SENSIBILIZACION ANAFILACTICA POR TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA

Drs. ENRIQUETA DE NARANJO y PLUTARCO NARANJO

Laboratorios "LIFE" y Facultad de Medicina, Universidad Central, Quito

La asociación de las enzimas proteolíticas tripsina y quimotripsina se ha introducido en el campo terapéutico como un medicamento de acción antiinflamatoria. Existen en el comercio varias preparaciones, tanto para uso oral como para administración parenteral. Algunas especialidades contienen solamente estas enzimas como principios activos, mientras otras contienen también antibióticos, analgésicos y otras substancias. Algunas de estas preparaciones, para la administración parenteral, consisten en suspensiones en aceite vegetal.

Como la tripsina y la quimotripsina son proteínas, existe la posibilidad de que actúen antigénicamente y puedan provocar reacciones de carácter alérgico. En efecto, en la literatura médica[1-5] se citan varios casos de estas reacciones. De otra parte, desde hace mucho tiempo se conoce que ciertas substancias, en especial los aceites, facilitan el proceso de sensibilización anafiláctica en el ratón, rata, cobayo y otros animales[6-8], por lo cual se ha denominado a estas substancias "adyuvantes".

El presente trabajo estuvo destinado a estudiar si la asociación tripsina-quimotripsina es capaz de provocar la anafilaxis en el cobayo y si su suspensión en aceite potencializaba el efecto anafilactizante.

MATERIALES Y METODOS

Después de algunos ensayos preliminares se diseñó una primera serie de experiencias, en la cual la variable constituía la dosis preparante de las enzimas, disueltas en agua. A grupos de 10 cobayos se inyectó por vía subcutánea una dosis de la asociación tripsina-quimotripsina, comenzando con la dosis de 0,6 mg./kg., en una serie progresiva hasta llegar a 20 mg./kg.

Después de 21 días se administró la dosis desencadenante, por vía intravenosa, en dosis constante, de 5 mg./kg., de la misma solución acuosa.

En la segunda serie, la variable, fue la dosis desencadenante; para lo cual se administró a cada uno de los grupos de cobayos la misma dosis preparante, consistente en 5 mg./kg., administra-

da por vía subcutánea. Después de 21 días se administró la dosis desencadenante, por vía intravenosa, al primer grupo 2,5 mg./kg. y dosis progresivamente mayores a los siguientes grupos, hasta llegar a 20 mg./kg.

Las dos subsiguientes series se realizaron bajo el mismo diseño y dosis, con la única diferencia de que la asociación de enzimas se suspendió en aceite de maní.

Se utilizaron cobayos adultos jóvenes, de un peso que varió entre 300 y 350 g. y pertenecientes a ambos sexos.

Las enzimas utilizadas fueron: una preparación liofilizada, Ambozim, de la casa Richter, la cual se disolvió con agua inyectable y la suspensión oleosa, Quimar, de la casa Armour. Se hicieron los cálculos de equivalencia de unidades a gramos a fin de poder expresar todas las dosis en mg. e inyectar las dosis requeridas, en mg./kg.

RESULTADOS

1) *Dosis preparante mínima.*— En la primera serie de experiencias, en la cual la variable fue la dosis preparante, se encontró que con una dosis sensibilizante de 0,6 mg./kg., no se produjo ningún signo observable de reacción anafiláctica. Con la dosis de 1,25 mg./kg. (figura 1) aparecieron ya síntomas leves y moderados de trastornos respiratorios. Con la siguiente dosis de 2,5 mg./kg., hubo shock no mortal en uno de los 10 animales, es decir en el 10% y con la siguiente dosis de 5 mg./kg. hubo shock mortal en el 20% de animales. Con las dos dosis siguientes, es decir 10 y 20 mg./kg., el shock

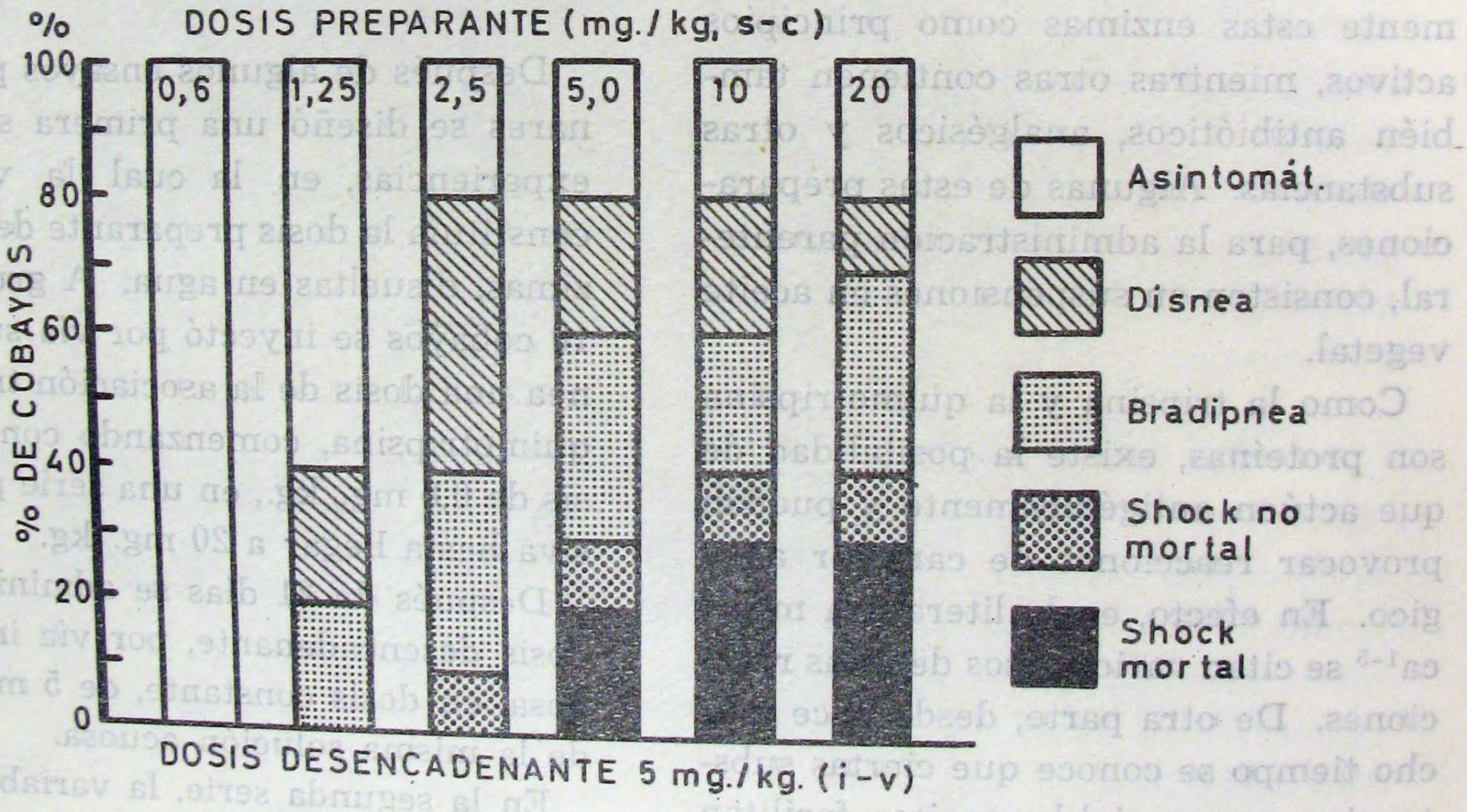

FIGURA 1.—**Estudio de dosis preparante mínima.**—Cada grupo de cobayos recibió una dosis preparante diferente de la asociación Tripsina-quimiotripsina en solución acuosa. 1 días después los animales recibieron por vía intravenosa una dosis desencadentnee igual (5 mg./kg.). Las barras del diagrama repreesntan el espectro de los síntomas de reacción anafiláctica.

mortal subió al 30%. Por consiguiente se consideró que la dosis preparante mínima era la de 5 mg./kg., con cuyo dato se efectuó la siguiente serie de experiencias.

2) *Relación entre la dosis desencadenante y el shock anafiláctico mortal.*— Con la dosis desencadenante más baja utilizada en esta serie, es decir de 2,5 mg./kg. se obtuvo sólo el 10% de mortalidad ,aunque se presentaron síntomas respiratorios leves y moderados en otro 50% de animales (figura 2). Con las dosis subsiguientes, el shock anafiláctico mortal afectó a un número creciente de animales hasta que con la dosis de 20 mg./kg. se produjo el shock mortal en el 100% de ellos, encontrándose que existe una relación directa entre la dosis desencadenante y el efecto anafiláctico.

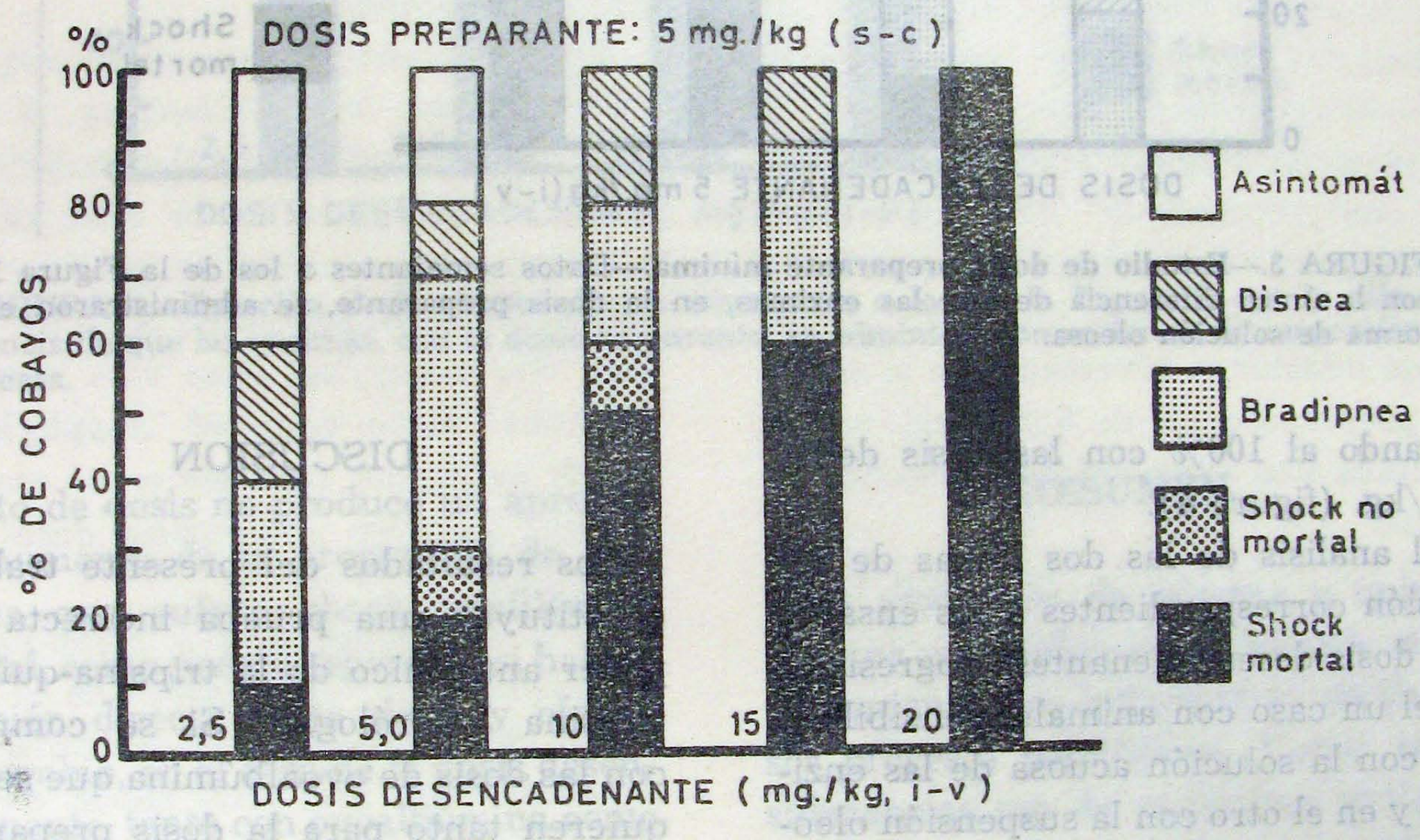

FIGURA 2.—**Relación dosis-efecto.**—Grupo de cobayos que recibieron una dosis constante de 5 mg./kg., por vía subcutánea, como dosis preparante de la asociación Tripsina-quimiotripsina. 21 días más tarde, cada grupo recibió, por vía intravenosa una dosis diferente de la misma substancia. En el diagrama puede verse el aumento progresivo del número de animales que sufrió shock mortal correlativamente a la mayor dosis desencadenante.

3) *Suspensión en aceite y dosis preparante progresiva.*— En esta serie experimental, la dosis preparante máxima que se utilizó fue la de 5 mg./kg. (figura 3). Con la dosis de 0,6 mg./kg. se observó que aparecieron síntomas respiratorios leves y moderados en el 50% de cobayos y con la dosis siguiente de 1,25 mg./kg. hubo ya shock mortal en el 10% de ellos, efecto que fue mayor con las dos dosis siguientes.

4) *Dosis desencadenante progresiva.*— En esta serie de animales, que fueron sensibilizados con las enzimas suspendidas en el aceite, se encontró que con la dosis desencadenante de 2,5 mg./kg., el shock anafiláctico mortal se produjo en el 30% de animales,

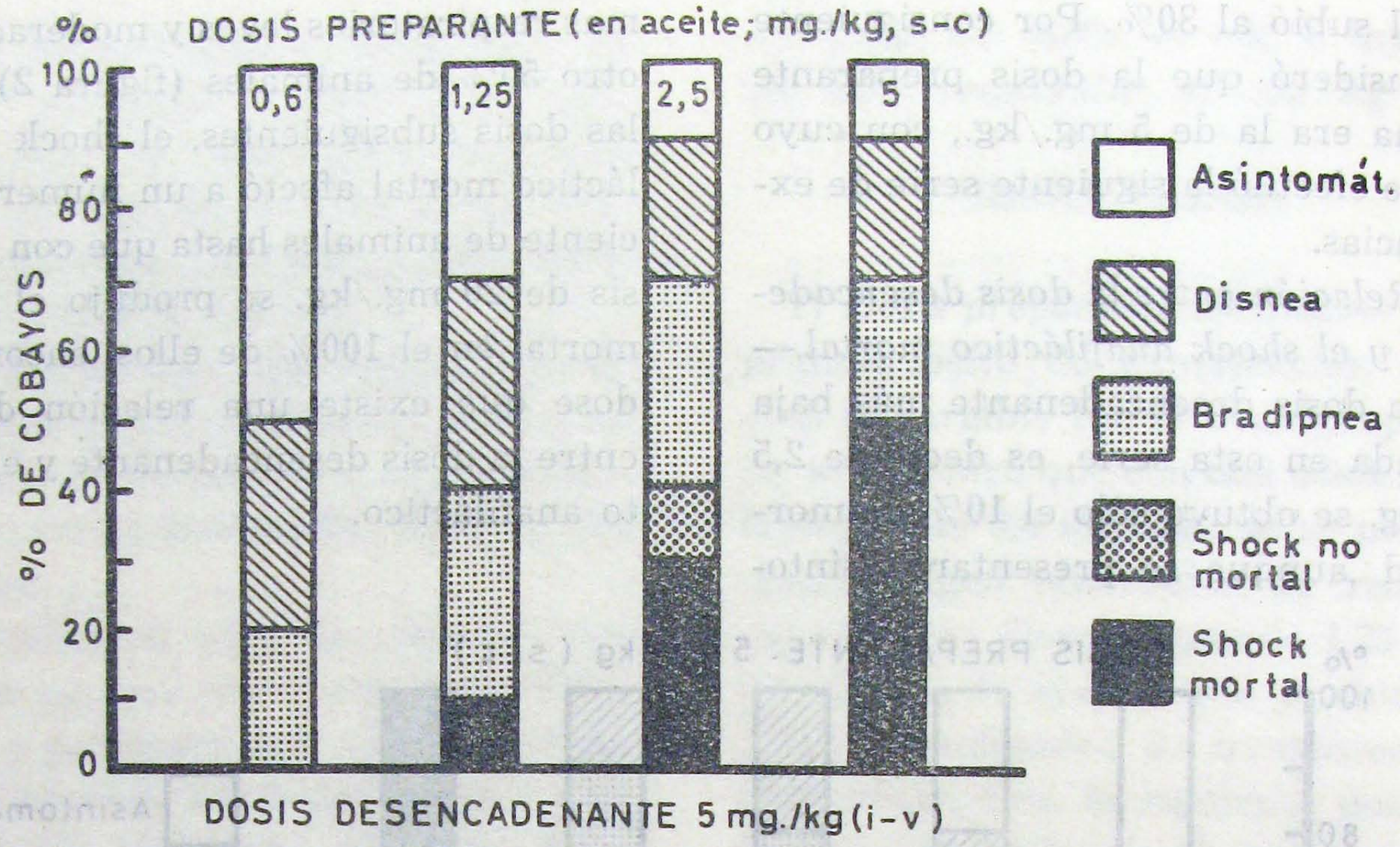

FIGURA 3.—**Estudio de dosis preparante mínima.**—Datos semejantes a los de la Figura 1, con la única diferencia de que las enzimas, en la dosis preparante, se administraron en forma de solución oleosa.

llegando al 100% con las dosis de 10 mg./kg. (figura 4).

El análisis de las dos líneas de regresión correspondientes a los ensayos con dosis desencadenantes progresivas, en el un caso con animales sensibilizados con la solución acuosa de las enzimas y en el otro con la suspensión oleosa, demostró que las diferencias son estadísticamente significativas.

Las dos últimas series experimentales demuestran que cuando se administran las enzimas tripsina-quimotripsina, suspendidas en aceite, tienen un efecto sensibilizante mayor que cuando se administran disueltas en agua. Este efecto "adyuvante" se manifiesta ya como una dosis preparante menor o si la dosis preparante es constante, como una dosis desencadenante más baja para producir el 50% o el 100% de shock anafiláctico mortal.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo constituyen una prueba indirecta del poder antigénico de la tripsina-quimotripsina heterólogas. Si se compara con las dosis de ovoalbúmina que se requieren tanto para la dosis preparante mínima como para la dosis desencadenante efectiva para producir el shock anafiláctico en el 50% de animales[9], se observa que se requiere una dosis más alta de estas enzimas, lo que indicaría que el poder antigénico de la tripsina y quimotripsina es inferior, en el cobayo, al de la ovoalbúmina.

Los resultados en las dos series en las cuales la variable fue la dosis preparante, confirman un trabajo anterior efectuado con ovoalbúmina[9], en el cual se encontró que una vez que se rebasa una dosis mínima preparante, un au-

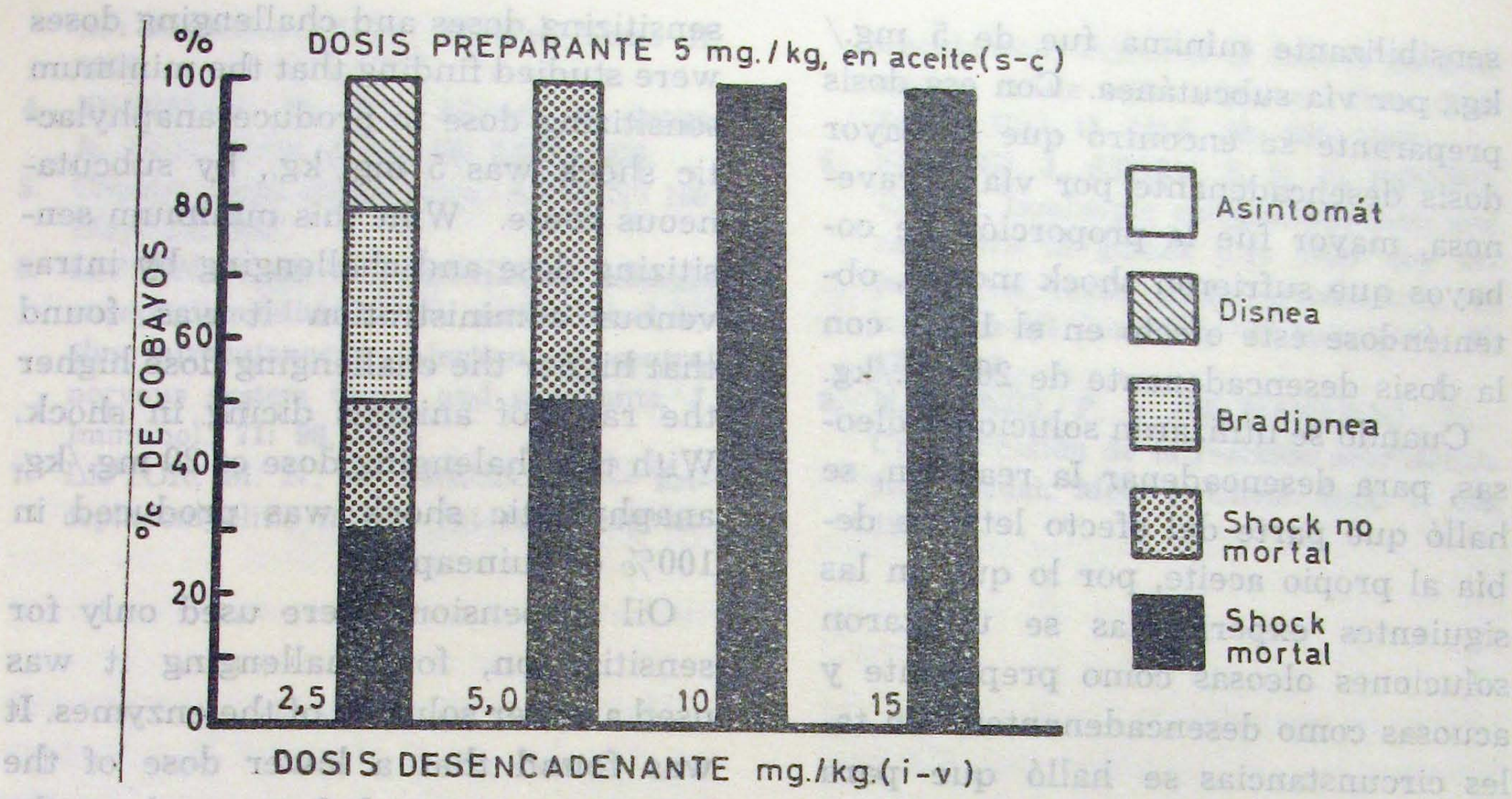

FIGURA 4.—**Relación dosis-efecto.**—Datos semejantes a los de la Figura 2, con la diferencia de que las enzimas, con la dosis preparante, se administraron en forma de suspensión oleosa.

mento de dosis no produce un apreciable aumento de la proporción de animales que sufren shock anafiláctico mortal, como podría esperarse si habría relación directa entre dosis y efecto. En cambio, en el caso de la dosis desencadenante, tanto con ovoalbúmina como con las enzimas trípticas hay correlativamente al aumento de dosis, un aumento de efecto letal.

Por fin, el hecho de que la suspensión de las enzimas en el aceite haya aumentado el efecto sensibilizante, revela que el aceite vegetal, en este tipo de experiencias, en cobayos, puede actuar también como los llamados "adyuvantes" incompletos, ya que los llamados adyuvantes completos, incluyen también la suspensión de bacterias muertas, correspondientes a ciertas especies.

RESUMEN

La asociación de tripsina y quimotripsina es ampliamente utilizada en el tratamiento anti-inflamatorio, en diversos procesos patológicos. Como estas substancias son de naturaleza proteica existe la posibilidad de que actúen alergénicamente y, en efecto, se han descrito accidentes alérgicos inducidos por la administración de estas enzimas.

El presente trabajo estuvo destinado a investigar si las enzimas utilizadas terapéuticamente son capaces de producir anafilaxis en el cobayo y si su suspensión en aceite facilitaba la sensibilización anafiláctica.

Se ensayaron diversas combinaciones de dosis preparantes y desencadenantes tanto de soluciones acuosas como oleosas y se encontró que la dosis

sensibilizante mínima fue de 5 mg./kg., por vía subcutánea. Con esa dosis preparante se encontró que a mayor dosis desencadenante por vía intravenosa, mayor fue la proporción de cobayos que sufrieron shock mortal, obteniéndose este efecto en el 100% con la dosis desencadenante de 20 mg./kg.

Cuando se utilizaron soluciones oleosas, para desencadenar la reacción, se halló que parte del efecto letal se debía al propio aceite, por lo que en las siguientes experiencias se utilizaron soluciones oleosas como preparante y acuosas como desencadenantes. En tales circunstancias se halló que para producir el shock mortal en el 50% de cobayos se necesitaba una dosis preparante inferior o, inversamente si la dosis preparante era de 5 mg./kg., se necesitaba una dosis inferior desencadenante.

Se concluye que la asociación tripsina-quimotripsina heterológica, en dosis apropiadas son capaces de producir la anafilaxis en el cobayo y que su suspensión en aceite potencializará el efecto anafilactizante.

SUMMARY

Since the association of trypsine and chemotrypsine is being extensively used in therapeutics and some allergic reactions had been described, the present work was designed to study the anaphglactic capacity of these proteins when used as water solution and oil suspensions.

Experiments were carried out on guineapigs. Combinations of different sensitizing doses and challenging doses were studied finding that the minimum sensitizing dose to produce anaphylactic shock was 5 mg./kg., by subcutaneous route. Wiht this minimum sensitizing dose and challenging by intravenous administration it was found that higner the challenging dose higher the ratio of animals dicing in shock. With the chalenging dose of 20 mg./kg. anaphylactic shock was produced in 100% of guineapigs.

Oil suspensions were used only for sensitization, for challenging it was used a water solution of the enzymes. It was found that a lower dose of the proteins was needed to produce the anaphylactic sensitization or in the case that the 5 mg./kg. dose was used, to produce same ratio of anaphylactic shock as in the first series of experiments, a lower chalenging dose was required.

It is concluded that a combination of trypsine and chemotrypsine is able to produce anaphylactic sensitization in guineapigs, and fatal shock depending upon appropriate dose for sensitization and challenging. The suspension of the enzymes in oil enhances the anaphylactic sensitization.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SAMTER, M. y BARRIMAN, G. H.— Drug allergy. Rev. Pharmacol., **4: 265**, 1964.
2. FEINBERG, S. M.— Allergy from therapeutic products. J. A. M. A., **178: 815**, 1961.
3. CORTES, J. L.— Alergia clínica. Principales características en México. Impresio-

nes Modernas, S. A., México, Tomo II, 1958.
4. SHERMAN, W. B.— Allergy to drugs. N. York, State, J. M., 56: 3.527, 1956.
5. Chymar, legal action. Clin.-Alert, Nº 109, Mayo 24, 1967.
6. LIPTON, M. M. G. FREUND, J.: Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants. J. Immunol., 71: 98, 1953.
7. LIPTON, M. N., G. FREUND, J.— Encephalomyelitis in the rot following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. Proc. Soc. Exper. Biol. G. Med., 81: 260, 1952.
8. FREUND, J., STERN, E. R., G. PISANO, T. M.— Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. J. Immunol., 57: 179, 1947.
9. NARANJO, P. y DE NARANJO., E.— Cuantificación de la reacción anafiláctica. Rev. Ecuat. Med. y Cienc. Biol. 1: 198, 1963.