

Historia

De la lisozima a la penicilina: un camino tan complejo como interesante

J. Prieto Prieto y M.L. Gómez-Lus

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

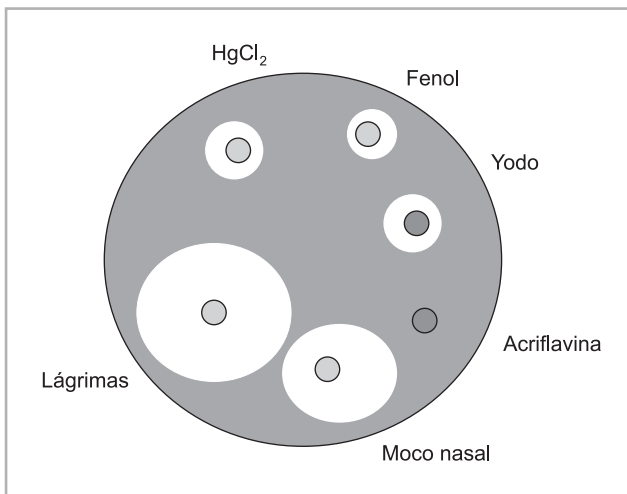
Corría el año 1921 cuando Fleming se encontró con la lisozima. La casualidad resulta muy atractiva para el lector si se relaciona con cualquier hecho trascendental, sobre todo si es positivo. Todos tendemos a soñar que nos puede ocurrir algo parecido. Sin embargo, “casualidad” se puede sustituir por *serendipia* cuando se refiere a hacer descubrimientos inesperados y afortunados por accidente, y está claro que sólo algunos tienen esa capacidad o facultad. Pues bien, nosotros también somos unos escépticos de la *serendipia* cuando se pretende explicar por esta vía descubrimientos como el de la lisozima o la penicilina de Fleming.

Cuando se conoce la preparación de Fleming, su constancia, su capacidad de observación y especialmente su entorno profesional, se puede comprender por qué llegó a descubrir la lisozima y posteriormente la penicilina. Fleming vive el apasionante final del siglo XIX. Conoce muy bien los avances científicos en el campo de la microbiología, con los descubrimientos de los franceses y alemanes, y trabaja en la estela de influencia que había dejado Lister. Él tenía precisa información sobre hongos productores de sustancias inhibitoras de bacterias; Villemin, Duchesne y el mismo Pasteur se habían referido con frecuencia al fenómeno, así como Lister, aunque éste se centró en los antisépticos. Estos temas, junto con el de la “bala mágica” de Ehrlich, debían ocupar la mente de Fleming de forma casi obsesiva. Sin restarle méritos, sin embargo, fue también muy impor-

tante trabajar en el equipo más prestigioso en bacteriología del primer tercio del siglo XX: el equipo de Wright, un entusiasta de las vacunas con una personalidad arrolladora. Es decir, Fleming estuvo en la época adecuada, en el equipo y lugar oportunos, y con la suficiente preparación. Fleming era un experto en el uso del salvarsán (de Ehrlich) y en todas las facetas de las vacunas (preparación, clasificación, administración, valoración), la mayoría de las cuales eran fruto de la investigación del equipo.

Con la I Guerra Mundial y los dramas de la sepsis, el tétanos y la gangrena, toma interés por la asepsia y la inmunoterapia. En 1915 Twort descubre el aclaramiento de cultivos por lo que posteriormente se identificarían como bacteriófagos y da lugar a que se inicie, con D’Herelle, la posibilidad de usar este fenómeno en el tratamiento de las infecciones. Aunque apenas se cita, es de suponer el impacto que también tuvo en Fleming la “gripe española” de 1918 y sus estudios sobre cuadros “gripales” en los que no aislaba *H. influenzae*, considerado entonces su causa. En 1921 obtiene la plaza de subdirector del Departamento de Inoculaciones, que le confiere una buena estabilidad económica y la confirmación de su prestigio profesional. Hasta aquí hemos descrito el “caldo” ambiental adecuado para que Fleming descubriera la lisozima. ¿Pero cómo la descubrió?

Según sus notas de laboratorio, en las que era muy meticuloso, en noviembre de 1921 observa la destrucción bac-



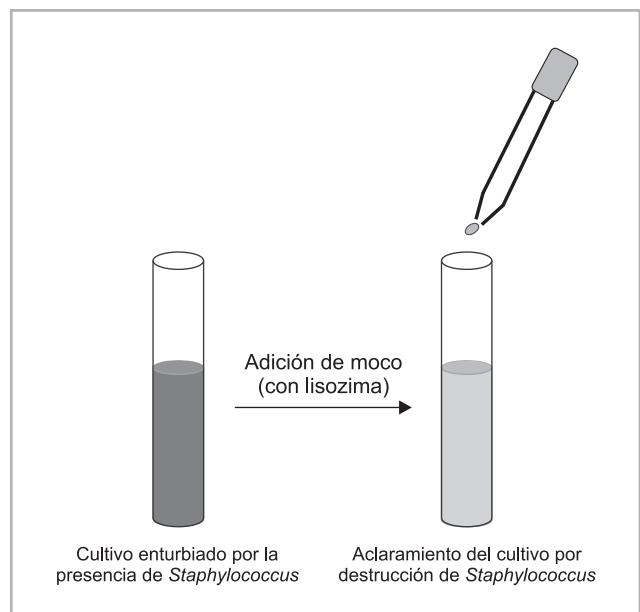
Inhibición de *M. lysodeikticus* en distinta intensidad por diferentes anti-sépticos (arriba) y dos muestras de fluidos con lisozima (abajo).

teriana por una sustancia natural del organismo. Quizás sufriera un fuerte catarro y quiso investigar la causa, encontrando que su moco no sólo no contenía bacterias sino que además mataba a las que entraban en contacto con él. Lo que se conoce de las observaciones iniciales se debe fundamentalmente a las descripciones noveladas, algo románticas y en clave de humor, de su colaborador el Dr. Allison: “Me enseñó la gelosa (placa de Petri) cubierta de grandes colonias amarillas, pero lo sorprendente era una ancha zona sin organismos; otra más allá con colonias transparentes y vidriosas; y aún otra, intermedia entre ésta y aquella, cuyo pigmento estaba completamente desarrollado”. Está claro que el camino de la penicilina se estaba preparando. Allison continúa: “Su segundo experimento consistió en repetir el efecto del moco en tubo (suspensión de bacterias). Su sorpresa, y la mía, fue ver que en unos minutos el líquido turbio se volvió claro. Inmediatamente ensayó el efecto de las lágrimas. Una sola gota de lágrima disolvía los organismos en unos segundos; era sorprendente y emocionante. Después, mis lágrimas y las suyas fueron los principales materiales de nuestras observaciones durante cinco semanas. ¡Cuántos limones tuvimos que comprar para poder llorar tanto! Cortábamos un trocito de piel de limón, lo exprimíamos en nuestros ojos mirando al espejo del microscopio y después, con una pipeta cuya punta había sido redondeada a la llama, recogíamos las lágrimas para colocarlas en seguida en el tubo de ensayo. Con frecuencia obtuvo así hasta medio centímetro cúbico de lágrimas para nuestros experimentos”. El propio Fleming, poco dado a la vehemencia, declara: “Nunca había visto nada parecido, poseía una potencia extraordinaria, muy superior a la del antisuero”.

Para su estudio, Fleming estableció una estrategia de obtención que pasaba por una especie de impuesto para los visitantes de su laboratorio: todos debían dejar sus lágrimas. A los voluntarios se les “ayudaba” con tres peniques y cáscara de limón. La extensión del estudio en vegetales, huevos y fluidos animales de lo más diverso, para lo que se solicitó colaboración ciudadana, provocó numerosas anécdotas, pero creció su prestigio.

Los primeros estudios le llevaron a interrogantes. Si el fluido nasal lisaba las bacterias nasales, ¿por qué coexistían ambas? Si todos los fluidos tenían el efecto bactericida, ¿por qué había infecciones? ¿Por qué la concentración del “antiséptico” era tan variable pero especialmente alta en la clara de huevo? ¿De qué naturaleza sería la misteriosa sustancia?

Como Fleming reconoció más tarde, el moco probado inicialmente era de su propio resfriado, y ante los resultados obtenidos había varias explicaciones posibles. Podía deberse a algo consustancial a la secreción, una especie de antiséptico natural por su potencia y rapidez, pero no era muy probable porque sería incompatible con los microorganismos de la piel y las mucosas. Otra posibilidad era que se tratara del fenómeno descrito hacía unos años por Twort. Lo descartó cuando comprobó que la lisis estaba causada por distintos fluidos mucosos de numerosos organismos de las más variadas especies, y que la actividad lítica del moco, lágrimas, etc. difundía por el agar cuando se incorporaba en su espesor, y la naturaleza del fenómeno de Twort no



Fleming observa que en su fluido nasal había una sustancia con acción bactericida.

Episodios más importantes relacionados con Fleming y la lisozima.

- 1921: Fleming observa la capacidad bacteriolítica del moco
Ponencia en el Club local de Investigación Médica
- 1922: Con Allison, artículo a la Royal Society
Es rechazado su ingreso en la Royal Society por la poca calidad de sus trabajos
Muere su hermano Tom
- 1924: Presencia de lisozima en leucocitos, escasa toxicidad, muy inferior a la de los antisépticos. Publicado en los *Proceedings* de la Royal Society
Publicación en *The Lancet* de la actividad antibacteriana de la clara de huevo
Nace su hijo Robert
- 1926: Publica en el *British Journal of Experimental Pathology* su experiencia de diferentes condiciones de administración en el poder bactericida de la sangre
Fichaje de F. Ridley, que fracasaría en su intento de purificación de la lisozima
Propuesto para la Cátedra de Bacteriología de la Universidad de Londres
- 1927: Publica en el *British Journal of Experimental Pathology* sus observaciones y reflexiones sobre las resistencias a la lisozima
- 1928: Muere su madre
Nombrado Catedrático con carácter efectivo
- 1930: Descubre la penicilina
El Premio Nobel Jules Bordet, en el Congreso Internacional de Microbiología, hace un encendido elogio de la lisozima de Fleming
- 1937: Purificación de la lisozima, y Robison, del grupo de Florey, demuestra su carácter enzimático
- 1963: Estructura tridimensional por rayos X

lo permitía; además, el fenómeno de Twort era “transmisible” y una gota de un tubo aclarado producía la lisis en un tubo turbio, mientras que el producto de Fleming no actuaba así. Luego quedaría ratificada la conclusión, cuando se conocieron las propiedades de los fagos.

Como vemos, excluidas estas opciones, por encontrarse en tantas células y tejidos y por la necesidad natural de protegerse frente a la de otra manera imparable invasión bacteriana, estimó que se trataría de una sustancia de naturaleza enzimática. De todas formas, muy prudentemente, en las primeras descripciones se cita como un antiséptico natural que participa de las características generales de las enzimas, pero que no interviene sólo sobre un limitado número de dianas, como las enzimas, sino que tiende más bien a destruir muchos microorganismos, por lo que parece un quimioterápico natural de efectos bacteriostáticos *in vivo*. Era más eficaz a pH ligeramente ácido, propio de focos infecciosos, y se liberaba al medio exterior, donde deben ser frenados los patógenos.

Seguramente fue trascendental romper con las ideas de Metchikoff, de gran autoridad en la época, defensor de que la naturaleza eliminaba los microbios patógenos mecánicamente, por descamación y arrastre de fluidos. Fleming demostró con la lisozima que “los tejidos poseen, en muy alto grado, el poder de destruir microbios”. Y en esa línea había que trabajar.

Un primer paso, que tenía su importancia, era “bautizarla”, y en una sesión en torno a la mesa de la biblioteca se pasó revista a toda la terminología utilizada. El Coccus A.F. (de A. Fleming) se denominó *Mycrococcus lyticus*, y por sugerencia, mejor imposición, del “Patrón” (A. Wright), *M. lysodeikticus* (del griego “el que se deja lisar”). En unos meses la sustancia destructora de bacterias se había denominado “agente bacteriológico”, “sustancia lítica” y “microenzima”. Como en el caso anterior, Wright, al que entusiasmaba la invención de palabras, impuso el término “lisozima” por las raíces griegas de *liso* (que rompía) y *zima* (dentro de lo vivo). Los debates sobre nomenclatura serían una constante en el posterior descubrimiento de la penicilina. Todavía continúan en la nomenclatura actual debido al conflicto de la fonética, interés comercial, nombre químico, uso de los científicos, registro y patentes, etc.

A partir de aquí, ¿cómo se las arregló Fleming para avanzar en el conocimiento de la lisozima? En primer lugar hizo un verdadero barrido, revisando su presencia y concentración en cientos de muestras pertenecientes a numerosas especies, y así pudo demostrar que en la clara de huevo había lisozima en una concentración superior a 200 veces la de las lágrimas.

Los estudios microbiológicos los resume Maurois como sigue: “Ensayó la acción de las lágrimas humanas sobre tres grupos de gérmenes. El primero se componía de

ciento cuatro especies inofensivas, encontradas en el aire del laboratorio; el segundo comprendía ocho gérmenes patógenos para determinados animales, pero no para el hombre; el tercero estaba formado por gérmenes patógenos para el hombre. Los resultados fueron los que había previsto. La lisozima actuaba enérgicamente sobre el setenta y cinco por ciento del primer grupo, y sobre siete especies (de ocho) del segundo. Su acción era débil sobre el tercer grupo, pero no nula. Por consiguiente, si se conseguía aumentar la proporción de lisozima del organismo, quizá se lograría detener el desarrollo de ciertos microbios peligrosos. Allí existía materia para una investigación”.

Más adelante observaría que los más resistentes eran también más resistentes a los fagocitos y se hizo una pregunta en una publicación de 1927, que resulta una premonición: ¿será que los microorganismos resistentes son los que se han seleccionado tras estar en contacto con la lisozima?

Los estudios comparativos los hacía por difusión en agar. En una placa con agar sembraba la cepa problema, con un sacabocados preparaba un pequeño pocillo en el que depositaba el antiséptico a probar, y tras la incubación en estufa leía la placa. En cada placa, y para cada cepa, ensayaba a la vez bicloruro de mercurio, fenol, solución yodada, acriflavina y una o varias muestras con lisozima (moco, lágrimas, etc.). El halo de inhibición de estos últimos solía ser el mayor. Este método le permitió obtener una ingente cantidad de datos.

Para ensayar la actividad biológica de tantas muestras adaptó un método de trabajo que había utilizado Wright en su grupo para valorar la actividad de los antisépticos en sangre. Era el *slide cell* de Storer puesto a punto por Fleming y Allison, con el que comprobó que cuanto mayor era la concentración de antiséptico más rápido se destruían los leucocitos y al final mayor era el crecimiento bacteriano. No ocurría así con la lisozima y concluyó que ésta, al ser menos tóxica, se podría utilizar en infecciones sistémicas.

El equipo estaba preparado para abordar la siguiente etapa: la experimentación animal. La inyección intravenosa al conejo de una solución de clara de huevo aumentó el poder bactericida del suero, pero el éxito fue fugaz pues no se podía pasar a la siguiente etapa: el uso en humanos. Era necesario purificar la lisozima para prescindir del huevo, que produciría reacciones intensas en los voluntarios. Pero mientras se intentaba purificarla, sin éxito, Fleming impulsó la ingestión oral de clara en algún voluntario para ver los cambios en la flora, y su uso en algún enfermo terminal.

Los intentos de purificar la lisozima, primero con la colaboración de Allison y luego con el “fichaje” de Ridley, resultaron un fracaso que Fleming aceptó resignadamente,

pero sin olvidarlo: “Algún día oiremos hablar otra vez de la lisozima”, solía repetir.

Quizás lo más importante es que Fleming disponía de un método de trabajo que, en sus etapas, es considerado universal y que dio sus frutos cuando llegó la penicilina, lo que el lector observará como una “aventura” casi repetida, incluyendo el fracaso de la purificación.

Fleming no se caracterizaba por presentar bien sus productos. Su cortesía, su falta de agresividad y su timidez, al menos aparente, le llevaban a trabajar más en el laboratorio que en las relaciones públicas, y a destacar más los problemas y errores que las ventajas y los éxitos. No es de extrañar que fuera “de derrota en derrota hasta la victoria final”. Con su flema británica era un optimista y no se derrumbó por el fracaso de la presentación de sus trabajos en la Royal Academy. ¡Los académicos no le preguntaron nada! Parece que no le afectó mucho que no lo admitieran en el seno de tan prestigiosa institución, ni la imposibilidad de purificar la lisozima, ni poderla aplicar a los enfermos; antes al contrario, da la impresión de seguir un camino previamente marcado con independencia de las circunstancias que le rodeaban.

La lisozima ha sido muy importante. Además de marcar el camino de la penicilina, como se ha revisado, es de gran interés como mecanismo defensivo inespecífico y por sus aplicaciones en oftalmología y alimentación, entre otras, así como en el laboratorio, pues rompe la mucina que recubre muchos patógenos, explica la sinergia con algunos antibióticos, etc.

En la actualidad, la lisozima está identificada como una muranidasa, hidrolasa del mucopéptido N-acetilmurámico, definiéndose la unidad como la cantidad que produce un descenso de la absorbancia a 450 nm de 0,001 por minuto a pH 6,24 y 25 °C usando una suspensión de *M. lysodeikticus*. En los catálogos comerciales se ofertan hasta nueve tipos de lisozima, de diversa procedencia humana (diferentes fluidos) y animal (huevos de gallina, pava...), y se siguen publicando muchos artículos sobre la lisozima, ratificando lo que predijo Fleming: “Oiremos hablar otra vez de la lisozima”.

BIBLIOGRAFÍA

- Barberán, J., García Rodríguez, J.A., González, J., Prieto, J. Historia de los antimicrobianos. SCM, Madrid 2003.
- Camacho Arias, J. Fleming. Nivola, Madrid 2001.
- Gil San Juan, P. Grandes personajes. Fleming. Castell, 1992.
- Maurois, A. La vida de Sir Alexander Fleming, 3ª ed. Cid España, Madrid 1963.
- Roberts, R.M. Serendipia. Descubrimientos accidentales en la ciencia. Alianza Editorial, Madrid 1992.