal gland is able to maintain the titre of its secretion to only limited extent in epiphora, and thirdly, that recovery, from an infection is accompanied by a return to the normal titre of lysozyme.»

Y las últimas líneas del trabajo de Ridley son:

«Nature does provide, especially in the tears, a very efficient antibacterial substance, lysozyme, to which must be attributed an important rôle in the prevention of, and recovery from, bacterial infection.»

Al final de la comunicación de Ridley, el Prof. Fleming intervino, pero solamente reproduciré su profecía final:

«Wolff in Holland (*), isolated this ferment from egg-white, and obtained in many times stronger than the natural occurring secretion. Therefore it was possible that in the future this ferment would be at disposal of the profession in a highly concentrated form, in which it could be used for the treatment of infections.»

En «The Lancet», 2 de febrero de 1929, pág. 217, se publicó la conferencia que pronunció el profesor Fleming en *The Royal College of Surgeons of England: Arris and Gale Lecture on Lysozyme. A Bacteriolytic Ferment found normally in tissues and secretions.*

Se trata de una exposición magistral y entre las muchas observaciones interesantes de que da cuenta describe una técnica muy sencilla para observar la rapidez de acción de los materiales con lisozima y que consiste en: Colocar separadamente sobre la superficie de un cultivo de *M. lysodeikticus* bien desarrollado sobre medio sólido tres gotas: una de lágrimas, otra de clara de huevo y la tercera de disolución fisiológica salina; ahora se bascula un poco la placa para que las gotas se deslicen por la superficie en líneas separadas; un minuto después la zona opaca del *M. lysodeikticus* se habrá transparentado debajo de las estrías de las lágrimas y de la clara de huevo y estará inalterada por donde se ha deslizado la disolución salina.

También describe una experiencia con sangre y otra con pus para demostrar que existe lisozima en los leucocitos (**), en elevada concentración y señala que según Ridley tal concentración es del mismo orden que la concentración en las lágrimas.

Refiriéndose a los tejidos del *pike* —lucio— indica que son ricos en lisozima y que su cartílago posee casi la misma actividad que el cartílago humano.

En cuanto a las lágrimas del conejo, caballo, oveja y pavo señala que su actividad lisozímica es unas 30 veces menor que la de las lágrimas humanas frente al *M. lysodeikticus*.

Describe la técnica de abrir un canal en el agar nutritivo, rellenarlo con agar que contenga el material con lisozima y sembrar luego en ángulo recto los gérmenes para investigar su sensibilidad a la lisozima, que es precisamente una de las técnicas que empleó años después en sus investigaciones sobre la penicilina.

Al ocuparse de la relación de la lisozima con la inmunidad natural insiste

(*) Se refiere Fleming a L. K. Wolff, del Instituto Farmacoterapéutico de la Universidad de Amsterdam, quien en 1927 publicó dos trabajos sobre la lisozima en *Zeitschrift für Immunitäts-forschung und experimentelle Therapie*, 50, p. 88 y 54, p. 188, en los que dio cuenta de su técnica a base de hidróxido de hierro coloidal para concentrar y purificar la lisozima de la clara de huevo, y con el producto obtenido demostró que a determinada concentración la lisozima es activa frente a *B. anthracis*, *Estafilococo*, *Strep. hemolítico*, *Meningococo*, *Gonococo* y *B. de Koch*.

(**) Hoy se estima que la lisozima está localizada en los lisosomas de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (A. C. Allison, *The Lysosome*. Discovery, July, 1965).

en lo que viene defendiendo desde su primer trabajo, es decir, que la *lisozima* es un importante factor de inmunidad natural.

Reproduzco sus líneas:

It seems hardly likely that the human body should have been endowed with such a powerful antibacterial power unless it were of use. The wide distribution of lysozyme in the cells of the tissues and organs rather suggests that this antibacterial agency is one of the primal protections of the cell against bacterial invasion, while its great concentration in certain tissues and secretions indicates that its elaboration or secretion has become especially enhanced in certain regions which are particularly exposed to infection or which are lacking other means of protection.

El 20 de mayo de 1931 dio A. Fleming una conferencia en *The Royal Dental Hospital* sobre *Some Problems in the Use of Antiseptics*, que se publicó en *The British Dental Journal*, vol. 52, pág. 105 (1931) y en ella, entre otros temas de gran interés, trató del *Efecto de los antisépticos químicos sobre el mecanismo normal de protección*, y resaltó la acción destructiva de varios antisépticos, tales como *eusol*, *cloramina T*, *yodo*, etc., sobre la lisozima.

Este trabajo tiene además especial interés porque desde la publicación en 1929 de su descubrimiento de la penicilina, es la primera vez que habla Fleming de la lisozima y de la penicilina en un mismo trabajo y además porque refiriéndose a la penicilina hace esta profecía:

«It is quite likely that it, or a chemical of a similar nature, will be used in the treatment of septic wounds.»

En 1932 el profesor Fleming escogió la lisozima como tema del Discurso Presidencial en la Royal Society of Medicine. (*Proc. Roy. Soc. of Medicine December, 1932, v. XXVI. Section of Pathology, p. 1-14.*)

Para reflejarles la impresión que le produjo a Fleming el fenómeno lítico, punto de arranque de sus investigaciones sobre la lisozima, voy a transcribir de dicho discurso las siguientes líneas:

«Bacteriolysis of this sensitive test-coccus (se refiere a su M. Lyodeikticus) by lysozyme is certainly the most dramatic method of bacteriolysis I have ever seen...»

«Such rapid and complete lysis was quite strange to me until I worked with lysozyme.»

Al señalar que la digestión intracelular de bacterias por leucocitos puede ser acción lisozímica, dice así:

«That intracellular digestion is associated with lysozyme is supported by certain facts. I-As above stated, streptococci —se refiere a faecal streptococci —artificially made resistant to lysozyme are less suscepti-

ble to intracellular digestion. 2-Bacteria which are susceptible to lysozyme are susceptible also to intracellular digestion.»

«I do not want to lay down that all intracellular digestion is lysozyme action... However, it seems almost impossible to deny that lysozyme plays some part in the process.»

Da cuenta de la presencia de lisozima en bacterias de esta forma:

«A bacterium was found (—a contaminating air coccus—) which had considerable lytic power on the coccus. The lytic substance diffused through the agar from the colony so that, for some distance around, *M. lysodeikticus* was completely inhibited or, if it had already grown, it underwent solution. This, lytic element was present in the extracts of the coccus, and had all the properties of lysozyme. A three-day extract of the lytic coccus was powerful enough, in a dilution of 1 in 250, to clear completely an opaque suspension of *M. lysodeikticus* in eighteen hours at 45° C.»

Y saca esta conclusión:

«It is probable that lysozyme is present in many bacteria, but not extensive investigations of this point have yet been made.»

Da cuenta de la presencia de lisozima en la leche de vaca, aunque no en proporción elevada y refiere que ya J. y M. Bordet habían demostrado la presencia de dicha enzima en la leche humana.

Al ocuparse de la acción bacteriolítica de los extractos de tejidos de estómago, intestino, páncreas, piel, etc., hace nueva alusión a Turró, pero refiriéndose solamente a los trabajos de este investigador publicados en 1921, y dice así:

«This bacteriolitic action of tissue extract was investigated by Turró (1921). He did not give sufficient details to enable one to say whether or not the lytic substance he was working with was the same as lysozyme. He did state, however, that bacteriolytic power of the tissues was rapidly lost, either in the fluid extract or in dry power. This is in marked contrast with lysozyme, which is very stable, and which as I have already shown you, persists apparently without loss for ten years» (*).

Dio cuenta de que había estudiado el efecto de materiales que contenían lisozima por el método del *slide-cell* utilizando sangre como medio de cultivo y agrega:

(*) Se refiere Fleming a que huevos de *Pike* deshidratados con acetona y desecados en 1922 seguían mostrando actividad lisozímica en 1932.

Años después vio que ese mismo lote de huevos revelaba actividad en 1952.

«Although blood itself contains lysozyme, it is the same blood in the control cells and in those to which additional lysozyme is added, so that the effect of the added lysozyme can be estimated.»

Y a continuación presenta los resultados de la acción de la clara de huevo a diferentes diluciones sobre *Pneumococo*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus* y *B. diphtheriae*

También dio cuenta de investigaciones en *slide-cells* con suero o líquido hidrocélico, infectado con estafilococos con o sin lágrimas o clara de huevo, y comenta así:

«It is to be noted that in staphylococcal tests, tears are more powerful than egg-white, whereas *M. lysodeikticus* is much more sensitive to egg-white than to tears.»

«These experiments show that lysozyme-containing material such as tears or egg-white, have an antibacterial effect on some well-known pathogenic bacteria.»

Refiriéndose a la lisozima de la piel dice así:

«There is no question that the skin contains lysozyme and this is not confined to the deeper layers of the skin.»

Si a una suspensión de *M. lysodeikticus* se le adicionan algunas raspaduras de la superficie de la piel, o de un callo, o trocito de uña, se observa después de una hora de incubación que la suspensión opaca se ha aclarado completamente.

Es una experiencia que Fleming acostumbraba a practicar con sus alumnos y la comenta así:

«When they find that after about one hour the bacteria have completely disappeared they are very much impressed, especially as they have recently come from the hands of the physiologist who has taught them that the finger-nails consist of inert tissue.»

Y agrega: pero es evidente que las capas superficiales de la piel deben tener algún mecanismo para destruir bacterias, ya que continuamente estamos ensuciando las manos y dedos con muchas bacterias y en ocasiones ponemos un dedo en la boca y continúa:

«But how often can one obtain a mouth organism from scrapings from the finger?»

Fleming observó que extractos de piel tienen efecto lítico considerable sobre algunas bacterias patógenas.

Y para terminar con este brevísimos análisis del memorable discurso del profesor Fleming, reproduciré las siguientes líneas que claramente nos revelan que parecía estar convencido de la existencia de diferentes lisozimas:

«It has been shown, however, that the lysozyme of different tissues and secretions has quite varied antibacterial powers toward different microbes, and it seems that there are some differences in the antibacterial ferments (which we may call lysozymes) of different tissues whereby the bacterial affinities may be very different.»

En 1936 se celebró en Londres el Segundo Congreso Internacional de Microbiología y el discurso de apertura de la Sección I (*Biología General de Microorganismos*), estuvo a cargo del profesor Fleming, y versó sobre *Selective Bacteriostasis*, y en él llamó la atención de los congresistas sobre la lisozima y también sobre la penicilina.

Quiero señalar que en ese mismo año de 1936, época en que aún no estaba consagrada la penicilina, pues los primeros trabajos de Florey, Chain y demás colaboradores, que dieron realidad terapéutica a la penicilina, no se publicaron hasta 1940 y 1941, y por lo tanto Fleming no tenía la fama internacional que alcanzó después, y solamente era conocido por los especialistas en Bacteriología e Inmunología, el profesor Melnik, director del Instituto Metchnikoff en Kharkov-Ukrania, publicó un trabajo sobre la lisozima (6), que lo he podido consultar por estar en inglés, en el cual destaca la importancia del descubrimiento de la lisozima y hace un cumplido elogio de A. Fleming y termina así:

«Does lysozyme play any role in natural immunity? Fleming answers this question positively. We presume that Fleming is right. Being the sole factor of natural resistance of the body against infection there is no doubt that lysozyme plays a definite role in the protection of the body. This is proved among other, by the therapeutical efficiency of lysozyme in various diseases when there is manifested not only the direct bactericidal action of lysozyme but also the undoubted increase in resistance of the tissues to infection thanks to lysozyme.»

«Medical Science is indebted to Fleming for his discovery of extreme importance which in the future will give us valuable and interesting results.»

Fleming siempre siguió interesado en su lisozima y aún en la época de su vida a partir del 1945, que le concedieron el Premio Nobel y tantos y tantos honores y distinciones por parte de Universidades y Academias, casi siempre en sus programas de varias conferencias incluía una sobre lisozima y siempre con el mismo entusiasmo.

Con ocasión del banquete que el 25 de junio de 1945 le ofrecieron los *Penicillin-Producers* en el Waldorf Astoria (Nueva York), pronunció un breve discurso y dijo así:

«We shall here more of lysozyme some day but it served its purpose sofar as I was concerned in that when I was working with it I developed technique which was later used with penicillin and the sulphonamides,

such as the measurement of the area of bacterial inhibition from a ditch or hole in the agar plate.

El 24 de julio de 1954, en su laboratorio en St. Mary's Hospital, me dijo:

«Creo que la lisozima llegará a tener algún día importancia terapéutica.»

Buscó en su mesa un frasquito y me dijo:

«Aquí hay huevos de lucio, que los cogí en 1922; están deshidratados con acetona. Están ahí desde entonces. Ensáyelos y vea si aún tienen actividad lisozímica.»

En diciembre de ese año 1954, los ensayé y tenían actividad lisozímica, aún después de transcurridos treinta y dos años (1).

Hasta aquí he analizado el descubrimiento de la lisozima y les he dado cuenta del entusiasmo que puso el profesor Alexander Fleming en sus investigaciones sobre dicha enzima bacteriolítica capaz de lisar células vivas de determinadas bacterias. También les he indicado que el descubrimiento de la lisozima preparó su mente para el descubrimiento, siete años más tarde, en 1928, de la penicilina, producto metabólico de un moho del género *Penicillium*, que contaminó una de sus placas donde había colonias de estafilococos.

Y conviene recordar —aunque ya les he manifestado antes—, que las técnicas que empleó Fleming en sus investigaciones sobre la penicilina son las que había ingeniado y empleado en sus trabajos sobre la lisozima.

* * *

Muchos de ustedes saben que Florey, Chain y demás colaboradores completaron la obra de Fleming en relación con la penicilina y dieron realidad terapéutica a dicha sustancia, pero lo curioso es que los investigadores de Oxford antes de iniciar sus trabajos sobre la penicilina estuvieron interesados en la lisozima —en su distribución, purificación y cristalización y estudio del substrato sobre el que actúa— y publicaron varios trabajos importantes que les abrieron el camino a interesarse por el segundo gran descubrimiento de Fleming: la *penicilina*.

Revisaré, por tanto, siquiera sea muy brevemente, la participación de los científicos de Oxford en las investigaciones sobre la lisozima. Además, para destacar la enorme trascendencia del descubrimiento de dicha enzima y su repercusión en diferentes campos de la investigación bioquímica y biológica, tengo también que aludir a su química y estructura, mecanismo de acción y aplicaciones, y como son muchos centenares los trabajos publicados en relación con la lisozima, es imposible resumirlos en pocas líneas; haría

falta no un volumen sino varios volúmenes, y ello no sería empresa para una sola persona.

Por tanto me limitaré a una exposición muy sucinta de lo que estimo más fundamental.

* * *

El Dr. Howard Florey cuando estuvo en el Departamento de Patología en Cambridge ya se interesó por la lisozima, y en 1930 publicó, en colaboración con N. E. Goldsworthy, un trabajo sobre las propiedades antibacterianas del mucus (7), dando cuenta de la gran actividad lisozímica de la saliva del gato, de la nula actividad de las lágrimas del gato y buena actividad de las lágrimas, saliva y moco nasal del perro.

En un segundo trabajo, Florey informó (8) sobre la actividad lisozímica de diferentes tejidos: bazo, riñón, pulmón, etc., de mamíferos (gato, cobiya, rata, conejo, perro y hombre) y señaló la elevada actividad lítica del bazo, pulmón y riñón.

Florey deseaba identificar a la lisozima y también conocer la naturaleza del substrato sobre el que actuaba; realizó algunos experimentos preliminares con Miss M. Stephenson en Cambridge hacia 1931 y ese tema le preocupó también durante su estancia en la Universidad de Sheffield.

En 1935 Florey ya de profesor en el Sir William Dunn *School* of Pathology en la Universidad de Oxford sugirió a Mr. E. A. Houghton Roberts que tratara de poner a punto un método para la obtención de lisozima pura de la clara de huevo y en 1937 E. A. H. Roberts dio cuenta (9) de haber obtenido un producto de gran pureza y en ese mismo año E. P. Abraham, utilizando la técnica de Roberts y bajo la dirección del profesor R. Robinson en el Dyson Perrins Laboratory, también en la Universidad de Oxford, consiguió obtener por primera vez, cristalizada en rombododecaedros, la lisozima de la clara de huevo de gallina (10).

Entre tanto, y a partir de 1933 también se interesaron en la lisozima los investigadores de la Columbia University en New York, K. Meyer y su grupo, y en 1934 (11) y en 1936 (12 y 13) dieron cuenta de que la lisozima de la clara de huevo era una proteína de naturaleza básica, de bajo peso molecular, que su acción era hidrolítica y que actúa despolimerizando a un mucopéptido de las células bacterianas sensibles con liberación de azúcares reductores (*).

(*) Meyer y Hahnel en 1946 dieron cuenta de un método viscosimétrico exacto y rápido para estimar la lisozima y que el substrato podía obtenerse de *M. lysodeikticus* o de una estirpe de *Sarcina lutea* casi tan sensible como *M. lysodeikticus* a la lisozima de la clara de huevo (14).

También en 1946 Meyer, Hahnel y Steinberg dieron cuenta de la presencia de lisozima en preparados crudos de *papaina* y de *ficina* y de la actividad lisozímica del latex reciente, fresco, de *Ficus elastica*, *Ficus lyrata*, y *Euphorbia pulcherrima* (15).

Pero trasladémonos nuevamente a Oxford, donde Roberts, Maegraith y Florey hacen un estudio comparativo de las lisozimas de clara de huevo y de las salivas de gato y humana, y en 1938 dieron cuenta (16) de que los ensayos comparativos químicos y serológicos revelaban clara diferencia entre esas tres lisozimas, aunque las tres lisaban perfectamente al *M. lysodeikticus*.

En 1939 Abraham, trabajando en el *Dyson Perrins Laboratory*, en Oxford, dio cuenta de algunas propiedades químicas y físico-químicas de la lisozima amorfa de clara de huevo bastante pura pero no del todo homogénea y con una proporción de N del 16,4 por 100, y de S. del 3,2 por 100. En cuanto a los amino-ácidos determinados dieron las siguientes cifras: 11,6 por 100 de arginina, 7 por 100 de cistina, 5,8 por 100 de lisina, 4,4 por 100 de tirosina y 2,6 por 100 de histidina, señalando que la lisozima preparada por el método de Roberts es un proteína básica, con P. M. del orden de 18.000, con elevada proporción de arginina y de lisina y proporción poco usual de cistina (17).

Epstein y Chain en 1937 trabajan en el *Sir William Dunn School of Pathology*, en Oxford. El profesor Florey les sugiere como tema determinar la naturaleza del substrato sobre el cual actúa la lisozima y se consagran a él con entusiasmo pero al estallar la guerra tuvieron que interrumpirlo y el 28 de octubre de 1940 entregaron para su publicación lo que llevaban hecho (18).

Ellos demostraron que el substrato para la lisozima es un polisacárido muy polimerizado, de elevado peso molecular, que la acción de la lisozima es hidrolítica y que durante la hidrólisis se libera una N-acetilaminohexosa y una sustancia que da las reacciones de ceto-hexosa.

El substrato para la lisozima lo aislaron del *M. lysodeikticus*, pero observaron que existe en todas las bacterias lisozim-sensibles. El *Bacillus subtilis* que no se disuelve por la lisozima es rápidamente matado por ella, lo cual demostraron por la inhibición completa e instantánea de la respiración de una suspensión de células después de la adición de lisozima y por el hecho de que la suspensión bacteriana estaba esterilizada después de una hora de incubación con lisozima.

Y hacen el siguiente comentario:

«This observation is important in that it shows that lysozyme sensitivity of bacteria cannot be established by observation of lysis only.»

Y más adelante:

«Substrate was found in all organisms sensitive to lysozyme, the largest amount being present in the non-lysable B. subtilis.»

Al despolimerizarse el polisacárido insoluble de las células bacterianas por la acción hidrolítica de la lisozima se producen sustancias hidrosolubles

y este proceso puede ir acompañado de lisis en algunas bacterias en las que el polisacárido es elemento esencial de su estructura morfológica. En otras bacterias también lisozim-sensibles, tales como *B. subtilis* y *B. anthracis*, la hidrólisis del polisacárido no va acompañada de manifestaciones de lisis y según Epstein y Chain:

«In these organisms the maintenance of their morphological structure does not depend exclusively on the unaltered state of the substrate for lysozyme, but this substance must still have functions of vital importance for the life of the organisms, since its hidrolisis leads to their immediate death.»

En 1945 Alderton, Ward y Fevold dieron cuenta (19) de un método relativamente sencillo para, a partir de clara de huevo de gallina, obtener con buen rendimiento lisozima bastante pura y es el método que en líneas generales se sigue para la producción industrial de dicha enzima, que se puede adquirir pura de Armour and Co, (U. S. A.).

El disponer de lisozima pura en cantidad ha permitido estudiar con más especificidad y con más rigor su espectro de acción frente al mundo microbiano, ya que en los extractos de órganos y tejidos y en las secreciones y en la misma clara de huevo puede haber sustancias anti-bacterianas diferentes de la lisozima.

AMPLITUD DEL ESPECTRO ANTIBACTERIANO DE LA LISOZIMA

Aunque no son muchas las especies bacterianas directamente lisables por la lisozima, hoy se sabe que el sustrato para dicha enzima está ampliamente distribuido en el mundo bacteriano y por distintos procedimientos, estudiados por diversos investigadores, y que no voy a especificar aquí, se puede sensibilizar a muchas especies bacterianas para que puedan ser lisadas por la lisozima.

Las bacterias Gram negativas, en general, no se lisan por la lisozima por los métodos usuales, pero el profesor S. R. Hartsell y su grupo de la Purdue University demostraron en 1955 (20) que muchas bacterias Gram negativas poseen sustrato para la lisozima; pero, para observar el fenómeno de la lisis tuvieron que recurrir a la *técnica de Nakamura* sometiendo a las células primero de la acción de la lisozima a un pH 3,5 a 45° C durante una hora y luego al alcalinizar cuando se eleva el pH a 9,8 se produce la lisis (*efecto Nakamura*). Entre las especies Gram negativas que estudiaron señalan como las más sensibles las de los géneros *Salmonella* y *Brucella* —aunque la sensibilidad varía dentro del género según las especies y que poseen sensibilidad menor que las anteriores las especies de los géneros *Klebsiella*, *Shigella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Escherichia*, etc.

Roy Respake en 1956 dio cuenta (21) que *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii* se pueden lisar por la lisozima a pH 7,5 a 8 con el empleo de versene (EDTA) y *Tris buffer*.

El Dr. L. Colobert, de Lyon, en 1958 (22) logró la lisis de *Salmonellas* patógenas después de deslipidación parcial de su pared externa. De sus conclusiones reproduzco lo que sigue:

«Le lysozyme ne provoque pas la lyse des salmonelles, à moins que celles-ci n'aient subi un traitement préalable par chauffage, par l'acide éthylène diaminetétracétique, ou un alcoylsulfate. Ces trois traitements ayant en commun la propriété de délipider les bactéries, on a été amené à formuler l'hypothèse que la présence d'une fraction lipidique dans la paroi bactérienne masque normalement le substrat spécifique de l'enzyme.»

S. E. Hartsell en su comunicación al Primer Simposio Internacional sobre la lisozima dio cuenta (23) de que la acción concomitante del butanol con lisozima permite también obtener la lisis de diversas *Salmonella* y *E. coli* y que *Mycobacterium* habitualmente refractarios —el *Mycob. phlei* se lisa fácilmente—, tales como *M. friedmanii*, *M. lacticola*, *M. piscicum*, *M. ranae*, *M. smegmatis*, *M. stercoris*, *M. tammopheos* y *M. marinum* (24) se lisan fácilmente por la lisozima si son tratados previamente por una mezcla a partes iguales de metanol y dietileter, aunque nunca se llega a la clarificación total de las suspensiones.

LISOZIMA BACTERIANA Y BACTERIOLISIS

Anteriormente he indicado que en 1932, en su discurso en la Royal Society of Medicine, Fleming dijo:

It is probable that lysozyme is present in many bacteria.

Desde entonces son muchos los investigadores que han estudiado la producción de enzimas líticas, lisozima u otras por diversas bacterias. Con fecha 9 de octubre de 1956 me escribió el Dr. M. H. Richmond, informándome que una estirpe de *Bacillus subtilis* aislada por él del suelo producía lisozima y la excretaba al medio de cultivo, era activa frente a células intactas, células muertas por el calor y preparados de paredes celulares de *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Sarcina flava*, *Sporosarcina ureae* y *Micrococcus lysodeikticus* (25).

Mitchell y Moyle en 1957 (26) reconocieron la presencia de una enzima lítica en una suspensión desintegrada de *Staphylococcus aureus* y que era capaz de disolver las paredes celulares purificadas de *M. lysodeikticus*.

Strange y Dark (1957) (27, 28) descubren que *B. cereus* produce enzima lítica (*lysozyme-like*).

Richmond en 1959 observa que la estirpe 524 de *Staphylococcus aureus* produce, en medio de cultivo sintético, enzima lítica que se difunde al medio de cultivo y que es capaz de disolver las células y las paredes celulares aisladas de *M. lysodeikticus*. Preparado crudo de dicha enzima era inactivo sobre suspensión de células intactas de la estirpe de estafilococo que la había producido, pero era capaz de disolver completamente las paredes celulares aisladas de dicha bacteria (29).

El profesor M. Welsch, autoridad mundial en bacteriolisis, en un trabajo (30) publicado en 1959, dice en las conclusiones:

La production d'enzymes bactériolytiques, vraisemblablement apparentés au lysozyme, est une propriété très fréquente, peut-être générale, chez les staphylocoques.

Hawiger en 1968 (31) dio cuenta de la purificación y del estudio de las propiedades de la lisozima producida por *Staphylococcus aureus*.

Está, por lo tanto, demostrado que muchas especies del género *Bacillus*, muchas estirpes de *Staphylococcus aureus*, muchos *actinomicetos* y sin duda alguna también otras bacterias, producen lisozima, pero hay que tener presente que las bacterias, además de lisozima, producen o pueden producir otras enzimas líticas capaces de actuar sobre sustratos diferentes del de la lisozima. Por ejemplo, la enzima *estreptolítica* de Mc Carty producida por *Streptomyces albus* que no lisa al *M. lysodeikticus* y sin embargo disuelve las paredes purificadas de *Streptococcus hemolítico grupo A*, que son de naturaleza química diferente —contienen *ramnosa*— a la pared del *M. lysodeikticus* (32).

De la *actinomicetina*, nombre dado por M. Welsch a los filtrados bacteriolíticos de ciertos *actinomicetos*, se han aislado: la *actinozima*, que lisa bacterias Gram negativas tratadas por el calor, y dos *actinolisopectidasas*, estudiadas por Ghuysen y Salton, que actúan no sobre el componente polisacárido de la pared de la célula bacteriana, sino sobre el componente peptídico (33).

Recuerdo que en cierta ocasión el profesor Fleming me dijo que la penicilina no fue la causa *directa* de la lisis del estafilococo en la placa original, punto de partida del descubrimiento de la penicilina, sino que el estafilococo se autolisó. Al tener conocimiento por las investigaciones a que antes me he referido —posteriores al fallecimiento de Sir Alexander—, que frecuentemente los estafilococos producen lisozima, he pensado si la lisozima de los estafilococos de la placa de Fleming no intervendría en el fenómeno de lisis que llamó su atención cuando tuvo la contaminación por el *Penicillium notatum*.

El estafilococo es un germen que se autolisa con relativa facilidad como

respuesta a multitud de agentes, pero la lisozima del estafilococo por sí sola no es la causa del fenómeno, ya que no tiene efecto lítico sobre estafilococos vivos ni muertos por el calor, pues la presencia en la pared de los estafilococos de *ácidos teicoicos* la protegen de la acción lítica de la lisozima. Pero la lisozima sí puede actuar sobre la pared del estafilococo si previamente otras enzimas que forman parte de la maquinaria enzimática del propio estafilococo —o de otro origen— separan de la pared del estafilococo a los ácidos teicoicos.

En resumen: se puede admitir que la lisozima del estafilococo participa juntamente con otras enzimas del propio estafilococo en el fenómeno de su autólisis y que en la placa de Fleming, la penicilina interfiriendo con la última etapa en la biosíntesis de la pared celular de las células en proliferación *fue la inductora de la autólisis* del estafilococo.

Los procesos de bacteriolisis y de autólisis son de gran complejidad, pero de extraordinario interés biológico (34, 35).

APLICACIONES DE LA LISÓZIMA EN EL CAMPO DE LA BACTERIOLOGÍA

La lisozima al disolver las paredes celulares de algunas bacterias facilita la salida de los materiales celulares, tales como enzimas, toxinas, etc., que pueden separarse, aislarse y purificar.

Herbert y Pinsent, en 1947, utilizaron lisozima para obtener, a partir de *M. lysodeikticus*, catalasa, que incluso lograron cristalizarla.

Se utiliza la lisozima para facilitar la extracción de las biliproteínas de las algas Cianofíceas.

En 1953 Weibull empleó lisozima para remover totalmente la pared celular de *B. megaterium* (36), y lo que queda es la célula bacteriana desnuda, o sea, el contenido celular rodeado únicamente de la membrana citoplásmica que en ciertas condiciones de tonicidad del medio, por ejemplo en disolución de sacarosa 0,1 a 0,2 M, queda estabilizada formando un cuerpo esférico o protoplasto (*), con lo que se marcó una nueva fase en los estudios de Biología celular, pues los protoplastos, una vez obtenidos, se utilizan para investigaciones bioquímicas y fisiológicas (**).

Colocando protoplastos en agua destilada, la elevada presión osmótica del contenido celular hace que penetre agua del exterior y el protoplasto se hincha y la membrana citoplásmica se distiende, estalla y se desgarra, libe-

(*) El término *esferoplasto* se aplica para lo que queda de la célula bacteriana cuando se le ha privado de la mayor parte pero no de toda la pared celular.

(**) Los *bacteriófagos* no pueden atacar específicamente a las células bacterianas desprovistas de su pared celular, es decir, al estado de protoplastos, pues es en la pared de la célula bacteriana donde residen los receptores sobre los que se fija el bacteriófago.

rándose el contenido; las membranas citoplásmicas se pueden separar por centrifugación, se purifican, liberándoles de contaminantes, se analiza su composición y se estudian sus actividades bioquímicas y fisiológicas.

Se han obtenido protoplastos, no sólo de células bacterianas, sino también de actinomicetos, de levaduras, de mohos, cianofíceas y hasta de células vegetales superiores. Además de lisozima se emplean otras enzimas, según sean los tipos de plantas cuyos protoplastos se desea obtener (*).

Del *Bacillus licheniformis* se han obtenido protoplastos por la acción de la lisozima y Stoke ha demostrado que dichos protoplastos pueden sintetizar la bacitracina (37).

G. W. Brown y colaboradores (38), por la acción combinada de la lisozima y de la penicilina sobre células de *Clostridium botulinum* A y E, han logrado protoplastos de los que han obtenido formas L estables que no esporulan, pero sí producen la misma toxina que las células de donde proceden.

Según Cassier y Sebald (39), la lisozima es capaz de inducir la germinación de las esporas de ciertas bacterias, por ejemplo *Clostridium perfringens*, tratadas por el calor y que habían perdido la facultad de germinar. Es decir, que la lisozima participa en la iniciación fisiológica de la germinación de las esporas, al menos de ciertos tipos de bacterias.

Y para terminar con esta breve indicación de algunas de las aplicaciones de la lisozima a la bacteriología, reproduciré las líneas finales de Salton —autoridad mundial en el estudio de las paredes de las células bacterianas— en su trabajo *The properties of Lysozyme and its action on Microorganisms* (40):

Lysozyme has become an extremely useful enzyme for the isolation of bacterial structures and intracellular components, and for the specific dissolution of the cell wall in the preparation of bacterial protoplasts.

LISOZIMEMIA, LISOZIMURIA Y LISOZIMA EN TUMORES

La determinación de la cifra de lisozima en el suero o plasma sanguíneo o en la orina tiene gran interés, ya que puede ayudar al diagnóstico y al pronóstico de un proceso leucémico.

P. Jollès y colaboradores en 1964 dieron cuenta (41) de que la lisozima en

(*) En nuestra patria el Prof. Dr. J. Rodríguez Villanueva y sus colaboradores han realizado aportación muy valiosa en la obtención de enzimas líticas —*Streptozimas*— a partir de Actinomicetos (*Streptomyces* GM, *Streptomyces* RA y *Micromonospora* AS) y su empleo para disolver paredes celulares de gran número de levaduras y de mohos y paredes de esporas de cierto número de hongos y para obtener protoplastos de levaduras, obtener membranas citoplásmicas de protoplastos de levaduras, protoplastos de conidios de *Fusarium culmorum*, etc.

el suero aumenta en las leucemias mieloides crónicas, baja en las leucemias linfoblásticas y es normal en enfermos con leucemia linfocítica (42).

Perillie y colaboradores en 1968 señalaron (43) que la cifra de lisozima se eleva notablemente en el suero de enfermos con formas monocíticas de leucemia aguda, se eleva moderadamente en las formas agudas y crónicas de leucemia granulocítica y que la cifra es normal o más baja que la normal en las formas linfocíticas de leucemia linfoide.

Señalan también Perillie y colaboradores que la determinación sistemática de la cifra de lisozima en el suero puede ser de valor diagnóstico en caso de leucemia aguda y también para determinar la eficacia de la terapia anti-leucémica, porque los valores de lisozima en suero vuelven a la normalidad cuando se alcanza la completa remisión del proceso.

Desde las primeras observaciones de Fleming, se sabe que la orina normal no contiene lisozima. Perillie y colaboradores señalan actividad lisozimica en la orina de leucémicos, tanto de leucemia monocítica como de leucemia granulocítica, pero también la *lisozimuria* se presenta en enfermos con lesiones renales y en los que padecen sarcoidosis.

La *muramidaseuria* (*lisozimuria*) en enfermos leucémicos se explica como consecuencia del considerable aumento de leucocitos en la sangre, ya que la lisozima urinaria procede del aumento considerable de lisozima en el plasma sanguíneo, que a su vez procede de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y de los monocitos sanguíneos (*).

Es muy interesante el trabajo de los Dres. Perri y colaboradores (45) dando cuenta de haber obtenido lisozima cristalizada a partir de riñones de rata con tumores del sarcoma de Jensen y en el cual llegan a las siguientes conclusiones:

- (1) Lysozyme increases in the kidneys of Jensen sarcoma-bearing Sprague-Dawley rats very rapidly.
- (2) The increase is statistically proportional to the mass of the tumour.
- (3) The surgical removal of the tumour is followed by a rapid decrease of the lysozyme activity in the kidneys toward normal levels.
- (4) Spontaneous regression of the tumour is accompanied by lowering of lysozyme content in the kidney.

Estos hallazgos son de extraordinaria importancia y sin duda alguna servirán para dirigir la atención al conjunto del problema del significado bioquímico de la lisozima en los tejidos de los mamíferos.

(*) Tal es la cantidad de lisozima excretada por la orina en enfermos con leucemia monocítica —hasta cuatro gramos diarios— que E. F. Osserman ha conseguido obtener de dicha orina lisozima cristalizada al estado de cloruro (44).

QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LAS LISOZIMAS

Las lisozimas constituyen una familia de enzimas llamadas también *Muramidásas* o *N-acetilmuramíl-glicanhidrolasas* o *Mucopéptido —N-acetilmuramíl— hidrolasas* (EC 3.2.1.17), que aunque presentan algunas propiedades generales comunes, cada una de ellas posee personalidad propia.

Son proteínas de naturaleza básica, de elevado punto isoelectrico (10,5 a 11) de bajo peso molecular, alrededor de los 15.000, las lisozimas animales, y unas 25.000 las lisozimas obtenidas hasta ahora de algunas plantas fanerógamas.

Aunque las investigaciones sobre la química de las lisozimas se han realizado en varios laboratorios, quiero destacar dos: uno en los Estados Unidos, el laboratorio de R. E. Canfield, en la Columbia University (New York), y el laboratorio de Bioquímica en la Facultad de Ciencias de la Universidad de París, dirigido por el Prof. Fromageot, desde 1948 hasta su fallecimiento, el 10 de enero de 1958. Con Fromageot venía trabajando, desde 1950, el doctor Jollès, quien al fallecer su maestro prosiguió las investigaciones con la colaboración de su hermano Dr. George Jollès, su esposa Dra. Jacqueline Jollès, nuestro compatriota Dr. Juan Jáuregui Adell, I. Bernier, M. Ledieux, etcétera, desarrollando una extraordinaria labor de investigación que le califica al Dr. Pierre Jollès como primera autoridad mundial en el estudio químico de las lisozimas.

P. Jollès y colaboradores han ideado nuevos métodos cromatográficos para la purificación de las lisozimas y han obtenido lisozima de la clara de huevo de gallina, de la clara de huevo de pata, de bazo de conejo, de bazo y riñón de perro, de pulmón de gallina, de las lágrimas, saliva, leche y placenta humanas y de plasma sanguíneo humano y de leucocitos humanos.

Han hidrolizado las lisozimas por diversos métodos y han estudiado pacientemente los péptidos resultantes de las hidrólisis, y después de salvar las dificultades inherentes a tema de investigación tan delicado han determinado el número de residuos de aminoácidos en la lisozima de la clara de huevo de gallina, así como la secuencia, el orden, de esos aminoácidos, es decir, su estructura primaria. Con respecto a esa lisozima fueron los primeros (46) en presentar la secuencia completa de los 129 restos de aminoácidos.

Se trata de una sola cadena peptídica con NH_2 terminal de lisina y en el otro extremo con COOH terminal de leucina, y que está más o menos plegada por cuatro puentes de disulfuro, de los cuatro residuos de cistina (47) y a los cuales debe la lisozima su relativa estabilidad al calor y que al parecer son necesarios para su actividad biológica.

La estructura primaria que dio Canfield (48 y 49) y Canfield y Liu (50) para la lisozima de la clara de huevo de gallina ofrece pequeñas discrepancias con

respecto a la de P. Jollès y colaboradores, pero hay coincidencia en las posiciones de los cuatro puentes de disulfuro.

En la molécula de la lisozima de clara de huevo de gallina solamente hay un residuo de *histidina*, pero no parece desempeñar papel esencial, según el Prof. Jollès, ya que la lisozima de la clara de huevo de pata no contiene ese aminoácido, y sin embargo posee actividad parecida a la de la lisozima de la clara de huevo de gallina.

En la molécula de lisozima de la clara de huevo de gallina hay seis residuos de *triptófano*, de los cuales parece tienen interés especial los que en la secuencia ocupan las posiciones: 62, 63 y 108.

Se estima que toda la molécula no es necesaria para la actividad biológica de la lisozima, pues como dice P. Jollès (51):

«In hen egg-white lysozyme the N- and C- terminal sequences can be split off without inactivation. The biological activity thus seems to be related not so much to the primary as to the tertiary structure (disulphide bridges, hydrophobic linkages).»

Hace años, concretamente el día 4 de julio de 1958, visité al Dr. P. Jollès en su laboratorio de Química Biológica, en el Boulevard de Raspail 96, en París, cuando sus investigaciones estaban en pleno desarrollo y me mostró la lisozima de bazo de conejo prácticamente pura y otras lisozimas en vías de purificación así como también me informó que del invertebrado, anélido, poliqueto, *Nephtys hombergi* se podía extraer sustancia con buena actividad de proteína lisante y aparte de su carácter básico y bajo peso molecular, le caracterizaban como lisozima las siguientes propiedades: a) lisa a suspensiones de *M. lysodeikticus*; b) estable en medio ácido; calentando a pH 4,5 durante tres minutos a 100° C conserva su actividad, y c) labilidad en medio alcalino.

Desde entonces he seguido paso a paso las investigaciones del profesor P. Jollès, gracias a su gentileza, pues me ha ido remitiendo sus trabajos y hace pocos meses me envió su comunicación número 77 sobre lisozimas, y se titula *The Turnip Lysozyme* (52).

Recordemos que en su primer trabajo A. Fleming nos dice que entre las plantas que ensayó revelaba actividad lisozímica *el nabo*. Pues bien, ahora P. Jollès y sus colaboradores han logrado aislar la lisozima de esa Crucífera cuyo P. M. es alrededor de 25.000; pH óptimo cinco frente a *M. Lysodeikticus*; se inhibe a pH 6,2 como otras lisozimas por *N-acetil-glucosamina* y aunque lisa lo mismo que la lisozima de la clara de huevo de gallina, los enlaces β (1-4) glicosídicos de las paredes celulares de *M. lysodeikticus*, se diferencia de ella en su P. M., comportamiento electroforético, pH óptimo y actividad relativa frente a diferentes sustratos y en determinadas condiciones parece que actúa más bien como *quitinasa* que como lisozima.

La lisozima del nabo ofrece mucho parecido con otras lisozimas vegetales obtenidas puras tales como la *Lisozima del latex de Papaya* (53) y la *Lisozima del latex de la higuera* (54) todo lo cual ha despertado gran interés por el estudio de las lisozimas vegetales y para tratar de averiguar su posible misión fisiológica en las plantas que las contienen.

Mientras se desarrollaban las investigaciones relacionadas con la química de las lisozimas, las investigaciones sobre la naturaleza de su substrato, iniciadas por K. Meyer y colaboradores y por Epstein y Chain, fueron objeto de intenso trabajo por parte de diversos grupos de investigación, pero me limitaré a los que siguen:

Salton en 1952 preparó paredes celulares de *M. lysodeikticus* (55) y observó que la lisozima las disuelve completamente; el substrato probablemente era sustancia altamente polimerizada e insoluble: un mucopéptido.

La pared de *M. lysodeikticus* es sustancia específica para la lisozima que produce su rápida lisis sin necesidad de otras enzimas (*).

También observó Salton (56) que las paredes celulares de *Sarcina lutea* y de *Bacillus megaterium*, sensibles a la lisozima, son digeridas totalmente por ésta con liberación de azúcares reductores y amino-azúcares.

El producto de la digestión lisozimica es una mezcla compleja de fragmentos de diferente tamaño molecular y la sustancia principal dializable liberada por la lisozima es un disacárido de *N-acetilglucosamina* y de *N-acetil-murámico* (**).

La primera indicación sobre el tipo de enlace que rompe la lisozima se debió a Berger y Weiser (1957), quienes dieron cuenta (57) de que la lisozima, aparte de hidrolizar al substrato de origen bacteriano, hidroliza también a la quitina, que como se sabe es un polímero lineal cuyas unidades son de β -acetil-glucosamina unidas entre sí por enlaces β 1-4 (***).

Su conclusión fue la siguiente:

«The ability of lysozyme to attack chitin indicates that this enzyme possesses β -glucosaminidase activity, since chitin is a straight-chain polymer of N-acetylglucosamine linked by β -glucosaminidic linkages.»

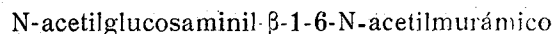
(*) La lisozima puede actuar sobre las células vivas del *M. lysodeikticus*; en cambio las enzimas que intervienen en la autólisis bacteriana solamente actúan cuando las células mueren.

(**) El ácido murámico (de muros pared) es el nombre propuesto por Strange para la glucosamina en la que la posición del C 3 lleva unido al O un resto de ácido láctico con su grupo COOH libre.

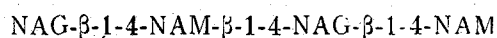
(***) La lisozima no actúa sobre la celulosa que también es un polímero lineal de la β -D-glucosa con enlaces β -1-4 entre sus unidades, lo cual significa que para que actúe la lisozima es esencial que en la posición 2 haya resto de acetil-amino, pero no es esencial la presencia del radical lactilo del ácido murámico, ya que en la quitina no entran unidades de murámico ni por lo tanto de N-acetilmurámico.

Salton y Ghuyssen aislaron en 1959 (58) del digerido lisozimico de las paredes de *M. lysodeikticus* un tetrasacárido y demostraron que contenía cantidad equimolecular de *N*-acetilglucosamina (NAG) y de *N*-acetilmurámico (NAM). Incubando el tetrasacárido con lisozima se producía como único producto un disacárido de NAG y NAM y dedujeron que el tetrasacárido era dímero del disacárido, y que el enlace β -1-4 es el que unía las dos unidades del dímero. El disacárido no era digerido por la lisozima.

Al disacárido se le asignó originariamente la siguiente estructura:



pero Jeanloz, Sharon y Flowers (59) sintetizaron el disacárido β -1-6 y hallaron que tenía propiedades diferentes al disacárido que se obtenía por la acción de la lisozima sobre la pared celular del *M. lysodeikticus* y por eso sugirieron que el tetrasacárido era:



La lisozima rompe específicamente el enlace β -1-4 entre el NAM y el NAG, que le sigue en la cadena, pero no rompe el enlace β -1-4 entre el NAG y el NAM que le sigue en la cadena.

N. Sharon ha estudiado la composición de la pared bacteriana analizando los productos resultantes de su hidrólisis por la lisozima, especialmente oligosacáridos, algunos de los cuales también los ha sintetizado y ha llegado a la conclusión (60) de que la lisozima además de su acción hidrolítica posee actividad de *transglucosilasa* y propone que la hidrólisis del tetrasacárido no precede por ruptura directa, sino por un mecanismo de transferencia vía oligosacáridos de cadena larga.

En las bacterias la membrana citoplásmica, débil pero de gran importancia en la regulación del paso al interior de los nutrientes procedentes del medio y de la salida al exterior de algún metabolito, está protegida por una envoltura o pared rígida de composición variable según la especie bacteriana pero siempre compleja.

En todas las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (*) entra siempre en la composición de su pared *mucopéptido* (glicopéptido) pues la hidrólisis ácida proporciona además de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico, cierto número de amino-ácidos: *L*-alanina, *D*-glutámico, *L*-lisina (que en algunas bacterias está sustituida por *L*-diaminopimélico) *D*-alanina y *Glicina*. Las formas D de la alanina y del ácido glutámico son interesantes por

(*) En las bacterias Gram negativas la composición de la pared celular es más compleja aún que en las Gram positivas, por cuanto el mucopéptido está revestido de otra envoltura lipo-proteica-polisacáridica.

que no entran en la composición de las proteínas y su presencia proporciona a la pared bacteriana cierta resistencia a la acción de las enzimas proteolíticas.

La porción polisacáridica de la pared bacteriana está formada por multitud de cadenas lineales integradas por unidades de NAG alternando con NAM. Al grupo COOH láctico del NAM va unido por enlace peptídico una cadena corta de cuatro aminoácidos: *L*-alanina, *D*-glutámico, *L*-lisina y *D*-alanina y ésta se une por un puente *pentaglicínico*, o sea por cinco restos de glicocola a la *L*-lisina de la cadena peptídica corta que va ligada a la cadena de polisacárido próxima a la anterior y así sucesivamente, de modo que entre las cadenas de polisacárido hay un armazón, una red, un entrecruzamiento en tres direcciones, formado por las cadenas de aminoácidos, lo que proporciona a la estructura de la pared una gran rigidez y tanto mayor cuanto más tupida sea la red.

En *Micrococcus lysodeikticus* el entrecruzamiento entre las distintas cadenas peptídicas es relativamente laxo, no es tupido, de modo que fácilmente se desmorona toda la pared y la célula se lisa rápidamente al catalizar la lisozima la hidrólisis, la ruptura de los enlaces β -1-4 entre NAM y NAG. En cambio, en el estafilococo, el entrecruzamiento es muy denso, muy tupido y además la presencia entre los componentes de la pared de los ácidos teicoicos hace que las células del estafilococo resisten a la acción de la lisozima cuando actúa por sí sola.

Hay enzimas bacteriolíticas diferentes de la lisozima que no actúan en el sitio específico donde actúa esta enzima, sino en otras uniones tales como las *Muramyl-alanina amidasas* (por ej., la del *Streptomyces de Ghuyssen*) actúan rompiendo el enlace peptídico entre *L*-alanina y el NAM y ciertas *peptidasas* que actúan, por ejemplo, sobre la cadena peptídica de pentaglicina (34 y 35).

Hace pocos años, en 1965, ha tenido lugar un descubrimiento que marca un hito en la historia de la Enzimología: la *dilucidación de la arquitectura de la molécula de la Lisozima*.

Operando con cristales tetragonales de Lisozima-cloruro, el grupo de Phillips, Blake, North, etc., en el *Davy Faraday Laboratory of the Royal Institution* en Londres y utilizando las técnicas de difracción de rayos X y después de realizar millares de medidas, han podido aclarar la distribución espacial de todos los átomos de la molécula de lisozima (61 y 62); es decir, han podido fijar su *estructura terciaria*, o sea, que la lisozima es la tercera proteína (mioglobina y hemoglobina fueron las dos primeras) y la primera enzima analizada totalmente y de la que se conoce su *estructura tridimensional* que viene, asegurada, por los cuatro puentes de disulfuro y por enlaces de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. También han podido precisar la *zona activa de la enzima*, en donde se acopla el sustrato o las sustancias inhibidoras.

La molécula de la lisozima tiene como dos regiones, dos alas, entre las que existe una hendidura que está revestida por residuos de amino-ácidos esenciales para la actividad de la enzima.

Dice A. C. T. North en su trabajo *The structure of lysozyme* (63):

«Between these two wings of the structure is a deep cleft that is lined with a variety of side chains. It is this cleft that appears to be the site of enzymic activity.»

Y las líneas finales de dicho trabajo son:

«It is clear that the activity of the enzyme is critically dependent on the precise way that the enzyme is folded up and one of the intriguing questions that arise from this is whether in lysozymes from different species which show considerable differences in overall amino acid composition, those side chains that come together to form the active region are invariably the same.»

Cuando están presentes la lisozima y el sustrato, la molécula del sustrato se desplaza del medio acuoso y se encaja en la hendidura de la molécula de la lisozima formándose el *complejo lisozima-sustrato*.

La lisozima parece estar dotada de cierta flexibilidad, pues los cristalógrafos han podido observar que al ligarse el sustrato a la lisozima la hendidura de ésta se cierra un poco, y al apretar al sustrato éste también se distorsiona.

Con respecto a que las enzimas pueden activar a los sustratos por distorsión, C. A. Vernon dice así (64):

«... the idea is a basically reasonable one since the energy required for distortion can be derived from the energy of bonding of the initial enzyme-substrat complex and from conformational changes in the enzyme itself.»

En la ruptura hidrolítica del enlace β -1-4 entre el NAM y el NAG por la acción catalítica de la lisozima, se estima que participa el resto del ácido glutámico que ocupa la posición número 35 en la secuencia peptídica de la lisozima y el resto del ácido aspártico que ocupa la posición número 52, en esa misma secuencia y la ruptura con incorporación de una molécula de agua se realiza entre el NAM y el O puente que le une al NAG (65).

Vemos, pues, el extraordinario interés académico que tiene la lisozima, porque no solamente ha contribuido a aclarar la naturaleza de las paredes de las células bacterianas, sino que está sirviendo de modelo para interpretar las actividades enzimáticas.

El profesor M. F. Perutz en sus *Concluding Remarks* (66), al final de la Discusión sobre la estructura y función de la lisozima celebrada en *the Theatre of the Royal Institution*, en Londres el 3 de febrero de 1966 dijo así:

«For the first time we have been able to interpret the catalytic activity of an enzyme in stereochemical terms.»

Y el profesor Nathan Sharon en su interesante artículo sobre *Lisozima*, publicado en *Rehovot* (Winter 1966/67, pág. 16), dice así:

«In particular, lysozyme promises to be of immense use in helping us to understand just why enzymes are such efficient catalysts.»

APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA LISOZIMA

El 24 de julio de 1954, cuando me entregó Sir Alexander los huevos de *pige* —lucio— me facilitó también algunos comprimidos de *cloruro de lisozima* que se utilizaban en Italia en la *lactancia artificial* para el tratamiento de los trastornos intestinales de los lactantes. También me dijo que en Italia se estaban realizando investigaciones clínicas para ver de sacar provecho terapéutico a su enzima.

Pronto me conecté con los profesores italianos Ferrari y Callerio, y dos años más tarde, el 30 de julio de 1956, tuve la oportunidad de entrevistarme con el Dr. Carlos Callerio y sus colaboradores en el *Istituto di Ricerche Terapeutiche Alexander Fleming* en Milán.

El Dr. Callerio fue el primero en Italia en interesarse por la lisozima (67). Había estado por los años 1930 y 1931 en el *Forschungsinstitut für Hygiene und Immunitätslehre* en Berlín-Dahlem, cuyo director, el Prof. Dr. E. Friedberger, realizaba investigaciones (68) con la lisozima, descubriendo que dicha enzima, independientemente de su acción lítica, en determinadas condiciones, ejercía acción floculante sobre las bacterias (*). Al regresar el doctor Callerio a Italia llevaba consigo la impresión extraordinaria que le había producido observar la lisis del *M. lysodeikticus* por la lisozima, y desde entonces siempre tuvo en su mente la idea de investigar sobre la lisozima, pues creía que alguna aplicación podía derivarse de aquel fenómeno.

Gracias principalmente al entusiasmo del Dr. Callerio y del profesor Ferrari y de algunos otros colaboradores, es sin duda alguna hoy día el Instituto de Investigaciones Alexander Fleming (Laboratorios Spa) el Centro Internacional de Información sobre la Lisozima, y ha sido el promotor de los *Tres Simposios Internacionales sobre la Lisozima* celebrados en Milán: el primero del 3 al 5 de abril de 1959, el segundo del 7 al 9 de abril de 1961 y el tercero del 3 al 5 de abril de 1964.

Durante mi estancia en Milán, y gracias a la amabilidad del Dr. C. Ca-

(*) Hoy sabemos que la floculación de las suspensiones bacterianas por la lisozima se debe a su carácter básico; se une con los grupos negativamente cargados presentes en la superficie de las bacterias.

llerio y de sus colaboradores, pude darme cuenta del volumen de las investigaciones que en relación con la lisozima se estaban realizando en clínicas universitarias de Italia, y entre las visitas que hice, acompañado por el doctor Callerio, señalaré que estuvimos en la Clínica Oculística de la Universidad de Milán, y el Dr. Gennaro nos dio cuenta del gran éxito que habían logrado con colirio de lisozima en una epidemia de conjuntivitis por virus?

No me es posible analizar en muy pocas líneas la amplia información sobre el empleo clínico de la lisozima que pude recoger entonces y la copiosa bibliografía que he ido acumulando y analizando desde aquella fecha hasta el presente, pero sí señalaré algunas investigaciones importantes: el profesor H. Violle, de la Facultad de Medicina de Marsella, publicó en «C. R. Ac. Sciences» de París en 1952 un trabajo (69), dando cuenta de que si se inyecta por vía endovenosa al conejo lisozima a la dosis de 0,5 mg. por kilogramo, se acelera notablemente el tiempo de coagulación de la sangre y que por vía subcutánea se logra parecido efecto. Al año siguiente publicó un trabajo más extenso (70), del cual reproduzco las siguientes líneas:

«Le lysozyme agit indirectement sur le sang: *in vitro*, il n'augmente pas sa vitesse de coagulation; l'effet accélérateur ne se produit qu'*in vivo*.»

«Nous avons noté que le pouvoir coagulant du lysozyme va de pair avec son action lytique.»

Y llevado por la sorpresa que le produjo descubrir el efecto coagulante *in vivo* de la lisozima, llega a decir:

Si cette action coagulante, vraiment prononcée, avait été décrite en même temps que ses propriétés lysantes, d'applications trop restreintes, il est probable qu'un autre vocable eût désigné ce corps.

En 1956 Ghiglione y Dumazert confirman el efecto coagulante *in vivo* de la lisozima y lo interpretan porque dicha enzima, por ser proteína de naturaleza básica, neutraliza a la heparina.

De su trabajo 71), son las líneas que siguen:

«Le lysozyme, protéine de faible poids moléculaire non toxique, dépourvue de tout effet anaphillatisant ou allergisant, apparaît donc comme un agent coagulant extrêmement précieux dont l'action se limite à neutraliser celle de l'héparine par un mécanisme chimique très simple.»

Y agregan:

«En cela, on peut dire que le lysozyme est l'antidote de choix de l'héparine.»

A raíz de los trabajos de Violle y de Ghiglione y Dumazert y de otros, se publicaron, especialmente por investigadores italianos, numerosas comunicaciones en relación con la utilización de la lisozima en el tratamiento sintomático de situaciones hemorrágicas, en hemofilias, hemoptisis, en cirugía ginecológica, etc.

En 1952 el profesor Orzalesi y Miglior dieron cuenta de la neutralización *in vitro* por la lisozima del virus herpético que se encuentre fuera de las células e interpretan porque la lisozima actúa como proteína básica formando complejo con el virus herpético cuyos radicales ácidos neutraliza (72).

En 1953 el profesor Orzalesi publicó *Primi tentativi di terapia di cheratiti erpetiche con lisozima*, y de su resumen final (73), copio:

«Par d'autres recherches déjà publiées, l'A. et son École ont démontré que: le *lysozyme* est capable d'inhiber *in vitro* le virus herpétique; il existe un parfait parallélisme entre la teneur du *lysozyme* des larmes, de la cornée et du sang, avec résistance envers l'infection herpétique, dans quelques animaux; quelques manifestations herpétiques spontanées des muqueuses de l'homme s'accompagnent d'une chute très considérable du teneur lysozymique de la sécrétion même.»

«Sur la base de ces constatations, l'A. a essayé l'action du *lysozyme* dans la thérapie des kératites herpétiques de l'homme. Quinze cas de kératites superficielles (dont la plupart du type dendrythique) ont été traités: 14 cas ont guéri dans 5-8 jours.»

Scolari (1961) ha empleado lisozima por vía intramuscular como antiálgico en enfermos cancerosos, y los buenos resultados obtenidos quizá pudieran ser debidos —dice él (74)— a que la lisozima se combina con y neutraliza a la *malignolipina* y a la *oncolipina*, fosfolípidos de las células tumorales. También ha conseguido Scolari con la lisozima efectos analgésicos en otras situaciones clínicas, tales como dolores concomitantes con herpes zóster, neuritis postherpéticas, etc.

Strani en 1968 dio cuenta (75) del tratamiento del zóster con lisozima en dosis altas *per os*, y de sus conclusiones tomo las líneas que siguen:

«... La lisozima administrada por vía oral en dosis de un gramo al día (un comprimido de 250 mgs. cada seis horas), puede abreviar de modo evidente el tiempo requerido para la *restitutio ad integrum* de la zona cutánea afectada por la infección zosteriana.»

Kubelka observó que ratones infectados con cien dosis letales de virus de la hepatitis humana (*Motol strain*) quedaron completamente protegidos contra la infección, adicionando lisozima al agua que bebían, y también observó que la lisozima precipita sin inactivarlo al virus de la hepatitis, lo que hace posible extraer dicho virus del material infectado para luego ser purificado.

Es muy interesante la siguiente observación de Kubelka (76)

«If, however, the hepatic virus-lysozyme complex is injected into mice, the course of the infection is more favourable while antibody formation is stimulated. This would support the positive effect of lysozyme on the active immunization processes.»

Sea cual fuere el mecanismo de acción de la lisozima sobre ciertos virus, las investigaciones clínicas han confirmado las investigaciones previas en animales de laboratorio y se está empleando la lisozima en el tratamiento de la hepatitis vírica (77).

Todas estas aplicaciones de la lisozima a que vengo refiriéndome, se deben, al parecer, fundamentalmente a su naturaleza básica y son independientes de su acción bacteriolítica que frente a determinadas bacterias es extraordinaria y no olvidemos que la lisozima puede matar a determinadas bacterias sin producir en ellas lisis, es decir, que su espectro antibacteriano es mucho más amplio que su espectro lítico.

No dudo que la lisozima natural, presente en secreciones y órganos, cumple *in vivo* una misión de protección, defensiva (*), y por lo tanto es admisible teóricamente la aplicación o administración de lisozima exógena para reforzar a la lisozima natural que en ciertas situaciones patológicas puede estar o está disminuida. Así, se aplica en disolución el cloruro de lisozima en las conjuntivitis y herpes corneal, o en pulverizaciones para actuar en fosas nasales, senos, tráquea y árbol bronquial, o por la vía oral, o por las vías intramuscular o intravenosa, según sea el caso. Los éxitos clínicos logrados, al menos en algunos enfermos, confirman que se han reforzado las defensas y con ello se ha facilitado la curación.

Teóricamente también parece ventajoso asociar la lisozima a los tratamientos con antibióticos. Hay muchas comunicaciones en ese sentido, pero solamente haré referencia al trabajo de Vallarino y colaboradores (78), que trataron 25 niños con fiebre reumática, asociando a la ampicilina (alfa-amino bencil-penicilina) lisozima por vía oral, y lograron recuperación clínica rápida, observando que la velocidad de sedimentación y el título de antiestrep-tolisina se normalizaba dentro de los diez a veinte días, en tanto que con tratamiento similar pero sin lisozima, pero con prednisolona, no consiguieron resultados apreciables en el mismo período de tiempo y con la particularidad de que con el tratamiento con ampicilina-lisozima lograron un estímulo de la producción de gammaglobulina.

En estos últimos años en más de una ocasión he pensado y lo he comentado si no sería factible y ventajoso obtener una sal lisozímica de la bencilpenicilina o de alguna de las nuevas penicilinas semi-sintéticas, ya que la liso-

(*) Se estima que la lisozima no es la única sustancia que interviene en los mecanismos inmunitarios celulares y humorales.

zima es de naturaleza básica y la penicilina es un ácido cuya sal sódica es la de más corriente uso terapéutico.

Como antecedente estaba el que con el Prof. A. Caballero en 1958 obtuvimos un complejo úsnico-estreptomicina reuniendo los dos antibióticos *anti-Mycobacterium* en uno. Este hallazgo nuestro no tuvo interés terapéutico por cuanto el uso de estreptomicina es tóxico, es decir, es más tóxico que la estreptomicina.

Estas circunstancias explican el gran interés que despertó en mí la comunicación en 1969 de los Dres. Pellegrini y Vertova (79) en la que dieron cuenta del sinergismo entre penicilinas y lisozima y de haber obtenido un nuevo antibiótico, el *Ampicilinato de Lisozima* (D (—) α -aminobencil-penicilinato de Lisozima).

Poca información bibliográfica poseo hasta ahora acerca de los ensayos clínicos con el *ampicilinato de lisozima*, pero mencionaré el trabajo de A. Guffanti (80) sobre el empleo en Oftalmología en enfermos con *conjuntivitis catarral*, *dacriocistitis purulenta*, *querato-conjuntivitis* y *herpes corneal* y el de F. Cattani sobre su empleo en *conjuntivitis mucopurulenta aguda* (81).

CONSIDERACIONES FINALES

He querido con este trabajo conmemorar el *Cincuentenario del descubrimiento de la Lisozima* y rendir una vez más mi modesto homenaje a Alexander Fleming, el genial investigador escocés, quien cumplió su cometido en la vida, llenó su destino y sirvió a la Humanidad, contribuyendo con sus descubrimientos a aliviar en su dolor a millones de ciudadanos sin distinción de razas ni de nacionalidades.

La Providencia guió sus pasos y en más de una ocasión él dijo que estaba convencido de que:

«He was divinely guided in his great discovery.»

Y ahora meditemos muy brevemente sobre la obra de Fleming.

¡Qué extraordinaria sensibilidad perceptiva la suya! Tuvo dos contaminaciones providenciales que no las arrinconó, que no las despreció, sino que las analizó a fondo, detenidamente.

Fleming supo no solamente ver que pasaba en sus placas algo especial, sino que también supo mirar y tuvo lucidez mental —*clarividencia*— para analizar e interpretar lo que tenía delante y una curiosidad insaciable, un ansia de hallar la verdad y una gran dosis de entusiasmo para perseverar en la observación, y la interpretación correcta de los experimentos que planeó y realizó, le permitió transformar dos contaminaciones banales, dos fenó-

menos de antagonismo, de lisis bacteriana, en dos descubrimientos extraordinarios y trascendentales: *Lisozima* y *Penicilina*.

Y con ello nos dio Fleming la gran lección de humildad.

Si, señores: la atención es un fenómeno de humildad. Los que escuchan a otros son humildes. Es lección de humildad no dejar pasar los fenómenos que inesperadamente se presentan ante nuestros ojos, sino detenerse a contemplarlos, prestándoles la debida atención, meditando sobre ellos y planeando los experimentos precisos para interrogar a la Naturaleza y escuchar atentamente y recoger fielmente sus respuestas.

Perteneció Alexander Fleming a esa élite de gigantes, de cerebro portentoso, con exquisita sensibilidad perceptiva y con capacidad extraordinaria para asombrarse, con don portentoso para observar y captar las relaciones imprevistas entre los fenómenos y con perspicacia para apreciar lo que no se buscaba y vislumbrar, adivinar y profetizar su transcendencia.

Y para terminar quiero recordar a nuestras juventudes universitarias unas frases de Alexander Fleming que estoy seguro les han de servir de estímulo y de norma:

«Trabajad, trabajad sin desmayo, con entusiasmo y con fe. Dominad las técnicas relacionadas con vuestras investigaciones y preparad vuestra mente, meditando en lo que estáis haciendo, para no desperdiciar ningún fenómeno anormal que pudiera presentarse ante vuestros ojos. Muchas veces se tratará de una falsa alarma, pero en ocasiones es la oportunidad que os brinda la Providencia para por aquel camino llegar a un descubrimiento importante.»

BIBLIOGRAFÍA

- (1) F. BUSTINZA: *Diez años de amistad con Sir Alexander Fleming*. 1961. (Libro con prólogo del profesor Pedro Laín Entralgo.)
- (2) L. COLOBERT, y Mme. J. LENOIR: *Étude du mécanisme de la lyse de Coccus P. (sp. Sarcina flava) par le lysozyme*. A. I. P. T. 92, p. 74 (1957).
- (3) G. KOCH y W. J. DREYER: *Characterization of an enzyme of phage T₂ as a lysozyme*. «Virology», August 1958, p. 291.
- (4) W. SÄLSER, R. F. GESTELAND y A. BOLLE: *In vitro synthesis of bacteriophage lysozyme*. «Nature», 215, p. 588 (1967).
- (5) F. RIDLEY: *Lysozyme: An antibacterial body present in great concentration in tears and its relation to infection of the human eye*. «Proc. Roy. Soc. Med.» (Sect. Ophth.), vol. XXI, p. 55 (1928).
- (6) M. MELNIK: *The problem of lysozyme*, ps. 9-116 en el libro «Lysozyme, Typhoid Fever, Diphtheria, Rheumatism». Ukrainian Metchnikoff Institute. Kharkov (1936).
- (7) N. E. GOLDSWORTHY y H. FLOREY: *Some properties of mucus, with special reference to its antibacterial functions*. «The B. J. of Exp. Path.», vol. XI, p. 192 (1930).

- (8) H. FLOREY: *The relative amounts of lysozyme present in the tissues of some mammals*. «The B. J. of Exp. Path.», vol. XI, p. 251 (1930).
- (9) E. A. HOUGHTON ROBERTS: *The preparation and properties of purified egg-white lysozyme*. «Quart J. of Exp. Phys.», vol. 27, p. 89 (1937).
- (10) E. P. ABRAHAM y R. ROBINSON: *Crystallization of lysozyme*. «Nature», vol. 140, p. 24 (1937).
- (11) K. MEYER, R. THOMPSON, J. W. PALMER y D. KHORAZO: *The nature of lysozyme action*. «Science», 79, 61 (1934).
- (12) K. MEYER y colaboradores: *The purification and properties of lysozyme*. «J. Biol. Chem.», 113, 303 (1936).
- (13) K. MEYER y colaboradores: *On the mechanism of lysozyme action*. «J. Biol. Chem.», 113, 479 (1936).
- (14) K. MEYER y E. HANNEL: *The estimation of lysozyme by a viscosimetric method*. «J. Biol. Chem.», 163, 723 (1946).
- (15) K. MEYER, E. HANNEL y A. STEINBERG: *Lysozyme of plant origin*. «J. Biol. Chem.», 163, 733 (1946).
- (16) E. A. H. ROBERTS, B. G. MAEGRAITH y H. W. FLOREY: *A comparison of lysozyme preparations from egg-white, cat and human saliva*. «Quart. J. of Exp. Phys.», 27, 381 (1938).
- (17) E. P. ABRAHAM: *Some properties of egg-white lysozyme*. «Bioch. J.», 33, 622 (1939).
- (18) L. A. EPSTEIN y E. CHAIN: *Some observations on the preparation and properties of the substrate of lysozyme*. «The Brit. J. of Exp. Path.», 21, 339 (1940).
- (19) G. ALDERTON, W. H. WARD y H. L. FEVOLD: *Isolation of lysozyme from egg-white*. «J. Biol. Chem.», 157, 43 (1945).
- (20) R. G. PETERSON y STANLEY E. HARTSELL: *The lysozyme spectrum of the Gram negative bacteria*. «J. Inf. Diseases», 96, 75 (1955).
- (21) ROY RESPAKE: *Lysis of Gram negative bacteria by lysozyme*. «Biochim. Biophys. Acta», 22, 189 (1956).
- (22) L. COLOBERT, A. CAVANAGH, J. GUILLON y M.^a T. HAMON: *Étude de la lyse des Salmonelles pathogènes provoquée par le lysozyme, après délipidation partielle de la paroi externe*. A. I. P., 95, 156 (1958).
- (23) S. E. HARTSELL: *Factors in lysozyme bacteriolysis* Atti del I° Symposium Internazionale sul Lisozima di Fleming. Milano 3-5 aprile (1959), p. 85.
- (24) Referencia de L. COLOBERT en *Lysozime et Autarcèse*. «Path. Biol.», vol. 8, núm. 9-10, ps. 1023-1038 (1960).
- (25) M. H. RICHMOND: *Bacterial lysozyme*. «J. Gen. Microb.», 16, IV-V (1957).
- (26) P. D. MITCHELL y J. MOYLE: *Autolytic release and osmotic properties of protoplasts from Staphylococcus aureus*. «J. Gen. Microb.», 16, 184 (1957).
- (27) R. E. STRANGE y F. A. DARK: *A cell-wall lytic enzyme associated with spores of Bacillus species*. «J. Gen. Microb.», 16, 236 (1957).
- (28) R. E. STRANGE y F. A. DARK: *Cell-wall lytic enzymes at sporulation and spore germination and in Bacillus species*. «J. Gen. Microb.», 17, 525 (1957).
- (29) M. H. RICHMOND: *Lytic enzymes of Staphylococcus aureus* 524. «Biochim. Biophys. Acta», 31, 564 (1959).

- (30) M. WELSCH: *Le lysozyme des Staphylococques*. «C. R. des séances de la Soc. de Biologie», 153, 2080 (1959).
- (31) H. HAWIGER: *Purification and properties of lysozyme produced by Staphylococcus aureus*. «J. of Bact.», vol. 95, 376 (1968).
- (32) MACLYN MCCARTY: *The lysis of Group A Streptococci by extracellular enzymes of Streptomyces albus*. «The Bulletin of the N. Y. Ac. of Medicine dec.», p. 993 (1954).
- (33) M. WELSCH: *Bactériolyse, agents bactériolytiques et lysats*. Conférence faite à la 6^e assemblée générale de la Soc. belge de Biochimie. Liège, 26 janvier 1957.
- (34) JACK L. STROMINGER y JEAN MARIE GHUYSEN: *Mechanisms of enzymatic bacteriolysis*. «Sciences», 156, 213 (1967).
- (35) JEAN MARIE GHUYSEN: *Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism*. «Bact. Rev.», 32, núm. 4, 425 (1968).
- (36) C. WEIBULL: *The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme*. «J. Bact.», 66, 688 (1953).
- (37) J. E. STOKES: *Formation of bacitracin by protoplasts of Bacillus licheniformis*. «J. of Bact.», june 1961, p. 986.
- (38) G. W. BROWN, G. KING y H. SUGIYAMA: *Penicillin—Lysozyme conversion of Clostridium botulinum types A and E into protoplasts and their stabilization as L—form cultures*. «J. of Bact.», 104, 1325 (1970).
- (39) M. CASSIER y M. SEBALD: *Germination lysozyme-dépendante des spores de Clostridium perfringens ATCC 3624 après traitement thermique*. A. I. P., 117, 312 (1969).
- (40) M. R. J. SALTON: *The properties of lysozyme and its action on microorganisms*. «Bact. Rev.», 21, 82 (1957).
- (41) P. JOLLÈS, M. STERNBERG y G. MATHÉ: *Étude de la teneur en lysozyme du sérum chez des patients atteints de leucémies et hématosarcomes*. Abstracts del Third. Int. Symposium on Fleming's Lysozyme, Milán 1964, p. 138.
- (42) D. CHARLEMAGNE y P. JOLLÈS: *Les lysozymes des leucocytes et du plasma d'origine humaine. Hommes normaux et malades atteints de leucémie myéloïde chronique*. «Nouvelle Revue Française d'Hématologie», 6, 355 (1966).
- (43) P. E. PERILLIE, S. S. KAPLAN, E. LEFKOWITZ, W. ROGAWAY y S. C. FINCH: *Studies of muramidase (lysozyme) in leukemia*. J.A.M.A., 203, 317 (1968).
- (44) E. F. OSSERMAN: *Crystallization of human lysozyme*. «Sc.», 155, 1536 (1967).
- (45) G. C. PERRI, M. FAULK, J. MELLORS y C. CHESTER STOCK (del Sloan Kettering Inst. de N. Y.): *Crystallization of a basic protein (lysozyme) from kidneys of tumour-bearing rats (Jensen sarcoma)*. «Nature», 193, 649 (1962).
- (46) J. JOLLÈS, J. JAUREGUI-ADELL, I. BERNIER y P. JOLLÈS: *La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de Poule: étude détaillée*. «Biochim. Biophys. Acta», 78, 668 (1963).
- (47) P. JOLLÈS, J. JAUREGUI-ADELL y Mme. J. JOLLÈS: *Le lysozyme de blanc d'oeuf de Poule: disposition des ponts disulfurés*. «C. R. Ac. Sc. Paris», 258, 3926 (1964).

- (48) R. E. CANFIELD: *Peptides derived from tryptic digestion of egg-white lysozyme*. «J. Biol. Chem.», 238, 2691 (1963).
- (49) R. E. CANFIELD: *The amino-acid sequence of egg-white lysozyme*. «J. Biol. Chem.», 238, 2698 (1963).
- (50) R. E. CANFIELD y A. K. LIU: *The disulphide bonds of egg-white lysozyme (Muramidase)*. «J. Biol. Chem.», 240, 1997 (1965).
- (51) P. JOLLÈS: *Relationship between chemical structure and biological activity of hen egg-white lysozyme and lysozymes of different species*. «Proc. of the Roy. Soc.», B, 167, 350 (1967).
- (52) I. BERNIER, E. VAN LEEMPUTEN, M. HORISBERGER, D. A. BUSH y P. JOLLÈS: *The turnip lysozyme*. «FEBS Letters», vol. 14, april 1971, p. 100.
- (53) E. L. SMITH, J. R. KIMMEL, D. M. BROWN y E. O. P. THOMPSON: *Isolation and properties of a crystalline mercury derivative of a lysozyme from papaya latex*. «J. Biol. Chem.», 215, 67 (1955).
- (54) A. N. GLAZER, A. O. BAREL, JAMES B. HOWARD y DOUGLAS M. BROWN: *Isolation and characterization of fig lysozyme*. «J. of Biol. Chem.», 244, 3583 (1969).
- (55) M. R. J. SALTON: *Cell wall of Micrococcus lysodeikticus as the substrate of lysozyme*. «Nature», 170, 746 (1952).
- (56) M. R. J. SALTON: *The action of lysozyme on cell walls of some lysozyme sensitive bacteria*. «Biochim. Biophys. Acta», 22, 495 (1956).
- (57) L. R. BERGER y R. S. WEISER: *The β -glucosaminidase activity of egg-white lysozyme*. «Biochim. Biophys. Acta», 26, 517 (1957).
- (58) M. R. J. SALTON y J. M. GHUYSEN: *The structure of di and tetrasaccharides released from cells walls by lysozyme and Streptomyces F_1 enzyme and the β -(1-4) N-acetylhexosaminidase activity of these enzymes*. «Biochim. Biophys. Acta», 36, 552 (1959).
- (59) R. W. JEANLOZ, N. SHARON y H. M. FLOWERS: *The chemical structure of a disaccharide isolated from Micrococcus lysodeikticus cell wall*. «Biochim. Biophys. Research Com.», 13, 20 (1963).
- (60) N. SHARON: *The chemical structure of lysozyme substrates and their cleavage by the enzyme*. «Proc. Roy. Soc.», B, 167, 402 (1967).
- (61) C. C. F. BLAKE, D. F. KOENIG, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS y V. R. SARMA: *Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution*. «Nature», 206, 757 (1965).
- (62) C. C. F. BLAKE, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS y V. R. SARMA: *On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule*. «Proc. Roy. Soc.», B, 167, 365 (1967).
- (63) A. C. T. NORTH: *The structure of lysozyme*. «Sc. Journal», novembre 1966, p. 55.
- (64) C. A. VERNON: *The mechanisms of hydrolysis of glycosides and their relevance to enzyme-catalysed reactions*. «Proc. Roy. Soc.», B, 167, 389 (1967).
- (65) C. C. F. BLAKE, L. N. JOHNSON, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS y V. R. SARMA: *Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme*. «Proc. Roy. Soc.», B, 167, 378 (1967).
- (66) M. F. PERUTZ: *Concluding remarks. A discussion on the structure and function of lysozyme*. «Proc. Roy. Soc.», B, 167, 448 (1967).

- (67) C. CALLERIO: *Studi sul lysozym*. «Bolletino della Soc. Medico-Chirurgica di Pavia». Anno XLVI dalla fondazione della Società. 1932 (a. X). Fascicolo 5. (Separata de 24 páginas.)
- (68) E. FRIEDBERGER y F. HODER: *Lysozym- und Flockungsphänomen des Hühnereiklars*. «Zeitschr. für Immunitätsforschung», Bd. 74, Heft 5/6, S. 429 (1932).
- (69) H. VIOLLE: *Augmentation de la coagulabilité du sang sous l'action in vivo du lysozyme*. «C. R. Ac. Sc.», 235, 1170 (1952).
- (70) H. VIOLLE: *Contribution à l'étude du lysozyme*. «La Presse Médicale», 13 june 1953, p. 846.
- (71) CL. GIGLIONE y CH. DUMAZERT: *Lysozyme et coagulation sanguine*. «Bull. Soc. de Pharmacie de Marseille», tomo V, 299 (1956).
- (72) F. ORZALESI y M. MIGLIOR: *Neutralisation in vitro du virus herpétique par le lysozyme*. «Bulletins et Mémoires de la Soc. Franç. d'Ophthalmologie», p. 433 (1952).
- (73) F. ORZALESI: *Primi tentativi di terapia di cheratiti erpetiche con lisozima*. «Giornale Italiano di Oftalmologia», vol. VI, p. 210 (1953).
- (74) E. G. SCOLARI: *New therapy with lysozyme against pain in cancerous patients*. «Italian General Review of Dermatology», vol. II, núm. 3, mayo-junio 1961.
- (75) G. F. STRANI: *El tratamiento del zóster con lisozima en altas dosis per os*. «Minerva Dermatológica», vol. 43, junio 1968, p. 288.
- (76) V. KUBELKA: «Epatologia» 12. 588 (1966). Referencia de Pellegrini y Vertova. Ver referencia (79).
- (77) R. ROSSI, V. FRANGINI y C. MOGGI: *Il lisozima nella terapia dell'epatite virale*. Atti del Convegno sulla Etiologia e Terapia delle epatiti Virali. Chianciano-Terne, 30-31 ottobre 1965. Public. de SPA, Istituto di Ricerche «Alexander Fleming» (página 661).
- (78) G. VALLARINO, M. MERLINI e I. GALLETI: *Lysozyme in the treatment of the rheumatic disease*. Abstracts 3rd Int. Symposium on Fleming's Lysozyme 3-5 april 1964, Milán, p. 145.
- (79) R. PELLEGRINI y P. VERTOVA: *Synergism between penicillins and lysozyme. Data which led to the synthesis of a new antibiotic salt: lysozyme ampicillinate*. «Arzneimittel-Forschung», 19, 110-112, 149-153, 375-379 (1969).
- (80) A. GUFFANTI: *Prime ricerche cliniche sull'ampicillinato di lisozima in Oftalmologia*. «Minerva Oftalmologica», vol. 10 (1968). (Separata de nueve páginas.)
- (81) F. CATTANI: *La terapia delle congiuntiviti acute con ampicillinato di lisozima*. Estratto degli atti delle 2^e Giornate Mediche Internazionali del Renon, Collalbo (Bolzano), 4-6 Gennaio 1969. (Separata de ocho páginas.)