

La Prueba de Transformación de Linfocitos en Blastos, en Alergia a la Insulina.

Dr. Mario Sánchez-Medina y Dr. Jaime Cortázar

En muy numerosas ocasiones ha sido comentada la necesidad de disponer de un método confiable para diagnosticar la existencia de alergia a una droga (1-5). Es obvia la importancia de un método que evite accidentes alérgicos que en ocasiones son mortales; lo anterior ha sido especialmente frecuente con antibióticos del tipo penicilina (6-10).

La prueba "in vitro" consistente en el cambio morfológico de linfocitos a linfoblastos en medio de cultivo adecuado, el cual es producido en forma sistemática por sustancias como la fitohemaglutinina, ha sido empleada con éxito en el diagnóstico de alergia a drogas varias (11).

Se presenta el caso de una paciente que hace una reacción alérgica de tipo eritodérmico, después de la inyección de 40 U de insulina cristalina ovina, administrada en el tratamiento de una diabetes mellitus descompensada.

MATERIAL Y METODOS

Se trata de una mujer, M.N. de P. N° 1323, de la Asociación Colombiana de Diabetes, diabética que no había sido tratada con insulina, pero de quien se ignora que haya recibido insulina inyectable, raza blanca, nacida y residenciada en Bogotá. Presenta inicialmente un cuadro consistente en el día de la consulta anterior a la aparición del cuadro que luego se describe, deshidratación, poliuria, polidipsia y astenia. La paciente venía siendo compensada con sulfodrogas. La investigación de glicemia mostró 320 mg/100 Somogy-Nelson; le fue

ordenada inyección subcutánea de 40 U de insulina cristalina y la misma dosis por vía endovenosa.

Dieciocho horas después la paciente hace un rash erimematoso localizado en miembros inferiores y en brazos. Ante la reducción de la cifra de glicemia, no se consideró necesario continuar la administración de insulina, y se mantuvo hidratada con solución de lactato de sodio 6/M. A las 48 horas la paciente había hecho una reacción eritodérmica en los miembros inferiores, acompañada del resto del síndrome: edema, descamación en bandas, prurito con intensa sensación de ardor etc. Continuó sin insulino-terapia y se controló mediante sulfodrogas. Puesto que la solución de lactato de sodio 6/M carece de la capacidad hapténica, se sospechó de inmediato que la reacción, típicamente alérgica, hubiese sido ocasionada por la insulina. Se decidió comprobar lo anterior mediante la prueba "in vitro" de la transformación de linfocitos en linfoblastos. (Figura N° 1).

Prueba de la transformación de linfocitos en linfoblastos.

Los requisitos de la prueba son: disponer de un medio de cultivo adecuado y estéril, en el cual se investigue la capacidad para producir cambios en la morfología de linfocitos de un suero problema, fenómeno que se podrá comparar con el producido en forma sistemática por la fitohemaglutinina.

- 1) Con jeringuilla seca, cuyas paredes se han recubierto de 0.2 cc de solu-

Figura 1



ción de heparina (1000U), se succionan 220 ml. de sangre del paciente; se agita suavemente la jeringuilla.

2) Para obtener mejor sedimentación se reparte la sangre en cuatro tubos en lugar de uno, colocando 5 ml. en cada tubo. Dejar sedimentar durante 2 horas; aspirar y reunir el suero sobrenadante, que será el suero problema. Las células remanentes serán empleadas más adelante.

3) En tres frascos provistos de tapa y con capacidad para 15 ml. cada uno, colocar medio de cultivo DYFCO YC-199, 6 ml. por frasco. Agregar mínima cantidad de antibióticos convencionales, p.e. 250 U de penicilina sódica + 2.5 mg. de sulfato de estreptomycin por frasco. Rotular los frascos N° 1, N° 2, y N° 3.

4) Agregar al frasco N° 1, IV (cuatro) gotas de solución de fitohemaglutinina N° 052870 DYFCO; agregar al frasco N° 2 un ml de suero proble-

ma. Agitar el frasco N° 3 queda como testigo, negativo, conteniendo exclusivamente el medio de cultivo.

- 5) Reunir los sedimentos de los 4 tubos con sangre dejada para tal fin en el paso "2"; centrifugarlos a 2000 revoluciones 'durante 15'; descartar el sobrenadante.
- 6) Agregar, mediante pipeta, 1 ml de células a cada uno de los tres frascos. Agitar.

En este momento el contenido de los frascos será el siguiente:

N° 1: medio de cultivo, fitohemaglutinina y células;

N° 2: medio de cultivo, suero problema y células;

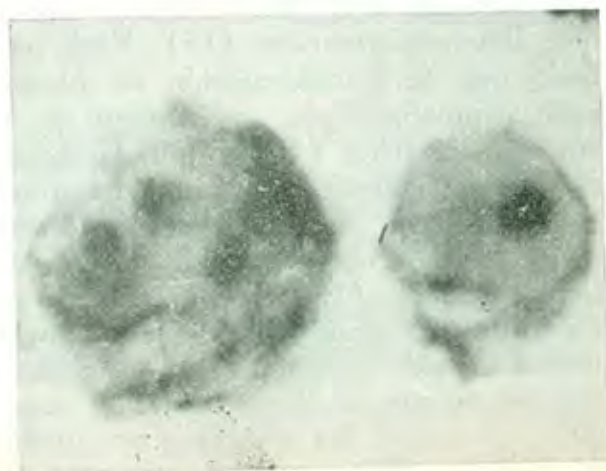
N° 3: medio de cultivo y suero de paciente que haya recibido insulina sin presentar reacción alérgica a ella, y células.

- 7) Incubar a 37°C durante 96 horas; tomando muestras para coloración mediante Giemsa madura y estudio, a las 24, 48 y 96 horas.

RESULTADOS

Los controles, Frc. N° 2, con fitohemaglutinina, mostraron transformación de linfocitos en linfoblastos a partir de las 12 horas; (Figura 2), el suero pro-

Figura 2



blema produjo transformación de linfocitos en linfoblastos, el cual fue observado a partir de las 24 horas.

En los controles con fitohemaglutinina aparecieron 1 a 3 nucleolos, fijados y teñidos en tono más oscuro.

El control de negatividad fue satisfactorio. En relación al efecto del suero problema, a las 24 horas aparecieron transformaciones de linfocito en linfoblasto, con células binucleadas; a las 43 horas las mismas células mostraron núcleos más grandes, después de este tiempo la morfología del núcleo duplicado era la misma.

COMENTARIOS

La alergia a drogas se explica como la resultante de una acción inmunobiológica, actuando los farmacos como haptenos o complejos responsables de la reacción específica. La alergia a insulina no es frecuente y las reacciones graves son muy raras y hay dificultad para determinar por métodos directos o indirectos (13) el hecho mismo. Las reacciones a drogas dan una modalidad de hipersensibilidad retardada, ésta, condicionada por anticuerpos circulantes (14); sin embargo aquellas no evidencian a dichos anticuerpos fácilmente. Es también evidente que solamente una fracción de los linfocitos responde al estímulo antigénico y por ello sería sólo una parte de la población linfocitaria la que lleva información (15). Está probado que la transformación de blastos está acompañada por un aumento de la síntesis del DNA (16) y que la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas es estimulada por el antígeno mismo (17). Se han demostrado la síntesis de los anticuerpos (18) cuando se cultivan los linfocitos periféricos *in vitro* y la transformación linfoblástica en pacientes con alergia de tipo inmediato, cuando se incluyen los alérgenos en medio de cultivo (19).

De acuerdo con los autores que han trabajado en estas pruebas (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28), se evidencian por una técnica de cultivo tisular, las alteraciones visibles, por etapas cronológicas, en la morfología y actividad del linfocito, por el aumento y aparición de la reduplicación del nucleolo, por cambios en la cromatina celular.

La prueba de transformación de blastos es sencilla, pero la preparación del cultivo de linfocitos debe ser llevada a cabo en rigurosas condiciones de esterilidad, variando sin duda de una droga a otra, la cantidad de antígeno utilizado y teniendo en cuenta la acción tóxica que tienen muchas sustancias sobre el linfocito.

El caso clínico motivo de esta comunicación presenta una vez más la evidencia de la actividad antigénica de un farmaco y su capacidad de desarrollar reacciones severas y la necesidad de lograr una verdadera confrontación sobre la etiología del síndrome clínico desencadenado por la inyección de insulina.

RESUMEN Y CONCLUSIONES:

- 1º Se describe la técnica para llevar a cabo la prueba "in vitro" de transformación de linfocitos en linfoblastos, como método diagnóstico de alergia a drogas, y en el caso particular a la insulina.
- 2º Se presenta un caso diagnosticado positivamente mediante la prueba mencionada, de alergia a la insulina, en una mujer ignorada diabética, de 40 años de edad.
- 3º Se comenta en forma general la utilidad del método diagnóstico de transformación de linfocitos en linfoblastos, altamente sensible y de probada utilidad en la práctica médica.

BIBLIOGRAFIA

- 1—SCHELLEY, W. B.: "Indirect basophil degranulation test for allergy to penicillin and other drugs" J. A. M. A. 184:171. 1963.
- 2—BAKER, P. J.; BERNSTEINT, M.; PASSANEN, V. and LANDY, M.: "Immuno-adherence bretonite test". J. Immunol. 97:767, 1966.
- 3—ROBITT, J.R.; SHECHTER, H. and POLLACK, V. E.: A Critical evaluation of the indirect basophil degranulation test. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 11: 608, 1964.
- 4—REDMOND, A. P.; AND LEVICEN, B. B.: The relationship between direct immediate skin test and passive transfer in man. J. Allergy, 39: 51, Junary. 1967.
- 5—SALAZAR MALLEN Y ORTIZ, L.: Descripción de un nuevo método inmunológico para determinar la alergia a la penicilina. Alergia, 7:423. 1960.
- 6—KERN, R. A. and WIMBERLEC, N. A. Jr: "Penecillin reactions: the nature, growing importance, recognition, manadgement and prevntion". Am. J. Med. Sci. 226:357. 1953.
- 7—PAULL, A. M.: "Occurence of the L-E phenomenon in a patient with a severe penicillin reaction". New Eng. J. Med. 252:128. 1955.
- 8—HEGGIE, A. D.: "Incidence of circulating antibody to penicillin in penicillin hipersensitivity reactions". New Engl. J. Med. 262: 1160. 1960.
- 9—LEVINE, B. B. and OVARY, Z.: "Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N- (d-alfa-bencil-peniciloyl) group as an antigenic determinant responsible for hipersensitivity to penicillin G." J. Exper. Med. 114: 875. 1961.
- 10—PARKER, C. W.: "Penicillin allergy". Am. J. Med. 34:747. 1963.
- 11—HALPERN, B.; KY, N. T. and AMACHE, N.: "Diagnosis of drug allergy in vitro with lymphocyte transformation test". J. Allergy 40:16-181. (sep.) 1967.
- 12—HANAUER, L. and BATSON, J.M.: "Anaphylativ shock following insulin injection. Case report and review of the literature". Diabetes 10:105. 1961.
- 13—PRAUSNITZ, C.: The Passive Transfer of Allergy. Intern' l Arch. Allergy; 8: 115. 1956.
- 14—KARUSH, F., and EISEN, H.N.: A theory of delayed hipersensitivity. The main features of the phenomen are explicable in terms of high affinity humoral Antibody, Science, 136: 1032. 1962.
- 15—Halpern, B. et all: op. cit. 11:178.
- 16—HOLLAND, P. and MAUER, A. L.: Drug-Induced "in vitro" stimulation of peripheral lynphocytes, Lancet, 1: 1368. 1964.
- 17—VISCHER, T. L.: Lymphocyte cultures in drug hipersensitivity. Lancet 29: 467. 1966.
- 18—HOLLAND, P. et all: op cit.15.
- 19—GIARARD, J. P., ROSE, N. R. KUNZ, M. R., KOBARASHI, S. and ARBESMAN, C. E.: "In vitro" lymphocyte Transformation in atipic patients, induced by antigens.
- 20—HIBSCHHORN, K.; BACH, F.; KOLLODNY, R. L.; FIRSCHEIN, I. L. and HASHEM, N.: "Immune response and mitosis of hurçon peripheral blood lymphocytes 'i'n vitro". Science. 152:1182. 1963.

- 21 — MILER VON JAN.: Measuring Lymphocytic transformation, *Lancet* 7432: 300, 1966.
- 22 — AMOS, D.B. et al: Skin donor selection by Leucocyte Typing. *Lancet*, 7432: 300. 1966.
- 23 — HEILMER, H. D. and Mc Farland, W.: Mitogenic activity of Bacterial Fractions Lymphocytic Cultures, *J. of Immunol.* 96: 6. 988. 1.966.
- 24 — CARON, G. A. and SARKANY, I.: Role of Plasma Factors in the Transformation of Peripheral Blood Lymphocytes into Lymphoblast. *Nature*, 216: 1966.
- 25 — HAAHEM, N.: Blastoid transformation of Lymphocytes, *Lancet* 11, 7415: 742. 1966.
- 26 — HUMMELER, K. HARDES. T. N. ET AL. Electron Microscopic Observations on Antibody producing Cells in Lymph and blood, *J. Exp. Med.* 124: 02, Ag. 1, 1966.
- 27 — HUMMELER, K. HARDES, T. N. ET AL. Electron microscopis observations on antibody producing Cells in Lymph and blood. *J. Exp. Med.* 124: 02, Ag. 1, 1966.
- 28 — SALAZAR MALLEN, M. y COL.: Comunicación personal: abril, 1967.