Denise Shimbo Misumi

**Validação do teste de ativação de basófilos no
diagnóstico de reações de hipersensibilidade a
anti-inflamatórios não esteroidais**

Dissertação apresentada a Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Cristina Maria Kokron

Versão corrigida

**São Paulo
2013**

Denise Shimbo Misumi

**Validação do teste de ativação de basófilos no
diagnóstico de reações de hipersensibilidade a
anti-inflamatórios não esteroidais**

Dissertação apresentada a Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Dra. Cristina Maria Kokron

Versão corrigida

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Misumi, Denise Shimbo

Validação do teste da ativação de basófilos no diagnóstico de reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais / Denise Shimbo Misumi. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Cristina Maria Kokron.

Descritores: 1.Teste de desgranulação basófila/métodos 2.Basófilos 3.Antígenos CD63 4.Hipersensibilidade a drogas/diagnóstico 5.Hipersensibilidade a drogas/sangue 6.Antiinflamatórios não esteróides 7.Curva ROC 8.Sensibilidade e especificidade

USP/FM/DBD-085/13

A versão original encontra-se disponível na Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD).

Dedico este trabalho a Américo, Tochimi, Francis, Simone, aos
médicos, amigos e pacientes, que tanto me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu namorado e minha irmã, que sempre me apoiaram na realização das minhas ambições.

À Dra. Cristina Maria Kokron pela orientação de mãe coruja durante quase cinco anos, desde a época da graduação, ajudando-me sempre que fosse necessário.

Ao Professor Dr. Fábio Fernandes Morato Castro, por abrir as portas para o mundo da pesquisa e da clínica médica.

Ao Professor Dr. Jorge Kalil por conceder-me a oportunidade de conhecer a medicina traducional/translacional e realizar o meu projeto de mestrado.

À Maíra Pedreschi pelos ensinamentos sobre a técnica e pela constante disposição em me ajudar, não importasse qual o problema.

Ao Luís Felipe Chiaverini Ensina e a Luciana Kase Tanno pela ajuda na construção deste projeto e o constante incentivo.

Ao Professor Dr. Éspér Georges Kallás, a Dra. Karina Carvalho Salmazi e a Fernanda Romano Bruno por todo o suporte na citometria de fluxo.

Aos médicos e residentes do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP pela oportunidade de acompanhar de perto a rotina médica, bem como dirimir minhas dúvidas.

À Rosana Coutinho e ao Serafim Fidalgo pela ajuda extremamente valiosa na coleta de sangue dos pacientes e controles.

Ao Osvaldo Júnior pelo apoio para contactar os pacientes.

Aos amigos do laboratório do LIM-60, que tanto me auxiliaram na parte laboratorial e psicológica.

Aos colegas de pesquisa, que colaboraram para meu aperfeiçoamento acadêmico.

À banca de qualificação, que muito contribuiu para o amadurecimento do projeto.

À Tânia e Andreia pelo apoio com os trâmites da pós graduação.

Ao meu amigo Marcel Caritá Vaz pelas contribuições enriquecedoras e esclarecedoras.

Aos pacientes que participaram do meu projeto, por serem minha motivação e por toda ajuda fornecida.

À FAPESP e ao Programa Institutos do Milênio (MCT) pelo apoio financeiro.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Reações Adversas a Medicamentos (RAMs)	2
1.2	Reações de Hipersensibilidade	2
1.3	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)	4
1.3.1	Mecanismo de ação dos AINEs	5
1.3.2	Tipos de manifestações clínicas	7
1.4	Métodos diagnósticos.....	10
1.4.1	Testes <i>in vivo</i>	10
1.4.2	Testes <i>in vitro</i>	11
1.5	Justificativa.....	17
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	MÉTODOS	20
3.1	Casuística.....	21
3.1.1	Seleção dos pacientes e controles.....	21
3.1.2	Critérios de inclusão – pacientes	22
3.1.3	Critérios de inclusão – controles	23
3.1.4	Critérios de exclusão – pacientes e controles.....	23
3.1.5	Diagnóstico	23

3.2	Materiais.....	24
3.2.1	Material biológico	24
3.2.2	Anti-inflamatórios não esteroidais	24
3.2.3	Controle positivo	24
3.2.4	Soluções de reagentes	25
3.2.5	Anticorpos monoclonais	25
3.3	Métodos.....	25
3.3.1	Preparo dos medicamentos nas concentrações a serem utilizadas no BAT	26
3.3.2	Padronização das concentrações dos anti-inflamatórios não esteroidais.....	27
3.3.3	Metodologia do BAT.....	28
3.3.4	Estratégia de análise no programa FlowJo ®	30
3.4	Crítérios de Positividade do BAT	33
3.5	Sensibilidade e Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo	34
3.6	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Padronização das concentrações dos AINEs – Etapa A.....	37
4.1.1	Influência do etanol no BAT	37
4.1.2	Ácido acetilsalicílico	38
4.1.3	Diclofenaco	40
4.1.4	Dipirona.....	42
4.1.5	Paracetamol.....	44
4.2	Perfil da casuística e Resultados do BAT – Etapa A.....	46
4.3	Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa A.....	50
4.4	Padronização com ácido acetilsalicílico – Etapa B.....	50
4.4.1	Uso do tampão de estimulação com IL-3.....	50
4.4.2	Curvas dose-resposta sem tampão de estimulação	51
4.4.3	Curvas tempo-resposta sem tampão de estimulação	53
4.4.4	Ampliação do tamanho amostral.....	53
4.4.5	Definição do Critério de Positividade	56

4.5	Perfil da casuística e Resultados do BAT – Etapa B.....	57
4.5.1	Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa B	61
5	DISCUSSÃO.....	62
5.1	Etapa A.....	65
5.1.1	Ácido acetilsalicílico	65
5.1.2	Diclofenaco	67
5.1.3	Dipirona.....	68
5.1.4	Paracetamol.....	69
5.1.5	Curvas dose-resposta	71
5.1.6	Perfil da Casuística e Resultados do BAT – Etapa A.....	71
5.1.7	Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa A	74
5.1.8	Etapa B	76
5.1.9	Ampliação do tamanho amostral.....	78
5.1.10	Definição do Critério de Positividade	79
5.1.11	Perfil da Casuística – Etapa B	81
5.1.12	Resultados do BAT – Etapa B	82
5.1.13	Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa B	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7	CONCLUSÕES.....	88
8	ANEXOS.....	90
9	REFERÊNCIAS	112

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

%	Porcentagem
%CD45 ⁺ IgE ^{+high} CD63 ⁺	Porcentagem de eventos positivos para CD45, CD63 e positivo “high” para IgE
°C	Grau centrígrado
<	Menor
>	Maior
AAS	Ácido acetilsalicílico
Ac	Anticorpos
AIA	Asma Induzida por Aspirina
AINE(s)	Anti-inflamatório(s) não esteroideal(is)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	“Allophycocyanin” (aloficocianina)
APCs	“Antigen Presenting Cells” (células apresentadoras de antígenos)
BAT	“Basophil Activation Test” (Teste de Ativação de Basófilos)
β lactâmicos	Antibióticos betalactâmicos
C	Controle
CAPPesq	Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
CD45	“Cluster of differentiation” 45 (designação de grupos)
CD63	“Cluster of differentiation” 63 (designação de grupos)
CD123	“Cluster of differentiation” 123 (designação de grupos)
CD203c	“Cluster of differentiation” 203c (designação de grupos)
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL-8	Interleucina 8

DIC	Diclofenaco
DIP	Dipirona
DREA	Doença Respiratória Exacerbada por Aspirina
ENDA	“European Network for Drug Allergy” (Rede europeia para alergia a medicamentos)
<i>et al.</i>	e outros
Fab	“Fragment antigen binding” (fragmento que se liga aos antígenos)
Fc	Fragmento cristalizável
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
fMLP	Nformil-metionil-leucil-fenilalanina
FITC	“Fluorescein isothiocyanate” (isotiocianato de fluoresceína)
FMO	“Fluorescence Minus One” (fluorescência menos um)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSC-A	“Forward scatter – A” (dispersão frontal da luz, que mede área)
FSC-H	“Forward scatter – B” (dispersão frontal da luz, que mede altura)
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator” (fator estimulador de colônia de macrófagos)
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA-DR	“Human Leucoyte Antigen, subclass DR” (antígeno leucocitário humano, subclasse DR)
Hpss	Hipersensibilidade
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-3	Interleucina-3
LIM-60	Laboratório de Investigação Médica 60

Linfomonogran	Linfócitos, monócitos e parte dos granulócitos
MFI	“Mean fluorescence intensity” (média de intensidade de fluorescência)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
P	Paciente
PAR	Paracetamol
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (salina tamponada com fosfato)
PE	“Phycoerythrin” (ficoeritrina)
PerCP	“Peridinin-chlorophyll-protein complex” (complexo proteína clorofila peridinina)
Qtdade	Quantidade
RAMs	Reações Adversas a Medicamentos
ROC	“Receiver Operating Characteristic” (curva de características operacionais)
SC	Sistema complemento
SI	“Stimulation Index” (Índice de Estimulação)
SSC-A	“Side scatter” (dispersão lateral da luz, que mede granulosidade)
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
T _H 1	Linfócito “helper” 1 (subtipo de linfócito T auxiliar)
T _H 2	Linfócito “helper” 2 (subtipo de linfócito T auxiliar)
TPO	Teste de provocação oral
WHO	“World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)

Lista de Figuras

Figura 1 - Desenho esquemático do mecanismo de ação dos AINEs	6
Figura 2 - Esquema simplificado da ativação dos basófilos.....	14
Figura 3 - Esquema da metodologia do Teste de Ativação de Basófilos na etapa A.....	29
Figura 4 - Estratégia de análise dos resultados do citômetro usando o programa Flow Jo®.....	32
Figura 6 – Comparação entre as condições com PBS (Basal) e as com etanol (Etanol).....	37
Figura 5 – Curvas dose-resposta do AAS.....	39
Figura 7 - Curvas dose-resposta do diclofenaco de sódio injetável	41
Figura 8 - Curvas dose-resposta da dipirona de sódio injetável	43
Figura 9 - Curvas dose-resposta do princípio ativo do paracetamol	45
Figura 10 - Curva dose-resposta dos pacientes e dos controles	52
Figura 11 - Resultados da ampliação do tamanho amostral do BAT	54
Figura 12 - Representações gráficas das curvas ROC	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista das RAMs previsíveis e imprevisíveis	2
Tabela 2 - Tipos de reações de hipersensibilidade, segundo classificação ampliada de Gell & Coombs	3
Tabela 3 - Tipos de reações agudas de hipersensibilidade a AINEs	7
Tabela 4 - Exemplos de materiais e metodologias do BAT na literatura.....	15
Tabela 5 - Valores de Sensibilidade e Especificidade para AINEs e outros medicamentos, segundo diferentes estudos	16
Tabela 6 - Diagnósticos dos pacientes baseados em histórias clínicas, respostas do questionário (Anexo C), testes de provocação e resultados dos BATs	48
Tabela 7 - Resultados dos BATs dos controles	49
Tabela 8 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do Teste de Ativação de Basófilos	50
Tabela 9 - Valores de área abaixo da curva ROC	56
Tabela 10 - Diagnósticos dos pacientes na etapa B, baseados em histórias clínicas e respostas do questionário do Anexo C	59
Tabela 11 - Resultados dos BATs dos controles na etapa B	60
Tabela 12 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do Teste de Ativação de Basófilos somente com AAS	61
Tabela 13 - Compilação dos valores de sensibilidade e especificidade do BAT para AINEs relatados na literatura	75

Lista de Anexos

Anexo A - Aprovação do projeto pela CAPPesq	91
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	92
Anexo C - Questionário sobre histórico de uso e hipersensibilidade aos AINEs testados	97
Anexo D - Composições dos reagentes usados no BAT	98
Anexo E - Tabela dos pontos de corte baseados em curvas ROC	99
Anexo F - Resultados dos BATs dos pacientes na Etapa A	100
Anexo G - Resultados dos BATs dos controles na Etapa A	104
Anexo H - Resultados dos BATs dos pacientes da etapa B	108
Anexo I - Resultados dos BATs dos controles da etapa B.....	110

Resumo

Misumi, DS. *Validação do teste de ativação de basófilos no diagnóstico de reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Atualmente, o diagnóstico das reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) baseia-se na história relatada pelo paciente e, em determinados casos, é realizado o Teste de Provocação. Todavia, este teste pode expor os pacientes a riscos graves, inclusive anafilaxia. Em busca de ferramenta mais segura, tem-se estudado o Teste de Ativação de Basófilos (BAT). Trata-se de um teste *in vitro*, no qual é possível testar diversos estímulos em uma única amostra de sangue, avaliando a ativação dos basófilos (indicativo de reação de hipersensibilidade), através do aumento da expressão de moléculas na superfície desses leucócitos, como o CD63. **Objetivo:** Padronizar e validar o BAT para ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco, dipirona e paracetamol em pacientes com hipersensibilidade a AINEs. **Metodologia:** Participaram 20 (testados com os quatro AINEs) + 33 (testados somente com AAS) pacientes atendidos no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, que apresentaram manifestações cutâneas em até 24 horas após exposição a um ou múltiplos AINEs, bem como 13 (quatro AINEs) + 26 (AAS) controles. A técnica consistiu em incubar sangue total com os AINEs já mencionados e, depois, marcar as amostras com anticorpos monoclonais (CD45, anti-IgE e CD63) para posterior leitura por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram comparados com as histórias clínicas e os testes de provocação oral, quando realizados. **Resultados:** Utilizando os critérios de positividade do BAT empregados na literatura (isto é, porcentagem de CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ e índice de estimulação), a sensibilidade e a especificidade variaram de acordo com o AINE: para ácido acetilsalicílico foram 75,0% e 16,7%, respectivamente, diclofenaco, 100% e 0%, dipirona, 23,5% e 66,7%, paracetamol, 40,0% e 42,9%. Após a realização de curvas

dose-resposta e tempo-resposta somente com AAS, foi encontrado novo critério de positividade: média de intensidade de fluorescência (MFI) menor do que 6575 representava BAT positivo; com isso, os valores de sensibilidade e especificidade foram: 84,4% e 34,6%, respectivamente. O BAT foi mais sensível em pacientes cuja última reação ocorreu há menos de um ano da data de execução do BAT (93,7%). **Conclusão:** Devido aos baixos valores de sensibilidade e/ou especificidade, não foi possível padronizar e, por conseguinte, validar o BAT para ácido acetilsalicílico, diclofenaco, dipirona e paracetamol.

Descritores: 1. Teste de desgranulação basófila/métodos 2. Basófilos 3. Antígenos CD63 4. Hipersensibilidade a drogas/diagnóstico 5. Hipersensibilidade a drogas/sangue 6. Antiinflamatórios não esteroides 7. Curvas ROC 8. Sensibilidade e especificidade

Abstract

Misumi, DS. *Validation of Basophil Activation Test for the diagnosis of hypersensitivity reactions to nonsteroidal antiinflammatory drugs* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Currently, the diagnosis of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) hypersensitivity is based on patients' clinical history and drug provocation tests, which are done in selected cases. Nevertheless, this test may expose patients to severe risks, including anaphylaxis. Looking for a safer tool, Basophil Activation Test (BAT) for allergy diagnosis has been studied in the last years. It is an *in vitro* method where a wide variety of stimuli can be tested, incubating them with the patient's blood sample, and observing basophil activation (indication of hypersensitivity) through upregulation of CD63 (or other basophil activation markers) on this leucocyte's membrane. **Objective:** To standardize and validate BAT stimulated with acetylsalicylic acid (ASA), diclophenac, dipyrone and paracetamol in NSAID hypersensitive patients. **Methods:** Patients which reported immediate reactions (less than 24 hours) after exposure to one or multiple NSAIDs, with cutaneous symptoms were enrolled from Clinical Immunology and Allergy outpatient clinic from HC-FMUSP. BAT with the four NSAIDs was tested on 20 patients and 13 controls and BAT with ASA only, on 33 patients and 26 controls. BAT consisted of incubating whole blood with NSAIDs, then triple-labeled with monoclonal antibodies (CD45, anti-IgE, CD63) for analysis by flow cytometry. BAT results were compared to clinical history and oral provocation tests, when available. **Results:** According to literature's positivity criteria (percentage of CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ and stimulation index), sensitivity and specificity varied according to the NSAID tested: for ASA was 75.0% and 16.7% respectively, diclophenac, 100.0% and 0.0%, dipyrone, 23.5% and 66.7%, paracetamol, 40.0% and 42.9%. A new positivity criterion was possible to be defined after further dose-response and time-response curves only for ASA: Mean Fluorescence Intensity lower

than 6575 (positive BAT). Accordingly, new sensitivity and specificity for BAT in ASA hypersensitivity were 84,4% and 34,6%. Patients that presented the last reaction in the last year were more likely to present a positive BAT (93.7%). **Conclusion:** Due to low values for sensitivity and/or specificity, it was not possible to standardize and validate BAT for ASA, diclophenac, dipyrone and paracetamol.

Descriptors: 1.Basophil degranulation test/methods 2.Basophils 3. Antigens, CD63 4. Drug hypersensitivity/diagnosis 5.Drug hypersensitivity/blood 6.Anti-inflammatory agents, non-steroidal 7.ROC curve 8.Sensitivity and specificity

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reações Adversas a Medicamentos (RAMs)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (“World Health Organization” – WHO) (1), entende-se por reação adversa a medicamentos (RAM) qualquer resposta prejudicial ou indesejável, não intencional, a um medicamento, que ocorre nas doses habitualmente empregadas no homem para profilaxia, diagnóstico, terapia de doença ou para a modificação de funções fisiológicas.

As RAMs dividem-se em previsíveis, relacionadas aos efeitos farmacológicos dos medicamentos, e imprevisíveis, associadas às características de cada indivíduo (2) (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista das RAMs previsíveis e imprevisíveis

Previsíveis	Imprevisíveis
Superdosagem	Intolerância
Efeitos colaterais	Idiossincracia
Efeitos secundários (exemplo: mudança da flora intestinal pelo uso de antibióticos de largo espectro)	Alergia (hipersensibilidade mediada por Imunoglobulina E - IgE)
Interação entre duas ou mais drogas	Pseudo-alergia (hipersensibilidade não mediada por IgE)

Tipos de reações adversas a medicamentos (RAMs) classificadas como previsíveis e imprevisíveis.

Legenda: RAMs: reações adversas a medicamentos.

Fonte: Greenberger, 2006 (3)

1.2 Reações de Hipersensibilidade

Dentre as reações imprevisíveis, merecem destaque as de hipersensibilidade, que correspondem a cerca de 1/6 das RAMs (4). Podem afetar diversos órgãos e expressar-se em uma grande variedade de manifestações clínicas, sendo que as mais comuns são os acometimentos cutâneos, como urticária e angioedema (2).

De acordo com a classificação ampliada de Gell & Coombs, as reações de hipersensibilidade podem enquadrar-se em sete tipos (Tabela 2).

Tabela 2 - Tipos de reações de hipersensibilidade, segundo classificação ampliada de Gell & Coombs

	Mecanismo Imunológico	Manifestações clínicas
Tipo I	Ativação de mastócitos e basófilos via IgE	Rinite alérgica, asma, anafilaxia sistêmica
Tipo II	Opsonização e fagocitose via fagócitos e células “natural killer”	Anemia hemolítica, trombocitopenia
Tipo III	Recrutamento do Sistema complemento	Reação de Arthus, doença do soro
Tipo IV a	Ativação de monócitos por citocinas T_H1	Dermatite de contato (com IVc)
Tipo IV b	Inflamação eosinofílica por citocinas T_H2	Asma e/ou rinite crônicas, exantema maculopapular com eosinofilia
Tipo IV c	Lise celular por linfócitos T via perforinas e granzima B	Dermatite de contato, hepatite, exantema maculopapular bolhoso
Tipo IV d	Inflamação neutrofílica relacionada a CXCL-8 e GM-CSF	Doença de Behçet

A classificação ampliada de Gell & Coombs associa os mecanismos imunológicos com as manifestações clínicas, subdividindo-os em sete tipos.

Fonte: adaptado de Pichler *et al.* (2010) (4)

Contudo, cabe esclarecer que, apesar desta classificação ser a mais comum, nem todas as reações de hipersensibilidade podem ser categorizadas com esses critérios (2).

Em relação aos anti-inflamatórios não esteroidais, o foco deste estudo, a hipersensibilidade pode ser tanto alérgica, quanto não alérgica(5).

Segundo Abbas *et al.* (2008) (6), para que ocorra uma reação de hipersensibilidade alérgica (ou do tipo I), é necessário que a pessoa já tenha sido sensibilizada, ou seja, exposta a determinado alérgeno anteriormente, por inalação, pele ou via parenteral, e desenvolvido resposta imunológica.

Nesses casos, o primeiro contato da pessoa com o alérgeno fez com que este fosse capturado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), processado e apresentado aos linfócitos T auxiliares. Isso ativou linfócitos T_H2 que, através de citocinas, estimularam a troca de isotipo para

classe E nos linfócitos B; com isso, houve produção de imunoglobulinas E (IgE) plasmáticas, específicas para tal alérgeno, que se ligaram aos receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) de mastócitos e basófilos (7). Por conseguinte, a partir do segundo contato do indivíduo com o alérgeno, este se ligará (“cross-linking”) à IgEs específicas ancoradas nos mastócitos e basófilos, ativando-os, resultando na liberação de mediadores próinflamatórios, que desencadearão os sintomas clínicos da alergia (6).

As reações de hipersensibilidade não alérgica apresentam sintomas parecidos com os da alérgica, mas sem comprovação de mecanismo imunológico envolvido (5, 8).

1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) abrangem um grupo heterogêneo de fármacos com ações analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Sendo usados para controle da febre e das dores agudas ou crônicas, correspondem a 30% dos medicamentos consumidos no mundo (9). Considerando as RAMs, os AINEs figuram entre os principais causadores, respondendo por cerca de 20 a 25% das reações de hipersensibilidade a drogas (10).

Segundo Castro *et al.* (2012) (11), em levantamento realizado a partir dos prontuários médicos dos pacientes atendidos no Ambulatório de Reações Adversas a Medicamentos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP), 59,7% dos pacientes com reações imediatas, atendidos no ano de 2011, relataram reação compatível com hipersensibilidade a AINEs.

No caso dos AINEs, somente uma pequena porcentagem das reações são do tipo I, mediadas por IgE, ou seja, reações alérgicas. Na maioria dos

casos, trata-se de uma reação de hipersensibilidade não alérgica, cujos mecanismos de desencadeamento das reações ainda não estão completamente esclarecidos. Há fortes evidências de que eles sejam mediados pelas ações farmacológicas dos referidos medicamentos, mais especificamente, a inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) (10, 12).

1.3.1 Mecanismo de ação dos AINEs

De acordo com Vane (1971 *apud* Szczeklik *et al.*, 2009 (13)), quando há um dano na membrana celular, citocinas pró-inflamatórias ativam a enzima fosfolipase A2, presente em leucócitos e plaquetas. A referida enzima degrada os fosfolípidos, constituintes da membrana celular, produzindo ácido araquidônico. Este pode originar leucotrienos através da ação da enzima lipoxigenase, ou prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos através da ação da enzima ciclooxigenase (COX).

As duas isoformas de COX mais conhecidas são: COX-1, presente em quase todos os tecidos e associada com a produção de prostaglandinas “fisiológicas”, que são responsáveis por efeitos tais como proteção gástrica, agregação de plaquetas e manutenção do fluxo sanguíneo renal; COX-2, presente nos locais de inflamação, sendo expressa tanto por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos, como também por outros tecidos como rins, cérebro, ovários, útero, cartilagens e ossos. A COX-2 está associada com a produção de prostaglandinas fisiopatológicas, que têm ação pirogênica, podem causar eritema e aumentar a sensibilidade à dor (14).

Os AINEs de primeira geração, não seletivos, agem suprimindo as enzimas COX (Figura 1), reduzindo a produção de prostaglandinas fisiopatológicas e, portanto, inflamações, dores e febres, geradas pela COX-2. Por outro lado, também inibem a COX-1, fazendo com que ocorra a

diminuição das prostaglandinas “protetoras” e o aumento da síntese de leucotrienos e liberação dos mediadores próinflamatórios dos mastócitos e basófilos; fatores estes que provavelmente estariam envolvidos nas reações de hipersensibilidade aos AINEs (15).

Buscando evitar as consequências da inibição da COX-1, foram desenvolvidos AINEs de segunda geração, que inibem seletivamente a COX-2.

Figura 1 - Desenho esquemático do mecanismo de ação dos AINEs

Os AINEs não seletivos agem inibindo a ação das enzimas ciclooxigenase 1 e 2. Com isso, cessam os efeitos das prostaglandinas “fisiopatológicas”, mas também, das prostaglandinas “fisiológicas”.

Legenda: AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais, COX-1: enzima ciclooxigenase-1, COX-2: enzima ciclooxigenase-2.

Adaptado de Hilário *et al.*, 2006 (9).

1.3.2 Tipos de manifestações clínicas

Sánchez-Borges (2010) (12) afirmam que as reações de hipersensibilidade aos AINEs podem ser classificadas como agudas, quando ocorrem em minutos ou em até 24 horas após a exposição ao medicamento, ou tardias, quando se manifestam mais de 24 horas após a administração do AINE.

Dentre as reações agudas, que são as mais frequentes, os sintomas podem ser cutâneos, respiratórios, ambos (16, 17) ou até ocorrer choque anafilático (12).

A revisão do grupo ENDA/EAACI (2011) (17) dividiu os pacientes com reações agudas de hipersensibilidade a AINEs em quatro grupos (Tabela 3) que serão melhor descritos a seguir. Ainda, cabe esclarecer que os mecanismos que desencadeiam um tipo de manifestação ou o outro ainda não estão totalmente esclarecidos.

Tabela 3 - Tipos de reações agudas de hipersensibilidade a AINEs

Tempo da reação	Manifestações clínicas	Tipo de reação	Doenças de base	Possível mecanismo
Aguda (até 24 horas)	Rinite/asma	Múltiplos AINEs	Asma/rinossinusite/polipose nasal	Inibição COX-1
	Urticária/angioedema	Múltiplos AINEs	Urticária crônica	Inibição COX-1
	Urticária/angioedema	Múltiplos AINEs	Nenhuma	Desconhecida, provavelmente relacionada a inibição de COX-1
	Urticária/angioedema/anafilaxia	Único AINE	Atopia, alergia alimentar, alergia a medicamentos	Mediada por IgE

Categorização das reações agudas de acordo com as manifestações clínicas, tipo de reação, doenças de base e possíveis mecanismos.

Legenda: AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais, COX-1: cicloxigenase-1.

Fonte: adaptado de Kowalski *et al.*, 2011 (17).

1.3.2.1 Doença respiratória exacerbada por aspirina (DREA)

Esta subpopulação apresenta sintomas conhecidos como uma síndrome, que inclui rinossinusite crônica, polipose nasal e asma persistente, exacerbados com o uso de AINEs, mais comumente, ácido acetilsalicílico (AAS); essa síndrome também recebe o nome de asma induzida por aspirina (AIA), ou tríade Samter (“ASA/Samter triad”) (17). A prevalência dessa síndrome na população de adultos asmáticos pode ser de 4,3% a 11% e, entre adultos que possuem polipose nasal e asma, esse índice aumenta para 21% (12).

Os pacientes são reatores a múltiplos AINEs, sendo que a exacerbação causada é dose-dependente e provavelmente dependente da potência da inibição da COX-1. Geralmente, eles já reagem a baixas concentrações dos medicamentos, ou seja, doses menores do que as terapêuticas (18).

A hipótese da patogênese foi sugerida por Szczeklik *et al.* (1975) (19): a inibição da COX pelos anti-inflamatórios, aliada a anormalidades nos mediadores e receptores envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico são os fatores que causam as manifestações clínicas nestes pacientes.

De acordo com a Figura 1, verifica-se que a inibição da COX favorece a via da lipoxigenase, que tem como produto final os leucotrienos, potentes mediadores proinflamatórios e broncoconstritores. Os pacientes com DREA possuem elevado número de receptores para leucotrienos, o que contribui para o aumento da reatividade do trato respiratório e o aumento do recrutamento eosinofílico nesses locais; sendo esta uma característica de DREA (20). Ademais, foi verificado que estes pacientes apresentam baixos níveis de síntese de prostaglandina E₂, um inibidor da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos, eosinófilos e macrófagos, o que sugere um agravamento para a doença (20).

Kim *et al.* (2006)(21), a partir de um estudo de coorte com coreanos, propuseram que marcadores genéticos possam ser usados para identificar

pacientes que apresentam DREA. Além destes pesquisadores, outros encontraram possíveis predisposições genéticas, mas nenhum gene fortemente associado com DREA (12).

1.3.2.2 Doença cutânea exacerbada por aspirina

A doença cutânea exacerbada por aspirina manifesta-se em pacientes com urticária crônica idiopática. Os sintomas podem ocorrer na forma de urticária ou angioedema, podendo apresentar-se em até um terço dos pacientes com a doença controlada e em até dois terços naqueles com a doença ativa (12).

A patogênese deste tipo de sintoma ainda não está bem definida, mas estudos têm sugerido que há relação com a inibição da COX-1 (22), já que os pacientes têm reações com múltiplos AINEs, de famílias químicas distintas.

1.3.2.3 Urticária, angioedema e/ou anafilaxia induzidos por múltiplos AINEs

Esses sintomas ocorrem em pacientes que não possuem doença cutânea crônica (como no caso anterior) e geralmente, são desencadeados por diferentes AINEs, pertencentes ou não a mesma família química. Outra característica observada por Sánchez-Borges (2010) (12) é que esses pacientes comumente são atópicos, apresentando rinite e/ou asma.

Novamente, a patogênese não é conhecida, mas sugere-se que a inibição da COX-1 esteja envolvida, já que reações com inibidores de COX-2 são 50% menos frequentes do que as com inibidores de COX-1 (23).

1.3.2.4 Urticária, angioedema e/ou anafilaxia induzidos por um único AINE

Este subgrupo corresponde a cerca de 30% de todos os casos de hipersensibilidade a AINEs e cerca de 30% deles inclui alguns pacientes com urticária crônica (12).

A classe de AINE mais frequente neste subgrupo de pacientes são as pirazolonas (24).

Pacientes pertencentes a este grupo toleram outros AINEs quimicamente distintos, independente do grau de inibição da COX-1, ou seja, eles são reatores seletivos. Considerando o tempo de aparecimento e o padrão dos sintomas, é sugerido que o mecanismo seja mediado por IgE específica para o medicamento. Confirmando isso, Czerniawska-Mysic & Szczeklik (1981) (*apud* Kowalski *et al.*, 2011 (17)) verificaram que pacientes com hipersensibilidade seletiva a dipirona apresentam teste cutâneo positivo e IgE sérica específica para este medicamento.

1.4 Métodos diagnósticos

1.4.1 Testes *in vivo*

Até o presente momento, o teste tido como padrão ouro para diagnóstico de hipersensibilidade aos AINEs é o Teste de Provocação Oral (TPO) (25). Em linhas gerais, consiste em administrar controladamente um medicamento (pode ser uma droga alternativa, estrutural ou farmacologicamente relacionada à droga suspeita ou ela mesma), sob supervisão médica e em local com condições de reverter uma possível reação de hipersensibilidade grave (26). Este teste pode sofrer alterações na metodologia, como as dosagens testadas ou o tempo de duração, de acordo com os protocolos de cada local, ou os objetivos: diagnóstico ou para

encontrar alternativa terapêutica. No Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, primeiramente, é dado o placebo, depois, a cada 20 minutos, são ministradas, oralmente, 10%, 20%, 30% e 40% da dose terapêutica, diluídas em água, até atingir a dose cumulativa total equivalente à terapêutica da droga. Antes de cada dose (incluindo placebo) e uma hora após a última dose, são realizadas medidas de sinais vitais: frequência cardíaca, pulso, pressão arterial, ausculta pulmonar, pico de fluxo expiratório, saturação de oxigênio e exame físico. Diante de qualquer alteração, o teste é interrompido e o paciente é tratado (27).

Uma desvantagem apontada para o TPO é a subjetividade dos sintomas e a influência de fatores psicológicos (28).

Além disso, o teste ainda expõe o paciente a riscos. Por conta disso, no Ambulatório de Reações Adversas a Medicamentos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP, o diagnóstico de hipersensibilidade a AINEs baseia-se no histórico clínico que o paciente relata. Geralmente, o teste de provocação é realizado nos casos em que é necessário encontrar uma alternativa terapêutica, como nos casos de dor crônica; nesta situação, é testada uma droga de família farmacológica distinta daquela que o paciente alegou ter reação (29). Outra ferramenta muito utilizada em alergia é o teste cutâneo de leitura imediata (“prick test”), que avalia *in vivo* a presença de IgE específica. Todavia, no caso de hipersensibilidade a AINEs, ele tem aplicabilidade limitada ao pequeno grupo de reatores seletivos a AINEs (30), já que somente nestes casos, foram encontradas IgE específicas (31).

1.4.2 Testes *in vitro*

Um método bastante utilizado na rotina médica é a determinação dos níveis séricos de IgE específica. A quantidade desses anticorpos (Ac) é

medida na presença de outros Ac do mesmo isotipo e Ac de diferentes isotipos, mas específicos para o mesmo alérgeno (7). Este processo requer que, no mesmo ensaio, haja reconhecimento específico pelas porções Fab (ligação do alérgeno) assim como pelos epitopos isotipo específicos (porção Fc) e por este motivo, os métodos envolvem uma fase sólida para separação dos anticorpos IgEs ligados e não ligados. Contudo, nem todos os alérgenos estão disponíveis. Além disso, mais importante neste caso, é que a reação deve necessariamente ser mediada por IgE, fato que não ocorre na maioria dos casos de pacientes com hipersensibilidade a AINEs.

Há ainda outros ensaios, como os funcionais, que visam verificar a realização de algum processo envolvido na reação de hipersensibilidade, como o teste de liberação de histamina ou de leucotrienos, ou o teste de ativação de basófilos. Os dois primeiros testes ainda não apresentam resultados promissores com AINEs (32).

1.4.2.1 Teste de Ativação de Basófilos (BAT)

Os basófilos são um dos tipos celulares menos abundantes do sangue, correspondendo a menos de 1% dos leucócitos circulantes (33). Eles estão envolvidos nos mecanismos imunológicos de alergia e infecção helmíntica (34). Os basófilos, assim como os mastócitos, possuem receptores FcεRI em suas membranas celulares, onde as IgEs circulantes se ligam (35). Quando ocorre a ligação cruzada dessas IgEs ligadas a basófilos com determinado alérgeno, é desencadeada uma cascata de reações que culmina na liberação de mediadores inflamatórios, que antes estavam nos grânulos citoplasmáticos dos basófilos, desencadeando alterações clínicas e histopatológicas (7). O mais conhecido mediador armazenado nos grânulos citoplasmáticos é a histamina, em quantidade de cerca de 1 picograma/célula, pouco variando entre os indivíduos, mesmo os alérgicos. Além disso, ainda são armazenadas serinoproteases, liberadas na ativação

dos basófilos, como catepsina G, granzima B e basogranulina, sendo esta última exclusiva de basófilos (36).

Cabe esclarecer que a desgranulação não ocorre somente em reações mediadas por IgE, outros estímulos para os quais o basófilo possua receptores também são capazes de ativá-lo (34).

Tendo em vista o papel dos basófilos nas reações de hipersensibilidade e sua fácil obtenção via sangue, diversas pesquisas têm estudado o Teste de Ativação de Basófilos (BAT) como ferramenta no diagnóstico de hipersensibilidades. Em linhas gerais, o teste baseia-se na expressão de marcadores de ativação de basófilos antes e após o contato com estímulo.

Um destes marcadores de ativação de basófilos é o CD63. Foi a partir dele que se começou a estudar o BAT (37) e já há inúmeros trabalhos publicados com esse marcador (38). O CD63 (gp53 ou “Lysosome associated membrane protein – LAMP-3”) é uma glicoproteína pertencente à superfamília transmembrana-4, expressa em mastócitos, macrófagos e plaquetas (37). Nos basófilos em repouso, o CD63 é pouco abundante na membrana celular, mas em altas quantidades nas membranas dos seus grânulos citoplasmáticos contendo histamina (36). Assim, quando ocorre a ativação dos basófilos, há a fusão das membranas dos grânulos contendo histamina com a membrana celular do basófilo, fazendo com que aumente a quantidade de moléculas de CD63 na superfície celular (Figura 2) (36).

Figura 2 - Esquema simplificado da ativação dos basófilos

O basófilo em repouso apresenta poucas moléculas de CD63 em sua superfície, ao passo que as membranas dos grânulos citoplasmáticos contendo histamina têm elevada expressão destas moléculas. Após exposição a determinado estímulo, este se ligando diretamente a um receptor ou por outras vias, gera uma cascata de reações, que farão os grânulos citoplasmáticos migrarem rumo à membrana do basófilo. Com isso, ocorre a fusão das membranas dos grânulos com a do basófilo, aumentando a expressão de CD63 e liberando histamina e outros mediadores pró-inflamatórios.

Créditos: Denise S. Misumi

Outra molécula usada para caracterizar ativação dos basófilos é o CD203c (“neural cell surface differentiation antigen E-NPP3”). Ele é expresso constitutiva e exclusivamente na membrana dos basófilos. Após a ativação do basófilo, sua expressão aumenta, mas em menor magnitude do que CD63 (37); além disso, de Weck *et al.* (2008) (38) apontam que uma desvantagem em seu uso é a baixa expressão nos basófilos em repouso, o que poderia resultar em seleção incorreta das células de interesse nos controles negativos.

Até o momento, não há um consenso acerca da metodologia do BAT, diversos grupos têm testado variações nas diferentes etapas, buscando aprimorar a técnica (Tabela 4).

Tabela 4 - Exemplos de materiais e metodologias do BAT na literatura

Referência	Metodologia	Material usado	Anticorpos
(24)	"In house"	Sangue total	Anti-IgE-FITC e CD63-PE
	"In house"	Sangue total	Anti-IgE-FITC e CD203c-PE
(40)	"In house"	Leucócitos isolados	Anti-IgE-PE e CD63-FITC
(10)	Flow Cast® (Bühlmann Laboratories, Suíça)	Leucócitos isolados	Anti-IgE-PE e CD63-FITC
(41)	Basotest® (Orpegen Pharma Laboratories, Alemanha)	Sangue total	Anti-IgE-PE e CD63-FITC
(42)	BD FastImmune® (BD Biosciences, Estados Unidos)	Sangue total	CD-123-PE, anti-HLA-DR-PerCP, CD-63-FITC
(43)	Flow2Cast® (Bühlmann Laboratories, Suíça)	Sangue total	Anti-CCR3-APC e CD203c-PE

De acordo com as metodologias adotadas, tem-se usado diferentes materiais e anticorpos monoclonais para execução do BAT, não havendo, ainda, consenso na literatura sobre qual metodologia é a mais adequada.

Legenda: APC: alofococianina, FITC: isotiocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, PerCP: complexo proteína clorofila peridina

O BAT tem sido estudado utilizando os mais variados estímulos: venenos de abelhas e de vespas, alimentos, látex, alérgenos inalantes comuns, fármacos; todos com especificidade e sensibilidade variados. A Tabela 5 mostra os valores de sensibilidades e especificidades encontrados para AINEs em relação a outros medicamentos, compilada a partir de diferentes artigos.

Tabela 5 - Valores de Sensibilidade e Especificidade para AINEs e outros medicamentos, segundo diferentes estudos

Referência	Estímulos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Sanz <i>et al.</i> , 2002 (44)	β lactâmicos	50	93
Sanz <i>et al.</i> , 2009 (45)	Relaxantes musculares	54-64	93-100
Sanz <i>et al.</i> , 2005 (46)	AINEs	74	92
De Weck <i>et al.</i> , ENDA, 2006 (47)	AINEs	76	92
De Weck <i>et al.</i> , 2009 (10)	AINEs	75,4	73,5
Gamboa <i>et al.</i> , 2004 (40)	AINEs	15-55	74-100
Rodriguez-Trabado <i>et al.</i> , 2008 (41)	AINEs	43	100

Comparação do desempenho do BAT com AINEs em relação a outros medicamentos, mostrando que, em alguns trabalhos, a sensibilidade dos AINEs foi superior e a especificidade foi semelhante aos antibióticos e relaxantes musculares.

Legenda: AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais, β lactâmicos: antibióticos betalactâmicos, ENDA: "European Network for Drug Allergy".

A descoberta do BAT como possível alternativa para o diagnóstico de hipersensibilidade aos AINEs levou Sanz *et al.* (2009) (45) a afirmarem que "até o momento, o BAT é o único método *in vitro* que tem sido aplicado para avaliar tanto reações de hipersensibilidade alérgica quanto não alérgica aos AINEs, porém, mais estudos são necessários."

Em 2009, um estudo (10) que envolveu 11 diferentes centros de pesquisa, composto por membros do grupo ENDA, concluiu que o BAT pode ser uma boa ferramenta para diagnosticar pacientes com reações a múltiplos AINEs.

Em pacientes com hipersensibilidade seletiva, o BAT foi testado para dipirona, mostrando ser uma boa ferramenta no diagnóstico, complementando testes cutâneos (24).

Gamboa *et al.* (2004) (40, 45) avaliaram pacientes com DREA, tendo encontrado sensibilidade semelhante a encontrada em pacientes com manifestações cutâneas variando de 10 a 66,7%, dependendo do AINE. Em 2009, Çelik *et al.* (48) também avaliaram o BAT no grupo de pacientes com DREA e encontraram sensibilidade de 30%. Por conta da variabilidade dos

resultados de sensibilidade, ainda não se tem um consenso acerca da utilidade do BAT nesses pacientes.

Em 2009, Pedreschi (49) iniciou a pesquisa do BAT com AINEs no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia – LIM-60, onde o presente estudo foi realizado. Contudo, o tamanho amostral não foi suficiente para calcular os valores de sensibilidade e especificidade, porém, os resultados pareceram promissores.

1.5 Justificativa

Há elevado número de pacientes com hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais, a maioria com reações a múltiplos AINEs. Entretanto, o único método disponível para diagnóstico e para encontrar alternativa terapêutica é o TPO que, além de ser demorado, expõe o pacientes a riscos. Tendo em vista que os dados da literatura e a nossa própria experiência apresentaram resultados promissores, pretendemos, com este trabalho, padronizar e validar o BAT como ferramenta complementar para diagnóstico de hipersensibilidade a AINEs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi padronizar e validar o Teste de Ativação de Basófilos (BAT) para anti-inflamatórios não esteroidais.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Padronizar as concentrações a serem usadas no BAT com ácido acetilsalicílico, diclofenaco, dipirona e paracetamol.
- ❖ Definir critério(s) de positividade do BAT, a partir dos resultados obtidos na população de estudo.
- ❖ Calcular os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo para cada anti-inflamatório.

3 MÉTODOS

O estudo foi subdividido em duas etapas.

Na etapa A, foram testados quatro anti-inflamatórios não esteroidais: ácido acetilsalicílico, diclofenaco, dipirona e paracetamol.

Na etapa B, nosso estudo focou no ácido acetilsalicílico, por ter apresentado resultados mais favoráveis na etapa A e por sua versatilidade terapêutica.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP – CAPPesq (0662/08) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A). Todos os participantes do estudo foram esclarecidos quanto à natureza e finalidade do trabalho e convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Também responderam ao questionário estruturado a respeito do histórico de hipersensibilidade aos quatro AINEs usados no Teste de Ativação de Basófilos, outras alergias e medicamentos em uso (Anexo C).

3.1 Casuística

3.1.1 Seleção dos pacientes e controles

Durante o período de abril de 2010 a junho de 2012, os pacientes do Ambulatório de Reações Adversas a Medicamentos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia da Divisão de Clínica Médica I do HC-FMUSP, cujos questionários ENDA adaptados mostrassem história fortemente sugestiva de hipersensibilidade a AINEs, foram convidados para participar da pesquisa. Uma vez que o paciente concordasse em participar, era avaliado quanto aos critérios de inclusão e de exclusão. Os pacientes selecionados foram convidados a ler e assinar o TCLE, preencher o

questionário estruturado do Anexo C e, em seguida, o sangue era coletado. A seleção era limitada a dois ou três pacientes por dia de coleta.

Em todo BAT executado, havia pelo menos um indivíduo controle. O grupo dos controles foi composto por acompanhantes de pacientes, funcionários e membros da equipe médica do Ambulatório e membros da equipe de pesquisa do LIM-60.

Etapas A

Na etapa A, em que o BAT foi executado com os quatro anti-inflamatórios não esteroidais, participaram do estudo 20 pacientes (idades: 19 a 77 anos, média: 39,4 anos; 4 homens e 16 mulheres) e 13 controles (idades: 23 a 40 anos, média: 31 anos; 2 homens e 11 mulheres).

Etapas B

Do BAT apenas com ácido acetilsalicílico, participaram 33 pacientes (idades: 23 a 72 anos, média: 48 anos; 13 homens e 20 mulheres) e 26 controles (idades: 23 a 56 anos, média: 33 anos; 5 homens e 21 mulheres).

3.1.2 Critérios de inclusão – pacientes

Foram considerados como pertencentes ao grupo dos **Pacientes** os participantes que apresentaram TPO positivo ou história clínica fortemente sugestiva de hipersensibilidade: duas ou mais reações com o mesmo ou diferentes AINEs. No caso da etapa B os pacientes apresentaram, obrigatoriamente, pelo menos uma reação com AAS.

Somente foram incluídos na pesquisa os pacientes que apresentaram manifestações agudas, ou seja, cujo aparecimento dos sintomas iniciou-se em até 24 horas após a exposição ao(s) AINE(s).

3.1.3 Critérios de inclusão – controles

O grupo **Controle** foi composto por sujeitos que não tinham histórico de hipersensibilidade aos AINEs, podendo fazer uso deles sem quaisquer intercorrências.

3.1.4 Critérios de exclusão – pacientes e controles

Foram excluídos os indivíduos com urticária crônica, pois esta doença pode causar ativação de basófilos, sem qualquer relação com o estímulo.

Mulheres grávidas ou em processo de amamentação também foram excluídas.

Na ocasião da coleta de sangue, o participante não poderia ter usado anti-histamínicos e/ou corticosteroides sistêmicos nos sete dias que antecederam o procedimento, bem como não poderiam apresentar qualquer inflamação ou infecção.

Além das observações acima, a última reação de hipersensibilidade com AINEs não poderia ter ocorrido há menos 30 dias antes da coleta.

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico dos pacientes baseou-se nas respostas dos questionários estruturados (ANEXO C). Se o paciente tivesse sido submetido ao TPO, nos casos discordantes, o resultado deste se sobreporia em relação à história clínica.

3.2 Materiais

3.2.1 Material biológico

A coleta de sangue (10 mL) foi realizada em tubo de coleta a vácuo, heparinizado. O sangue foi mantido em temperatura ambiente até que o BAT fosse realizado, no período de até quatro horas após a coleta.

3.2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os estímulos medicamentosos utilizados para o BAT foram os seguintes:

- Ácido acetilsalicílico 500 mg (comprimido, EMS);
- Diclofenaco de sódio 25 mg/mL (injetável, Teuto);
- Diclofenaco de potássio (princípio ativo, Nostra Pharma);
- Dipirona 500 mg/mL (injetável, Farmace),
- Paracetamol (princípio ativo, Genix).

3.2.3 Controle positivo

O controle positivo do Teste de Ativação de Basófilos foi o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, Sigma Aldrich) que, *in vivo*, pode ser encontrado como produto da degradação de proteínas bacterianas. O fMLP é capaz de ativar basófilos através de receptores específicos para reconhecê-los (50). Assim sendo, apesar de não ser o mesmo mecanismo de ativação que ocorre com AINEs, o fMLP foi usado para testar a viabilidade dos basófilos na ocasião dos ensaios, na concentração final de 50 µg/L (51).

3.2.4 Soluções de reagentes

Para a execução do BAT foram utilizadas as soluções de PBS, lise de hemácias, tampão de estimulação com IL-3 e solução de fixação, cujas composições encontram-se no Anexo D.

3.2.5 Anticorpos monoclonais

Na etapa de marcação, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: CD45-PercP, concentração de 1:800 (Life Technologies), anti-IgE-FITC, concentração 1:285 (Life Technologies) e CD63-PE, concentração 1:100 (Life Technologies).

3.3 Métodos

A etapa A consistiu de duas fases:

1ª fase: Preparo dos medicamentos nas concentrações a serem usadas no BAT;

2ª fase: Padronização das concentrações dos anti-inflamatórios não esteroidais: realização de curvas dose-resposta para verificar quais concentrações apresentaram as melhores respostas.

A etapa B consistiu em duas fases:

1ª fase: Padronização das concentrações de AAS: realização de curvas dose-resposta e tempo-resposta para verificar quais condições apresentaram as melhores respostas;

2ª fase: ampliação do tamanho amostral, para definir os critérios de positividade.

3.3.1 Preparo dos medicamentos nas concentrações a serem utilizadas no BAT

Foram utilizados medicamentos tanto na forma líquida para uso injetável, quanto na sólida. Para que a leitura no citômetro de fluxo seja possível, os estímulos devem estar na forma líquida, livre de partículas.

No presente estudo, foram pesquisadas maneiras de solubilizar os AINEs que não estivessem na forma injetável, de maneira a se obter soluções homogêneas. Todas as soluções eram preparadas no dia em que o BAT era executado.

3.3.1.1 *Ácido acetilsalicílico*

Para o ensaio, o comprimido de 500 mg de ácido acetilsalicílico (AAS) foi pesado e depois macerado. Em seguida, foram feitos cálculos para obter a quantidade equivalente do princípio ativo a ser usado no BAT. Com base em Maia (2007) (52), 120 mg do princípio ativo de ácido acetilsalicílico foram diluídos em 600 µL de etanol 100%. Após 30 minutos, esta suspensão foi filtrada. Foram diluídos 200 µL da solução em 3800 µL de PBS, resultando na concentração final esperada de 10 mg ácido acetilsalicílico/mL. A partir desta concentração, a solução foi diluída em PBS para obter as concentrações finais utilizadas no ensaio (41): 0,04 / 0,08 / 0,15 / 0,30 / 0,60 / 1,25 / 2,50 / 5,00 mg/mL.

3.3.1.2 *Diclofenaco*

Inicialmente, utilizou-se este medicamento na forma injetável, diluindo em PBS, nas concentrações de uso.

Posteriormente, testou-se o princípio ativo, em pó:100 mg de diclofenaco potássico foram diluídos em 10 mL de água deionizada aquecida a 42°C, mantida sobre agitador magnético, até a obtenção de uma solução incolor (Souza (2004) (53)). Esta solução foi diluída em PBS para obter as concentrações finais usadas nas curvas dose-resposta: 0,01 / 0,02 / 0,04 / 0,08 / 0,15 / 0,30 / 0,60 / 1,25 mg/mL.

3.3.1.3 *Dipirona*

Este medicamento encontra-se na forma injetável. Para ser utilizado no ensaio, foi diluído em PBS (41), conforme as concentrações finais testadas: 0,04 / 0,08 / 0,15 / 0,30 / 0,60 / 1,25 / 2,50 / 5,00 mg/mL.

3.3.1.4 *Paracetamol*

O princípio ativo em pó (100 mg) foi diluído em 10 mL de água deionizada aquecida em torno de 42°C. A solução foi mantida no agitador magnético por cerca de 50 minutos, até tornar-se incolor. Esta solução foi diluída em PBS (41) para obter as concentrações finais de uso no BAT: 0,04 / 0,08 / 0,15 / 0,30 / 0,60 / 1,25 / 2,50 mg/mL.

3.3.2 Padronização das concentrações dos anti-inflamatórios não esteroidais

Nesta etapa, foi realizado o Teste de Ativação de Basófilos (adaptado de Pedreschi, 2009 (49) e Misumi, 2009 (51)), utilizando sangue total, tanto de pacientes quanto de controles.

O teste teve quatro condições que serviram como controle do ensaio e possibilitaram a análise dos resultados:

- **Basal**: controle negativo, usado para avaliar a condição dos basófilos dos indivíduos, na ausência dos AINEs; condição ausente na etapa B;
- **Etanol**: controle negativo para as condições com ácido acetilsalicílico, composto por PBS e etanol;
- **fMLP**: controle positivo, para avaliar viabilidade dos basófilos na ocasião do teste;
- **“FMO”**: “Fluorescence Minus One”, usado para definir a população negativa para CD63 nas análises dos resultados.

3.3.3 Metodologia do BAT

Na etapa A, o BAT consistiu de cinco fases (Figura 3):

a) Estimulação: Cada condição testada continha 200 µL de sangue total. A esta quantidade, foram adicionados 1,2 mL de tampão de estimulação contendo IL-3 e incubados a 37°C por 10 minutos.

Após centrifugação e retirada do sobrenadante, em cada uma das condições, foram adicionados:

- a. AINEs nas diferentes concentrações
- b. Basal e FMO: PBS
- c. Etanol: PBS + etanol 100% na concentração de 1:20
- d. fMLP (concentração final: 50 µg/L) (51)

A condição com fMLP foi incubada a 37°C por 15 minutos, as restantes, por 40 minutos.

b) Parada da reação: os tubos foram colocados no gelo, para evitar a desgranulação total dos basófilos.

c) Marcação: em cada um dos tubos foram adicionados CD45-

PerCP 1:800, anti-IgE-FITC 1:285 e CD63-PE 1:100; o tubo FMO recebeu somente CD45 e anti-IgE. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos.

d) Lise de hemácias: em todos os tubos foram adicionados 2 mL de solução de lise de hemácias a 37°C e incubados por 10 minutos no escuro. Depois, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes, desprezados. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS em cada tubo e centrifugados novamente. Após desprezar os sobrenadantes, os conteúdos dos tubos foram ressuspensos em 350 µL de PBS.

e) Leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience).

Quando a leitura no citômetro não era realizada no mesmo dia do BAT, as amostras nos tubos eram fixadas com 350 µL de solução de fixação e mantidas a 4°C até a data da leitura.

Figura 3 - Esquema da metodologia do Teste de Ativação de Basófilos na etapa A

O sangue total foi pré-incubado com tampão de estimulação e em seguida, com diferentes concentrações de AINEs e fMLP (controle positivo). Após a parada da reação no gelo, foram adicionados marcadores fluorescentes para identificar os basófilos e as moléculas de CD63 e realizada a leitura por citometria de fluxo.

Legenda: +: adição, AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais, FITC: isotiocianato de fluoresceína, fMLP: controle positivo (Nformil-metionil-leucil-fenilalanina), IL-3: interleucina 3, min: minutos, PE: ficoetirina, PerCP: proteína clorofila peridinina, T.A.: temperatura ambiente.

Crédito: Denise S. Misumi.

Na etapa B (BAT somente com AAS), foi excluída a fase de pré-incubação do sangue total com tampão de estimulação contendo IL-3 e a condição Basal. Dessa maneira, na **Estimulação**, ao sangue total, já foram adicionadas as soluções de ácido acetilsalicílico, fMLP ou PBS (sem e com etanol) e incubados a 37°C. Para a construção das curvas tempo-resposta, variou-se o tempo de incubação do sangue total com as soluções de AAS: 20, 30 e 40 minutos. As fases seguintes permaneceram sem alteração.

3.3.4 Estratégia de análise no programa FlowJo®

Os dados brutos gerados pelo citômetro de fluxo foram analisados através do programa FlowJo® (TreeStar, Inc; versão 9.3). A estratégia de análise será descrita a seguir, baseada em “FMO” (“Fluorescence Minus One”) (54).

1. As análises iniciaram-se pela amostra da condição “FMO”.
2. Gráfico “Time” x CD63-PE: o “gate” “Time” foi definido ao redor da região onde a fluorescência mais sensível, o PE, estava estável (Figura 4A).
3. Gráfico FSC-A x FSC-H: a partir da população selecionada no gráfico anterior, foi feito um “gate” na região mais próxima da bissetriz do gráfico (“Singlets”), buscando selecionar as células que passaram uma a uma no citômetro de fluxo, desprezando, assim, grupos de células que por

ventura tenham passado juntos e sido contabilizados como uma única célula (Figura 4B).

4. Gráfico FSC-A x SSC-A: a partir da população “Singlets”, definiu-se um “gate” para excluir debris, denominado Pop viável (Figura 4C).

5. Gráfico CD45-PerCP x SSC-A: partindo do “gate” Pop viável, foi desenhado o “gate” na região ao redor de monócitos, linfócitos e parte dos granulócitos (Linfomonogran), que delimitou a área onde os basófilos podem ser encontrados (Figura 4D).

6. Gráfico IgE-FITC x SSC-A: dentre a população selecionada no “gate” Linfomonogran, foi feito um “gate” na região IgE^{+high} (Figura 4E), identificando os basófilos, dentre outros leucócitos.

7. Gráfico CD63-PE x SSC-A: nesta etapa, foram selecionadas, dentre as células CD45⁺IgE^{+high}, aquelas que possuem moléculas de CD63 em sua superfície (Figura 4F). Por ser “FMO” (ou seja, essa amostra não recebeu marcação com o anticorpo CD63-PE), determinou-se a população negativa para CD63-PE. A população positiva pode ter porcentagem nula ou baixa de células detectadas pelo citômetro de fluxo, indicando autofluorescência.

8. Essas análises foram transferidas para as outras amostras do mesmo doador, sempre ajustando os “gates”.

Nos casos em que não foi possível distinguir as populações positiva e negativa, mantivemos o “gate” feito para o FMO.

Nas Figuras 4G e 4H, estão os gráficos do basal e do ácido acetilsalicílico na concentração de 0,15 mg/mL de um paciente.

Figura 4 - Estratégia de análise dos resultados do citômetro usando o programa Flow Jo®

Apresentação da estratégia de análise no Flow Jo®. As figuras **A-F** referem-se a análise do FMO, sendo que **A-C** são análises de controle de qualidade, **D** e **E** para identificação dos basófilos e **F** para definição dos quadrantes, delimitando população positiva e negativa para CD63. **G** e **H** são exemplos de resultados de basal e com ácido acetilsalicílico, obtidos por um paciente.

Legenda: A: "gate" "Time", B: "gate" "Singlets", C: "gate" Pop viável, D: "gate" Linfomonogran, E: "gate" $CD45^{+}IgE^{+high}$, F: "gate" $CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+}$, G: resultado de um paciente na condição basal, H: resultado do mesmo paciente testado, para ácido acetilsalicílico na concentração de 0,15 mg/mL.

3.4 Critérios de Positividade do BAT

Para cada condição testada, o Teste de Ativação de Basófilos era considerado válido se houvesse pelo menos 500 basófilos, quantidade verificada a partir da análise no programa FlowJo® (55).

Os resultados para fMLP (controle positivo) foram avaliados a partir da porcentagem no último “gate” (CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺) (56) (57).

Na etapa A, consideramos como critério de positividade para AINEs os seguintes parâmetros (40):

- a. Na condição estimulada, a porcentagem no último ‘gate’ (CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺) deve ser superior a 5%; e
- b. O Índice de Estimulação (SI) deve ser superior a 2. Seu cálculo é feito a partir da fórmula [1].

$$SI = \frac{\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+} \text{ tubo com AINE}}{\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+} \text{ tubo Basal/Etanol (controles negativos)}} \quad [1]$$

Foi considerado que um indivíduo teve BAT positivo para determinado AINE se, em pelo menos uma das concentrações testadas, o resultado foi positivo.

Na etapa B, a partir dos resultados dos BATs com AAS, foram construídas curvas ROC, baseadas em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média da intensidade de fluorescência (MFI) do CD63 ligado a ficoeritrina (PE), para as diferentes concentrações testadas de AAS.

O programa empregado para os cálculos das curvas ROCs foi o Prism® (GraphPad, versão 5.0).

3.5 Sensibilidade e Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo

Sensibilidade e especificidade são duas medidas que foram criadas para se avaliar a acurácia de determinado método diagnóstico (58). A primeira mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença entre aqueles que a possuem, ou seja, qual a frequência de verdadeiros resultados positivos. A segunda mede quão específico é o método, ou seja, sua capacidade de excluir aqueles que não possuem a doença.

Para o presente trabalho, essas medidas foram calculadas a partir das fórmulas [2] e [3].

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Quantidade de BATs positivos}}{\text{Quantidade de pacientes com hipersensibilidade}} \quad [2]$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Quantidade de BATs negativos}}{\text{Quantidade de controles sem hipersensibilidade}} \quad [3]$$

Já os valores preditivos quantificam a probabilidade de o indivíduo ter a doença se o resultado do teste dele é positivo (valor preditivo positivo - VPP) ou não ter a doença, se o resultado do teste dele é negativo (valor preditivo negativo - VPN) (58). Esses valores são calculados a partir das fórmulas [4] e [5].

$$\text{VPP} = \frac{\text{Quantidade de pacientes com BAT positivo}}{\text{Quantidade de BATs positivos}} \quad [4]$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Quantidade de controles com BAT negativo}}{\text{Quantidade de BATs negativos}} \quad [5]$$

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo foram calculados para cada AINE.

3.6 Análise estatística

Na etapa A, como análise estatística, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (“One-Way ANOVA” não paramétrico) com comparações múltiplas de Dunn para verificar se há diferenças entre as concentrações testadas. Além disso, também foi usado o teste de Mann-Whitney na comparação entre as respostas de pacientes e controles. Para verificar a influência do etanol no controle negativo (Basal), utilizou-se Wilcoxon pareado (“Wilcoxon matched pairs”).

Para a etapa B, na análise de curvas dose-resposta, tempo-resposta e ampliação do tamanho amostral, foi utilizado o teste de Friedman (“One-Way ANOVA” não paramétrico) com comparações múltiplas de Dunn para verificar as diferenças entre as concentrações com AAS e o Etanol e tempos de incubação. O teste de Mann-Whitney foi usado para avaliar as respostas de pacientes e controles, bem como pacientes com última reação de hipersensibilidade há menos de um ano da execução do BAT e os pacientes em geral.

Os cálculos foram realizados no software Prism® (GraphPad, versão 5.0).

Foram considerados valores estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização das concentrações dos AINEs – Etapa A

4.1.1 Influência do etanol no BAT

Tendo em vista que a solução de ácido acetilsalicílico utilizada tem etanol em sua composição, foi verificada sua influência no BAT de quatro pacientes e quatro controles (Figura 6), usando a mesma proporção de etanol presente na maior concentração da solução de ácido acetilsalicílico.

Figura 5 – Comparação entre as condições com PBS (Basal) e as com etanol (Etanol)

Resultados e medianas dos BATs de quatro pacientes e quatro controles, em termos de % CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, sem diferença estatística entre os controles negativos (Basal e Etanol), tanto para pacientes quanto para controles. Teste de Wilcoxon pareado.

Legenda: Basal – C: basal dos controles, Basal – P: basal dos pacientes, Etanol – C: controle negativo para as condições com AAS dos controles, Etanol – P: controle negativo para as concentrações com AAS dos pacientes, □: controle, ●: paciente, —: mediana.

No grupo dos pacientes, a mediana do Etanol apresentou tendência a ser menor do que a do Basal, ao passo que no grupo dos controles, foi o inverso. Contudo, tanto no grupo dos pacientes quanto no dos controles, estas diferenças não tiveram significância estatística, com $p = 0,2693$ nos pacientes e $0,5807$ nos controles. Mesmo assim, optou-se por manter a condição Etanol no BAT com AAS, por ser um controle negativo mais fidedigno.

4.1.2 Ácido acetilsalicílico

As curvas dose-resposta do BAT com ácido acetilsalicílico foram realizadas em oito pacientes e seis controles. A Figura 5 mostra os resultados e as medianas de pacientes e controles, baseados em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Figura 6 – Curvas dose-resposta do AAS

No gráfico estão representados os resultados e as medianas dos oito pacientes (coluna da esquerda) e seis controles (coluna da direita), baseados em %CD45⁺IgE⁺highCD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI). Foi encontrada diferença na resposta de 2,50 mg/mL no grupo dos pacientes, em termos de SI, pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn.

Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Etanol: controle negativo para as concentrações com AAS, MFI: média de intensidade de fluorescência, **:p<0,01.

A curva baseada em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ mostrou apenas uma tendência do pico da curva ser na concentração de 2,50 mg/mL. Entretanto, a curva de SI dos pacientes mostrou, nesta concentração, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao Etanol. Já a concentração de 5,00 mg/mL revelou tendência de queda nas respostas. Com MFI, as menores concentrações tenderam a apresentar medianas mais altas, embora sem diferença estatística.

Os controles apresentaram medianas de resultados semelhantes aos dos pacientes, resultando em p>0,05, em termos de %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ e MFI.

4.1.3 Diclofenaco

Na Figura 7, encontram-se os resultados e as medianas das curvas dose-resposta realizadas com diclofenaco de sódio injetável em oito pacientes e sete controles, em termos de %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Basal: controle negativo, MFI: média de intensidade de fluorescência, *:p<0,05, **:p<0,01.

A comparação entre as respostas às diferentes concentrações utilizadas revelou que, no grupo dos controles, a porcentagem de expressão (%CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺) mostrou diferença estatística na resposta às três maiores concentrações de diclofenaco (0,3; 0,6 e 1,25 mg/mL) em relação ao Basal. Nos pacientes não foi possível constatar diferença estatística apesar de observarmos uma tendência de aumento, assim como também não foi observada em termos de SI tanto em pacientes como controles. O MFI dos pacientes pouco alterou comparando as diferentes concentrações de diclofenaco com o Basal. Já no caso dos controles, as menores concentrações apresentaram a tendência de ter maiores MFIs, mas novamente, sem diferença estatística.

A comparação entre as respostas do grupo de pacientes e controles não apontou diferença estatística. Na busca pela otimização dos resultados, foi testado também o princípio ativo do diclofenaco de potássio em quatro pacientes e dois controles, entretanto, os controles continuaram respondendo tanto quanto os pacientes.

4.1.4 Dipirona

A Figura 8 mostra os resultados e as medianas do BAT com dipirona em diferentes concentrações, testadas em 17 pacientes e 12 controles, baseados em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Figura 8 - Curvas dose-resposta da dipirona de sódio injetável

No gráfico estão representados os resultados e as medianas dos 17 pacientes (coluna da esquerda) e 12 controles (coluna da direita), baseados em %CD45⁺IgE^{+(high)}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI). Não foram encontradas

diferenças estatísticas entre as condições com dipirona e Basal, pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn.

Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Basal: controle negativo, MFI: média de intensidade de fluorescência.

As curvas dose-resposta para dipirona injetável foram as que tiveram maior número de pacientes e controles. Todavia, as diversas concentrações de dipirona não apresentaram respostas diferentes das dos Basais. Isto ocorreu tanto no grupo dos pacientes quanto no grupo dos controles.

4.1.5 Paracetamol

Para as curvas dose-resposta de paracetamol, foram incluídos quatro pacientes com teste de provocação positivo, um paciente com história recente de reação e sete controles (Figura 9).

Figura 9 - Curvas dose-resposta do princípio ativo do paracetamol

No gráfico estão representados os resultados e as medianas dos cinco pacientes (coluna da esquerda) e sete controles (coluna da direita), baseados em %CD45⁺IgE⁺highCD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI). Não foram encontradas

diferenças estatísticas entre as condições com paracetamol e Basal, pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn.

Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Basal: controle negativo, MFI: média de intensidade de fluorescência.

As curvas dose-resposta com paracetamol não revelaram padrões de picos de respostas, ou tendências de quais concentrações poderiam ser usadas em testes posteriores. Confirmando isso, a análise estatística não mostrou diferença nas respostas das condições com paracetamol em relação ao Basal, nem entre pacientes e controles.

4.2 Perfil da casuística e Resultados do BAT – Etapa A

As histórias clínicas dos pacientes (baseados nos questionários ENDA adaptados preenchidos na rotina médica) bem como seus históricos de uso dos AINEs testados (ANEXO C) encontram-se na Tabela 6, juntamente com os resultados dos BATs, cujos dados brutos encontram-se no Anexo F. Os resultados dos controles encontram-se na Tabela 7 e os resultados brutos dos BATs, no Anexo G.

O grupo dos pacientes foi composto por 16 mulheres e quatro homens, revelando predomínio feminino.

De acordo com os dados da Tabela 6, 95,0% dos pacientes suspeitam de dois ou mais AINEs como causadores das reações de hipersensibilidade; destes, 55,0% relataram reação a ácido acetilsalicílico, diclofenaco e dipirona. Os pacientes PA1, PA12 e PA13 relataram reação a mais de um AINE, mas todos alegaram ter feito uso de ácido acetilsalicílico sem intercorrências.

Os sintomas mais relatados foram urticária com angioedema (50%), seguidos por somente angioedema (45,0%), um paciente apresentou somente urticária e outro, além dos sintomas cutâneos, relatou ter anafilaxia com paracetamol, mas apresentou BAT negativo para este AINE.

Nesta casuística, 70,0% dos pacientes realizaram TPO com paracetamol, sendo negativo em 71,4% dos casos. Analisando somente os pacientes que realizaram TPO, dos quatro resultados positivos, dois tiveram o BAT concordante.

Considerando todos os pacientes, o BAT teve uma taxa de concordância com a história clínica em 25,0% (5/20) dos casos. Se avaliarmos somente os pacientes que tiveram a última reação há menos de um ano da data da execução do BAT (n=12), este índice sobe para 33,3% dos casos.

Dentre todos os pacientes, quem teve a resposta ao BAT que melhor refletiu seu diagnóstico foi PA4. Seu BAT foi executado com paracetamol, um mês após ele ter realizado o teste de provocação. O BAT foi positivo com as menores concentrações utilizadas e ele teve reação na primeira dose testada (50 mg de paracetamol) na provocação. Tentamos verificar se o BAT reproduzia o mesmo desempenho, testando-o com o paciente PA20, que havia tido reação ao paracetamol (em dosagem menor do que a terapêutica) há um mês, mas seu BAT foi negativo.

A frequência dos controles que responderam ao BAT foi bem elevada: 9/13, sendo que oito deles responderam para mais de um AINE.

Tabela 6 - Diagnósticos dos pacientes baseados em histórias clínicas, respostas do questionário (Anexo C), testes de provocação e resultados dos BATs

	Intervalo UR-BAT	Urticária	AE	Outros sintomas	História clínica				Provocação PAR	BAT			
					AAS	DIC	DIP	PAR		AAS	DIC	DIP	PAR
PA1	< 1 ano	S	S		N	S	N	S	P-	/	+	/	/
PA2	< 1 ano	S	S		S	S	S	S	P-	/	+	-	/
PA3	< 1 ano	S	S		S	S	S	S	P-	+	/	+	/
PA4	1 mês	N	S	Olhos e mãos vermelhos	/	/	S	S	P+ 50 mg	/	/	-	+
PA5	> 1 ano	S	S		S	S	S	S	P-	/	+	-	/
PA6	> 1 ano	S	N		S	S	S	S		/	+	+	/
PA7	< 1 ano	S	S		S	S	S	S	P-	/	+	+	/
PA8	< 1 ano	S	S		S	/	S	S	P+ 500 mg	/	/	-	-
PA9	> 1 ano	N	S	Espirros, falta de ar	S	S	S	N		/	/	-	/
PA10	< 1 ano	N	S		S	/	S	S	P+ 500 mg	/	/	/	+
PA11	> 1 ano	S	S		S	/	/	N		-	/	/	/
PA12	< 1 ano	N	S		N	/	S	S	P-	/	/	-	/
PA13	> 1 ano	N	S		N	S	S	S	P-	/	/	-	/
PA14	> 1 ano	N	S		S	S	S	N		-	/	-	/
PA15	< 1 ano	S	S		S	N	S	S	P-	+	/	-	/
PA16	> 1 ano	N	S		/	/	S	S	P-	/	/	-	/
PA17	> 1 ano	N	S		S	S	S	S	P-	+	+	-	/
PA18	< 1 ano	N	S		S	S	S	N		+	+	-	/
PA19	< 1 ano	S	S	PAR: anafilaxia	S	S	S	S	P+ 500 mg	+	/	-	-
PA20	1 mês	S	S		S	S	S	S		+	+	+	-

Perfil dos pacientes, baseado no intervalo da última reação com AINEs e data da execução do BAT, presença de urticária e/ou angioedema e/ou outros sintomas, história clínica, realização de teste de provocação com paracetamol e resultados do BAT.

Legenda: AAS: ácidoacetilsalicílico, AE: angioedema, DIC: diclofenaco, DIP: dipirona, Intervalo UR-BAT: intervalo de tempo entre a última reação e a data de execução do BAT, PA: paciente – etapa A, P-: teste de provocação negativo, P+: teste de provocação positivo, seguido da dose que causou positividade, PAR: paracetamol, N: ausência do sintoma ou tolera o medicamento, S: apresenta o sintoma ou tem reações com o medicamento, +: BAT positivo, -: BAT negativo, <: menor, >: maior, /: nunca fez uso do medicamento ou condição não testada no BAT.

Tabela 7 - Resultados dos BATs dos controles

Controles saudáveis	BAT			
	AAS	DIC	DIP	PAR
CA1	/	+	+	/
CA2	/	+	+	/
CA3	+	/	-	+
CA4	/	/	-	-
CA5	/	+	-	/
CA6	/	+	+	/
CA7	-	/	-	/
CA8	/	/	-	/
CA9	+	+	+	+
CA10	+	+	-	+
CA11	+	+	-	-
CA12	+	/	-	+
CA13	/	/	/	-

Legenda: AAS: ácidoacetilsalicílico, CA: controle – etapa A, DIC: diclofenaco, DIP: dipirona, PAR: paracetamol, N: ausência do sintoma ou tolera o medicamento, S: apresenta o sintoma ou tem reações com o medicamento, +: BAT positivo, -: BAT negativo, /: condição não testada no BAT.

4.3 Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa A

Para avaliar a eficiência do Teste de Ativação de Basófilos, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do BAT para cada um dos AINEs, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do Teste de Ativação de Basófilos

AINE	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Ácido acetilsalicílico	75,0%	16,7%	54,5%	33,3%
Diclofenaco injetável	100,0%	0%	46,7%	0%
Diclofenaco princípio ativo	100,0%	0%	66,7%	0%
Dipirona	23,5%	66,7%	50,0%	38,1%
Paracetamol	40,0%	42,9%	33,3%	50,0%

Legenda: AINE: anti-inflamatório não esteroidal, VPN: valor preditivo negativo, VPP: valor preditivo positivo.

4.4 Padronização com ácido acetilsalicílico – Etapa B

4.4.1 Uso do tampão de estimulação com IL-3

Inicialmente, foi testada a influência do tampão de estimulação contendo IL-3 em três pacientes e dois controles. Considerando os critérios de positividade da etapa A ($SI > 2$ e $\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+} > 5\%$ nas condições com AINEs), verificou-se que a ausência do tampão de estimulação não afetou os resultados positivos dos pacientes, ao passo que melhorou a resposta do controle CB1, que deixou de ter BAT positivo. Baseado nestes dados, optamos por suspender a utilização de IL-3.

4.4.2 Curvas dose-resposta sem tampão de estimulação

A exclusão do tampão de estimulação exigiu nova padronização com AAS. Desta forma, foram realizadas curvas dose-resposta, variando a concentração da solução de ácido acetilsalicílico incubada com sangue total. Os resultados dos 14 pacientes e dos 12 controles encontram-se na Figura 10.

Figura 10 - Curva dose-resposta dos pacientes e dos controles

Resultados e medianas de 14 pacientes e 12 controles, baseada em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI). Tanto pacientes quanto controles apresentaram diferenças nas respostas dos BATs com AAS *versus* Etanol; somente os controles baseados em MFI não apresentaram diferenças, pelo teste de Friedman com comparações múltiplas de Dunn.

Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Etanol: controle negativo, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,005, ****: p<0,001.

Verificamos que tanto pacientes quanto controles apresentaram respostas com significância estatística para as diferentes concentrações de AAS, comparadas com etanol. Todavia, foram encontradas concentrações nas quais os pacientes responderam, mas os controles, não. No caso da %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ e do índice de estimulação, foram as concentrações de 2,00 e 1,25 mg/mL; já em termos de média de intensidade de fluorescência, 0,04 e 0,08 mg/mL, as menores concentrações. Cabe ressaltar que somente no caso do MFI, os controles não apresentaram respostas diferentes entre as condições com AAS e o Etanol.

4.4.3 Curvas tempo-resposta sem tampão de estimulação

Continuando a padronização do AAS sem o tampão de estimulação, foram realizadas curvas tempo-resposta, variando o tempo de incubação do sangue total por 20, 30 e 40 minutos, com as soluções de AAS, nas concentrações de 2,50 / 1,25 / 0,60 / 0,15 mg/mL. Não foi encontrada diferença estatística entre os diferentes tempos de incubação.

4.4.4 Ampliação do tamanho amostral

Baseado nos resultados anteriores, optamos por incubar as amostras por 40 minutos e as concentrações de AAS utilizadas foram: 2,50 / 1,25 / 0,60 / 0,15 mg/mL. Nesta etapa, participaram 33 pacientes e 26 controles, cujas medianas dos resultados são apresentados a seguir, em termos de %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Figura 11 - Resultados da ampliação do tamanho amostral do BAT

Resultados e medianas de 33 pacientes e 26 controles, baseados em %CD45⁺IgE⁺highCD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência

(MFI). Tanto pacientes quanto controles apresentaram diferenças nas respostas dos BATs com AAS *versus* Etanol, pelo teste de Friedman com comparações múltiplas de Dunn. Legenda: □: controle, ●: paciente, —: mediana, Etanol: controle negativo, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$, ****: $p < 0,001$.

A ampliação do tamanho amostral revelou que há diferenças nas respostas entre as condições com AAS em comparação com Etanol, tanto no grupo dos pacientes quanto no dos controles.

A $\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+}$ mostrou que os pacientes responderam a todas as condições com AAS, com $p < 0,005$, ao passo que os controles responderam às três maiores concentrações, com p um pouco maior do que dos pacientes, mas ainda significativo.

Em relação ao índice de estimulação (SI), novamente, os pacientes responderam diferentemente em todas as concentrações com AAS; já os controles, responderam para duas concentrações, com p maior do que os pacientes, mas com significância estatística.

A média de intensidade de fluorescência (MFI) foi o único parâmetro no qual os controles não responderam. Os pacientes responderam à concentração mais alta e a mais baixa, ambas com $p < 0,05$.

Observamos que a única concentração que foi estatisticamente diferente apenas nos pacientes foi 0,15mg/mL, e isto ocorreu em todos os parâmetros avaliados.

Quando comparamos as respostas dos pacientes em geral com os de reação de hipersensibilidade recente (menos de um ano), também encontramos diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0159$), em termos de MFI.

4.4.5 Definição do Critério de Positividade

Tendo ampliado o tamanho amostral, foi possível realizar as curvas ROC, para definir o melhor ponto de corte para a população de nosso estudo. Elas foram calculadas para as quatro concentrações de AAS, baseando-se em %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI) (Tabela 9), sendo escolhido como parâmetro o MFI, nas concentrações de 0,15 e 2,50 mg/mL, cujas representações gráficas das curvas encontram-se na Figura 12.

Tabela 9 - Valores de área abaixo da curva ROC

Concentração	%CD45 ⁺ IgE ^{high} CD63 ⁺	SI	MFI
0,15 mg/mL	0,5703	0,5907	0,5913
0,60 mg/mL	0,5192	0,5186	0,6084
1,25 mg/mL	0,5793	0,5956	0,6014
2,50 mg/mL	0,5886	0,6055	0,6247

As áreas abaixo das curvas foram calculadas para as quatro concentrações de AAS, em termos de % CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Legenda: MFI: média de intensidade de fluorescência, SI: índice de estimulação.

Figura 12 - Representações gráficas das curvas ROC

As curvas ROC nas concentrações de 0,15 mg/mL (esquerda) e 2,50 mg/mL (direita), baseadas em MFI, são uma forma de analisar cada ponto de corte (representado pelos pontos no gráfico), de acordo com os valores de sensibilidade e especificidade.

Para definir o melhor ponto de corte, optamos por minimizar o número de falso-negativos, por considerar que estes casos são mais prejudiciais aos

pacientes do que os resultados falso-positivos. Desta forma, priorizamos os pontos de corte com os maiores valores de sensibilidade, mas não o valor máximo, pois isso acarretaria o valor mínimo de especificidade.

A comparação das tabelas dos pontos de corte (Anexo E) entre as duas concentrações mostraram semelhantes valores de sensibilidade, mas especificidade superior com a concentração de 0,15 mg/mL, com o ponto de corte de 6575, ou seja, o BAT foi considerado positivo se o MFI fosse menor do que este valor.

4.5 Perfil da casuística e Resultados do BAT – Etapa B

Na Tabela 11 são apresentados os diagnósticos dos pacientes, baseados na história clínica constante nos questionários ENDA adaptados preenchidos na rotina médica e nas respostas do questionário do ANEXO C, bem como os resultados do BAT; os dados brutos encontram-se no Anexo H. Já na Tabela 12, estão os resultados dos BATs dos controles, cujos resultados brutos encontram-se no Anexo I.

No grupo dos 33 pacientes, verificou-se que 60,6% eram do sexo feminino.

No tocante aos sintomas apresentados, dois relataram apresentar somente urticária após exposição a AINEs, 11 desenvolveram angioedema e os restantes, apresentaram ambos os sintomas. O paciente PB11, além destes dois sintomas cutâneos, ainda tem doença respiratória exacerbada por aspirina.

Sobre os medicamentos suspeitos de terem causado as reações de hipersensibilidade, três relataram somente AAS, dois AAS e diclofenaco, dois AAS e dipirona e 26 pacientes suspeitam de três ou mais dos AINEs questionados (AAS, diclofenaco, dipirona, paracetamol).

Dentre os 33 pacientes participantes, 16 tiveram a última reação de hipersensibilidade com AINEs há menos de um ano da data de execução do BAT. Os resultados dos BATs mostram que 27 (84,4%) dos 32 pacientes tiveram BAT positivo na concentração de 0,15 mg/mL, sendo 15 cuja última reação de hipersensibilidade ocorreu há mais de um ano e 12 cuja reação ocorreu há menos de um ano. No que diz respeito aos controles, cerca de 65% responderam ao BAT.

Tabela 10 - Diagnósticos dos pacientes na etapa B, baseados em histórias clínicas e respostas do questionário do Anexo C

	Intervalo UR-BAT	Urticária	AE	Outros sintomas	AINEs suspeitos				MFI	BAT
					AAS	DIC	DIP	PAR		
PB1	<1 ano	S	S		S	S	S	N	2400	+
PB2	> 1 ano	N	S		S	S	S	S	2999	+
PB3	> 1 ano	S	S		S	S	S	N	2402	+
PB4	<1 ano	S	S		S	S	S	P+	6346	+
PB5	> 1 ano	S	S		S	/	/	N	5982	+
PB6	> 1 ano	S	S		S	S	S	N	3147	+
PB7	> 1 ano	N	S		S	S	S	S	5714	+
PB8	> 1 ano	N	S		S	S	S	N	11906	-
PB9	> 1 ano	N	S		S	S	S	S	6864	-
PB10	> 1 ano	S	S		S	S	S	N	3541	+
PB11	<1 ano	S	S	DREA	S	/	S	/	3851	+
PB12	> 1 ano	S	S		S	S	S	N	#	#
PB13	<1 ano	S	S		S	N	N	N	1872	+
PB14	<1 ano	S	S		S	S	S	S	5549	+
PB15	> 1 ano	S	S		S	S	/	N	1515	+
PB16	<1 ano	N	S		S	S	S	N	2587	+
PB17	> 1 ano	S	N		S	S	S	S	2672	+
PB18	<1 ano	N	S		S	S	S	S	1998	+
PB19	> 1 ano	S	S		S	S	S	/	11671	-
PB20	<1 ano	S	S		S	S	/	S	2325	+
PB21	<1 ano	S	S		S	S	S	N	2449	+
PB22	<1 ano	S	S		S	/	S	S	3251	+
PB23	<1 ano	N	S		S	/	/	N	2121	+
PB24	> 1 ano	S	S		S	S	S	/	4502	+
PB25	<1 ano	S	N		S	S	S	/	2155	+
PB26	<1 ano	S	S		S	S	S	S	9788	-
PB27	> 1 ano	S	S		S	/	S	/	11991	-
PB28	> 1 ano	N	S		S	S	/	/	4298	+
PB29	<1 ano	S	S		S	S	S	N	4870	+
PB30	> 1 ano	N	S		S	S	S	N	5731	+
PB31	> 1 ano	N	S		S	/	S	S	3376	+
PB32	<1 ano	S	S		S	/	S	P+	5704	+
PB33	<1 ano	N	S		S	S	S	S	4988	+

Perfil dos pacientes da etapa B, considerando intervalo entre a última reação com AINEs e a data de execução do BAT, sintomas, AINEs suspeitos, resultados do MFI na concentração de 0,15 mg/mL e resultados do BAT para esta concentração, com ponto de corte de MFI<6575.

Legenda: AE: angioedema, AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais, AAS: ácido acetilsalicílico, DIC: diclofenaco, DIP: dipirona, DREA: doença respiratória exacerbada por aspirina, Intervalo UR-BAT: intervalo entre a última reação com AINEs e a data de execução

do BAT, MFI: média de intensidade de fluorescência, N: não, PAR: paracetamol, PB: paciente etapa B, P+: paciente realizou teste de provocação com paracetamol e foi positivo, S: sim, /: não sabe ou nunca fez uso, <:menor, >:maior, +: resultado positivo, -: resultado negativo, #: baixo número de eventos para esta concentração.

Tabela 11 - Resultados dos BATs dos controles na etapa B

Controles saudáveis	MFI	BAT
CB1	17926	-
CB2	4606	+
CB3	5006	+
CB4	4368	+
CB5	2125	+
CB6	2231	+
CB7	2345	+
CB8	13423	-
CB9	3307	+
CB10	4724	-
CB11	3373	+
CB12	3708	+
CB13	6804	+
CB14	2136	+
CB15	10521	-
CB16	10996	-
CB17	506	+
CB18	31738	-
CB19	4020	+
CB20	4329	+
CB21	5471	+
CB22	5798	+
CB23	13438	-
CB24	1451	+
CB25	7244	-
CB26	11856	-

Resultados dos MFIs dos controles na etapa B, na concentração de 0,15 mg/mL, bem como seus resultados dos BATs, baseado em ponto de corte de MFI<6575.

Legenda: MFI: média de intensidade de fluorescência, +: resultado positivo, -: resultado negativo.

4.5.1 Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa B

A Tabela 12 mostra os valores comparativos de Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo para o BAT com ácido acetilsalicílico na etapa A e na etapa B. Na etapa A, os critérios de positividade basearam-se na %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺>5 e no SI>2 (40); se o BAT fosse positivo para uma das quatro concentrações, consideramos que o indivíduo respondeu ao teste. Já a etapa B baseou-se no MFI (<6575) na concentração de 0,15 mg/mL, a partir das curvas ROCs calculadas com nossos resultados. Também foi verificado como seria o desempenho do BAT na etapa B, baseado nos critérios de positividade da etapa A.

Tabela 12 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do Teste de Ativação de Basófilos somente com AAS

AINE	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
AAS – Etapa A (% e SI)	75,0%	16,7%	54,5%	33,3%
AAS – Etapa A (MFI)	55,6%	20,0%	55,6%	20,0%
AAS – Etapa B (% e SI)	48,5%	73,0%	69,6%	52,8%
AAS – Etapa B (MFI)	84,4%	34,6%	61,4%	64,3%
AAS – Etapa B (MFI, UR<1 ano)	93,7%	34,6%	46,9%	90,0%

Comparação de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de acordo com os dois critérios de positividade: da literatura e o nosso. O melhor valor de sensibilidade foi com nosso critério de positividade, ao passo que a melhor especificidade foi com os critérios de positividade da literatura. Legenda: AAS: ácido acetilsalicílico, MFI: critério de positividade baseado em média de intensidade de fluorescência, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, % e SI: critério de positividade baseado em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ e índice de estimulação.

A comparação mostrou que o melhor valor de sensibilidade foi o baseado em nosso critério positividade (MFI), ao passo que a melhor especificidade foi obtida com os critérios de positividade da literatura (% e SI). Em ambos os casos, foram resultados da etapa B, na ausência de tampão de estimulação com IL-3.

5 DISCUSSÃO

A prevalência das reações adversas a medicamentos em geral está aumentando, e a hipersensibilidade a AINEs é uma das causas mais comuns. Por outro lado, o seu diagnóstico é dificultado por diversos motivos, como (a) o tipo de mecanismo imunológico envolvido no seu desencadeamento, determinando a necessidade de diferentes testes para sua comprovação, (b) drogas podem ser haptenos que podem se acoplar a diferentes proteínas, fazendo com que o epítipo exato seja desconhecido, (c) os resultados dos testes *in vivo* ou *in vitro* com concentrações diferentes da droga podem não se correlacionar com as situações da rotina clínica, (d) as outras medicações utilizadas pelos pacientes, assim como a existência de comorbidades, podem interferir com a reação à droga ou com a manifestação clínica. O padrão ouro para o diagnóstico das hipersensibilidades a AINEs é o TPO, que é demorado e potencialmente arriscado (59).

Neste contexto, tem-se procurado novas opções para o diagnóstico, e uma das possibilidades é o teste de ativação de basófilos (59). O BAT foi validado no diagnóstico de hipersensibilidades IgE-mediadas como para bloqueadores neuromusculares, antibióticos betalactâmicos, expansores plasmáticos a base de gelatina entre outros. Pode complementar os testes cutâneos na procura de medicamentos com potencial para reações cruzadas, delineando uma alternativa terapêutica ou diagnóstica segura, ou mesmo, ser o método diagnóstico de escolha como é o caso das hipersensibilidades a heparina de baixo peso molecular, hialuronidase, vacina de hepatite B (59).

O mecanismo clássico do BAT é a ligação cruzada entre duas IgEs específicas adjacentes ancoradas na membrana dos basófilos. Entretanto, outros mecanismos de ativação celular podem estar envolvidos como ativação pelo sistema complemento ou mecanismo não imunológico, farmacológico.

O diagnóstico da hipersensibilidade a AINEs tem se baseado na história clínica e, em alguns casos, TPO. A literatura mostra que o BAT com

AINEs tem sido bastante estudado, mas as conclusões são contraditórias. Na busca pelo aprimoramento da técnica, diversas metodologias foram avaliadas.

De maneira geral, a tendência dos artigos mais recentes é separar os leucócitos (ao invés de usar sangue total) e utilizar kits comerciais (Tabela 4).

Contudo, mantivemos nossa metodologia como nos artigos iniciais (55) – sangue total e metodologia “in house” – pelos seguintes motivos:

1. Sangue total simula melhor as condições *in vivo*, além de tornar o teste mais prático (45);

2. A metodologia “in house” tem um custo mais acessível e já havia sido padronizada por Pedreschi (2009) (49) em nosso laboratório, com os seguintes AINEs: ácido acetilsalicílico, diclofenaco e dipirona injetáveis;

3. Testamos um kit comercial (BasoFlowEx®, da empresa ExBio) e os resultados foram semelhantes.

Em relação aos procedimentos descritos em sua monografia, modificamos a maneira de solubilizar os AINEs, passamos a utilizar fMLP como controle positivo e modificamos as estratégias de análise dos resultados do citômetro de fluxo. Desta forma, tivemos que retomar a etapa de padronização do BAT com AINEs, acrescentando o paracetamol, inicialmente padronizado por Misumi (2009) (51).

Outro ponto a ser mencionado foi o preparo das soluções de AINEs usadas no BAT. Nenhum trabalho descreveu minuciosamente a diluição dos medicamentos, causando a impressão de que era somente adicionar o AINE a água deionizada. Mas deparamo-nos com uma série de peculiaridades para cada medicamento, o que influenciou as curvas dose-resposta na Etapa A: quanto mais tempo demoramos para descobrir como diluir determinado AINE, menor número de pacientes e de controles puderam compor as curvas dose-resposta para este medicamento. Em outras

palavras, a etapa de preparo das soluções contendo AINEs foi concomitante à realização das curvas dose-resposta. Esta é uma das justificativas para o fato de que nem todos os pacientes da etapa A foram testados para todos os AINEs que relataram serem suspeitos de causarem as reações de hipersensibilidade.

A outra justificativa relaciona-se com a logística para inclusão dos participantes do estudo. Inicialmente, pensou-se em fazer um levantamento de todos os pacientes com história compatível com hipersensibilidade a AINEs atendidos no Ambulatório de Reações Adversas a Medicamentos. Aqueles que preenchessem os critérios de inclusão seriam convidados a participar, via telefone e caso aceitassem, deveriam agendar uma data para ir ao HC-FMUSP para coleta de sangue, preenchimento do questionário do anexo C e assinatura do TCLE. Como era somente um estudo, encontrou-se dificuldade para convencer os pacientes a irem ao HC-FMUSP, pois muitos trabalham e/ou moram longe do complexo. Assim, tivemos que aproveitar a ocasião em que tivessem consultas ou exames agendados no ambulatório para abordar os pacientes. O horário do ambulatório de RAM, a necessidade de utilizar soluções preparadas minutos antes da execução do BAT e a necessidade de realização do exame até quatro horas após a coleta do sangue limitaram o número de pacientes e controles que podiam ser testados em um único dia; bem como os AINEs que poderiam ser testados para cada paciente de acordo com a história clínica, pois para cada AINE, eram testados de 7 a 8 concentrações.

5.1 Etapa A

5.1.1 Ácido acetilsalicílico

De início, verificamos que os artigos publicados com BAT e AAS utilizaram aspirina lisina (40, 41), que não é comercializada no Brasil. Baseado no trabalho de Maia (52), passamos a utilizar o etanol como

solvente para o comprimido de ácido acetilsalicílico, por considerarmos que, dentre os solventes utilizados naquele trabalho, seria o menos prejudicial às células. Mesmo assim, tornou-se necessário verificar sua influência, em especial, nos basófilos.

Na ausência de literatura a respeito, fizemos uma solução contendo somente PBS e etanol – na proporção equivalente a maior concentração de AAS – e aplicamos no BAT. Observamos a possibilidade de indução de hemólise no BAT e/ ou alteração no padrão dos gráficos analisados no software FlowJo®. Felizmente, nenhuma dessas interferências foi constatada.

Não houve diferença estatisticamente significativa comparando as condições somente com PBS e as com PBS e etanol. Contudo, optamos por manter a condição Etanol (PBS + etanol) no BAT com AAS, pois ela melhor representaria o controle negativo. O índice de estimulação para AAS foi calculado baseado nesta condição.

As curvas dose-resposta dos pacientes e dos controles apresentaram maiores valores de porcentagem de células ativadas e de SI conforme aumentava a concentração do AAS; mas as respostas decaíram na maior concentração, de 5,00 mg/mL, possivelmente indicando que a concentração estava tóxica para os basófilos. No caso do MFI, as maiores respostas foram encontradas nas menores concentrações. A única concentração que apresentou diferença estatística em relação ao Etanol foi a de 2,50 mg/mL e apenas em termos de SI, no grupo dos pacientes, mas de acordo com a literatura, esta concentração nunca havia sido testada.

A partir de curvas dose-resposta do princípio ativo de lisina aspirina, Gamboa *et al.* (2004) (40) usaram as concentrações de 1,25 e 0,3 mg/mL; ao passo que Rodríguez-Trabado *et al.* (2008), as concentrações de 100 ng/mL e 1 µg/mL, muito menores do que as de outros artigos. Já o estudo multicêntrico europeu (10) usou ácido acetilsalicílico da Bühlmann Laboratories (Suíça) (indicado para kit comercial do BAT) nas concentrações

de 2,0 e 0,4 mg/mL. As concentrações de Gamboa *et al.* (2004) (40) e as do estudo multicêntrico (10) foram testadas em nosso estudo, mas não indicaram diferenças nas respostas em relação ao controle negativo (contendo somente etanol).

5.1.2 Diclofenaco

No BAT com diclofenaco, Rodríguez-Trabado *et al.*, (2008) (41) e Gamboa *et al.*, (2004) (40) usaram diclofenaco injetável (Novartis). No Brasil, como a apresentação injetável está disponível, decidimos iniciar os testes diluindo o diclofenaco em PBS.

Novamente, a partir de curvas dose-resposta, Gamboa *et al.* (2004) (40) usaram diclofenaco injetável, nas concentrações de 0,3 e 0,08 mg/mL, enquanto Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) usaram as concentrações de 100 ng/mL e 1 µg/mL. Outro trabalho que usou baixíssimas concentrações de diclofenaco foi o de Malbrán *et al.* (2006) (56): 1 e 10 µg/mL, tendo observado que o diclofenaco induziu desgranulação basófila, mas não aumentou a expressão de CD63; de Weck *et al.* (2008) (38) contestaram este achado, alegando que a concentração usada foi baixa demais, podendo ser a causa não terem encontrado aumento da expressão de CD63. O estudo multicêntrico (2009) (10) usou o diclofenaco reconstituído (Bühlmann Laboratories, Suíça) (60) indicado para uso no kit comercial do BAT da mesma empresa, nas concentrações de 0,5 e 0,1 mg/mL. Pelos nossos resultados, a concentração de 0,30 mg/mL foi a que apresentou resposta diferente em relação ao basal no grupo dos controles, em termos de %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺. Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) usaram o mesmo medicamento que Gamboa *et al.* (2004) (40), nas concentrações de 100 ng/mL e 1 µg/mL.

Dentre as concentrações que apresentaram diferenças estatísticas nos nossos resultados, somente a concentração de 0,3 mg/mL estava entre as

utilizadas em trabalhos da literatura. Por outro lado, essa foi a concentração a qual somente o grupo dos controles respondeu.

Ter encontrado diferença na resposta dos controles ao invés dos pacientes foi inesperado e reforça os achados controversos sobre o uso do BAT em AINEs. Buscando melhores resultados, foi testado somente o princípio ativo do diclofenaco, mas ele mostrou-se ineficaz, na medida em que os controles continuaram apresentando BAT positivo (SI>2 e %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺>5% no tubos com diclofenaco).

5.1.3 Dipirona

Em nosso trabalho, usamos dipirona líquida injetável, assim como Rodríguez-Trabado *et al.*(2008) (41) e Gamboa *et al.* (2004) (40). Devido à instabilidade da dipirona diluída, as diluições em PBS foram realizadas sempre no dia em que o BAT foi realizado, sempre com novas ampolas de dipirona. Dentre todos os AINEs, este foi o que teve maior número de pacientes e de controles testados nas curvas e ainda assim, não apresentou diferenças nas respostas com dipirona *versus* Basal. Baseando-se nos critérios de positividade, cerca de 23,5% dos pacientes e 33,3% dos controles responderam ao BAT com dipirona.

O estudo multicêntrico (2009) (10) utilizou as concentrações de 1,2 e 0,25 mg/mL de dipirona (Bühlmann Laboratories, Suíça) reconstituída em tampão de estimulação, indicada para BAT comercial. Nós testamos a concentração de 1,2 mg/mL com dipirona injetável, entretanto, não houve diferença entre estimulado e basal.

Conforme já mencionado anteriormente, Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) usaram baixíssimas concentrações, sendo que sete dos 12 (58%) pacientes testados tiveram BAT positivo e nenhum controle respondeu.

Gamboa *et al.* (2004) (40) utilizaram a solução injetável de dipirona nas concentrações de 5,0 e 1,0 mg/mL, definidas por curvas dose-resposta. Estes autores obtiveram 15% de sensibilidade e 100% de especificidade. A concentração de 5,0 mg/mL foi testada em nosso BAT, mas ao contrário do relatado por Gamboa, ela apresentou mediana semelhante ao basal. Em trabalho mais antigo, Gamboa *et al.* (2003) (61) testaram somente pacientes com hipersensibilidade seletiva a dipirona, usando as mesmas concentrações e encontraram que 42% pacientes responderam ao BAT e nenhum controle teve resultado positivo; encontrando, portanto, melhor valor de sensibilidade em pacientes com hipersensibilidade seletiva.

Um trabalho mais recente sobre BAT e pacientes com hipersensibilidade seletiva a dipirona, de Gómez *et al.* (2009) (24), utilizou as concentrações de 2,50 e 0,25 mg/mL de metamizol; sendo que a primeira foi testada em nosso estudo, mas sem sucesso.

Uma possibilidade para otimizar os resultados seria testar em pacientes com hipersensibilidade seletiva a dipirona (24, 61). Contudo, até o momento, não havia registro de paciente com esse perfil no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia.

5.1.4 Paracetamol

Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) e Gamboa *et al.* (2004) (40) utilizaram proparacetamol ao avaliar BAT com AINEs. No Brasil, esta substância não é encontrada. Como a solução de paracetamol em água não é estável, nossa própria solução foi preparada no dia do ensaio, baseando-se na Farmacopeia da ANVISA (62).

Segundo estudo observacional retrospectivo realizado no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia (63), somente 8,1% dos pacientes que relataram ter reação ao paracetamol apresentaram positividade no teste de

provocação. Ademais, tendo em vista que até 80% dos pacientes com hipersensibilidade a AINEs podem tolerar paracetamol (64), decidimos somente incluir pacientes com teste de provocação positivo para paracetamol, no caso, foram quatro. O paciente PA20 havia tido reação com um xarope de paracetamol (Notuss®, Aché), usando menos do que a dose recomendada para tratamento, quinze dias antes de nos contactar. Ele também havia referido outros episódios de reações com paracetamol em comprimido. Diante da história fortemente sugestiva, este paciente foi incluído para as curvas dose-resposta, entretanto, seu BAT foi negativo.

Assim como na maioria dos AINEs testados, as curvas dose-resposta não revelaram diferenças nas respostas com as diversas concentrações avaliadas.

Gamboa *et al.* (2004) (40) utilizaram cloridrato de proparacetamol nas concentrações finais de 1,25 e 0,3 mg/mL, definidas por curvas dose-resposta. Apesar de não ser o mesmo estímulo, testamos ambas as concentrações, sem resultados distintos do basal.

De Weck *et al.* (2009) (10) usaram paracetamol nas concentrações de 0,025 e 0,005 mg/mL. Estas concentrações estão bem abaixo das que testamos. Como o estímulo usado por eles é recomendado especialmente para o kit comercial do BAT daquela empresa, talvez por isso eles tenham conseguido utilizar baixíssimas concentrações.

Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) utilizaram as concentrações de 100 ng/mL e 1 µg/mL de princípio ativo de proparacetamol. Porém, no citado estudo, somente foi testado um paciente e ele teve BAT negativo; nenhum controle foi testado para o medicamento.

5.1.5 Curvas dose-resposta

Avaliamos todos os resultados das curvas dose-resposta em termos de %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI), buscando identificar qual(is) parâmetro(s) seria(m) o(s) mais adequado(s).

Apesar de se verificarem algumas tendências nas curvas dose-resposta, de maneira geral, elas não mostraram diferenças nas condições com AINEs em relação aos controles negativos. Os dois casos encontrados foram com AAS baseado em MFI no grupo dos pacientes e diclofenaco em termos de %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, com o grupo dos controles.

Uma possível explicação seria o fato de que nem todas as concentrações foram testadas para todos os pacientes e controles, por questões de otimização dos experimentos: somente os primeiros participantes foram testados para todas as concentrações iniciais e, de acordo com o desempenho, algumas concentrações foram excluídas e outras foram incluídas. Com isso, os testes estatísticos poderiam ter ficado prejudicados.

5.1.6 Perfil da Casuística e Resultados do BAT – Etapa A

Nossa casuística de pacientes foi composta predominantemente por mulheres (80,0%), 19 dos 20 pacientes relataram reações a múltiplos AINEs e os sintomas cutâneos foram os mais prevalentes, principalmente angioedema e urticária. Perfil semelhante foi encontrado pelo estudo observacional retrospectivo de Magalhães *et al* (2012) (65), com pacientes atendidos em 2011, no mesmo Serviço de Imunologia Clínica e Alergia que os nossos pacientes. Melo *et al*. (2012) (66) também obtiveram resultados semelhantes em estudo retrospectivo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto – USP.

Todos os pacientes e controles testados para diclofenaco injetável tiveram BAT positivo. Segundo a ANVISA (67), o diclofenaco de sódio injetável é composto por manitol, metabissulfito de sódio, álcool benzílico, propilenoglicol, hidróxido de sódio e água para injeção. Pelo menos um desses componentes poderia ter influenciado na resposta do BAT, causando estímulos inespecíficos. Por outro lado, ao testar somente o princípio ativo, os controles continuaram respondendo, gerando a dúvida se a positividade do BAT não estaria relacionada ao AINE. Gamboa *et al.* (2004) (40) verificaram que apenas dois, dentre 30 controles responderam ao BAT com diclofenaco. A proporção foi bem menor do que a encontrada em nosso trabalho. Esse mesmo trabalho relata que vários participantes (pacientes e controles) responderam ao naproxeno nas concentrações mais elevadas do que as usadas no artigo e Carrapatoso *et al.* (2005) (68) atribuíram este fato à potência de inibição da COX-1 que este medicamento apresenta. Segundo Faria (2008) (69), o diclofenaco se enquadra na mesma categoria que o naproxeno, em termos de inibição da enzima cicloxigenase 1. Isso pode ser um fator que estaria levando tantos controles a responderem ao BAT.

Em situação oposta, a frequência de pacientes que responderam a dipirona é muito baixa, o que comprometeu a construção das curvas dose-resposta. Infelizmente, dificilmente são realizados TPO com dipirona. Considerando os resultados do BAT com dipirona, tem-se dúvida se o problema da baixa resposta está na história dos pacientes, ou no estímulo ou no mecanismo que desencadeia a hipersensibilidade. Todos os pacientes testados para dipirona relataram ter reações a pelo menos mais um AINE, indicando serem histórias fortemente sugestivas de hipersensibilidade. No entanto, baseados na experiência dos atendimentos aos pacientes, suspeita-se que a reação a dipirona seja dose dependente, assim como o paracetamol (70), mas ainda não há dados da literatura para comprovar esta hipótese. Uma possível evidência disso é a paciente PA5, que relatou ter reações ao comprimido de dipirona, mas tolera a apresentação em gotas, que provavelmente deve usar dose menor; ela teve BAT negativo.

O único AINE com o qual alguns pacientes foram submetidos ao teste de provocação foi o paracetamol. Pela história clínica, 16 indivíduos suspeitaram ter reação após exposição a este AINE. Dos 14 que realizaram teste de provocação, 10 tiveram resultado negativo, o que está bem próximo do encontrado por Borges *et al.* (2001) (64). Dentre os quatro pacientes com teste de provocação positivo, dois casos tiveram BAT positivo, ou seja, 50% de concordância com o padrão ouro. O quinto paciente testado para paracetamol não fez teste de provocação no Serviço, já que tinha história recente e muito sugestiva; neste caso, o BAT foi realizado um mês após sua última reação, com paracetamol, mas foi negativo.

A melhora na sensibilidade em pacientes com reação recente (menos de um ano) também foi vista por Ebo *et al.* (2006) (37), que recomendam que se faça o BAT no intervalo de tempo de seis semanas a 12 meses após o evento agudo de reação. No caso específico do paracetamol, conseguimos realizar o BAT um mês após a última reação aguda em dois pacientes: PA4 e PA20. O BAT da primeira refletiu o teste de provocação (respostas positivas nas menores concentrações), já PA20, teve BAT negativo, apesar da história de reação com xarope de paracetamol usado em casa. Gamboa *et al.* (2004) (40) encontraram que 76,9% dos pacientes que tiveram o BAT testado um mês após o teste de provocação positivo, tiveram resultados positivos para o ensaio *in vitro*. Por outro lado, Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) não encontraram associação entre o resultado do BAT e o intervalo de tempo em relação ao último evento agudo de hipersensibilidade. Em nosso trabalho, isto pode ser observado na paciente PA6, que teve a última reação em 1991, mas, dentre os dois AINEs testados no BAT, o teste esteve de acordo com a história clínica em ambos.

O elevado índice de resposta dos controles afeta mais negativamente nosso BAT com AINEs do que a baixa resposta dos pacientes para alguns medicamentos. Isso porque mostra que, de maneira geral, as respostas do BAT têm sido inespecíficas. No estudo multicêntrico de Weck *et al.* (2009) (10), menos de 8% dos controles responderam ao BAT com AINEs, mesmo

assim, esta porcentagem foi considerada elevada por Ebo *et al.* (2011) (71), que duvidaram da credibilidade dos resultados.

5.1.7 Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa A

De maneira geral, comparando com as sensibilidades encontradas em outros trabalhos (Tabela 13), verificamos que nosso trabalho obteve melhores resultados; somente dipirona ficou baixa, como também foi visto por Gamboa *et al.* (2004) (40). Contudo, cabe esclarecer que os pacientes estudados por Gómez *et al.* (2009) (24) apresentam hipersensibilidade seletiva a dipirona, respondendo, portanto, melhor ao BAT do que nossos pacientes com hipersensibilidade a múltiplos AINEs (71).

Já os valores de especificidade estão bem abaixo do que a literatura relata (Tabela 13), isso ocorreu porque muitos controles responderam às diferentes concentrações de AINEs testadas nas curvas doses-respostas.

Tabela 13 - Compilação dos valores de sensibilidade e especificidade do BAT para AINEs relatados na literatura

Sensibilidade (%)	AAS	Diclofenaco injetável	Dipirona	Paracetamol
Nossos resultados	75,0	100,0	23,5	40,0
Gamboa <i>et al.</i> , 2004 (40)	43,3	43,3	15,0	11,7
De Weck <i>et al.</i> , 2009 (10)	28,2	38,0	-	9,9
Sanz <i>et al.</i> , 2009 (45)	41,0	43,0	-	10
Gómez <i>et al.</i> , 2009 (24)	-	-	42,3	-
Korosec <i>et al.</i> , 2011 (42)	79,0	-	-	-
Rodríguez-Trabado <i>et al.</i> , 2008 (41)	45,45	50	58,33	-

Especificidade (%)	AAS	Diclofenaco injetável	Dipirona	Paracetamol
Nossos resultados	16,7	0,0	66,7	42,9
Gamboa <i>et al.</i> , 2004 (72)	100,0	93,3	100,0	100,0
De Weck <i>et al.</i> , 2009 (10)	88,0	85,0	-	93,0
Sanz <i>et al.</i> , 2009 (45)	93,5	86,0	-	96,0
Gómez <i>et al.</i> , 2009 (24)	-	-	100,0	-
Korosec <i>et al.</i> , 2011 (42)	70,0	-	-	-
Rodríguez-Trabado <i>et al.</i> , 2008 (41)	100,0	100,0	100,0	-

A literatura revela que encontramos excelentes valores de especificidade, mas baixos de sensibilidade, o oposto do que foi encontrado em nossos resultados, excetuando dipirona. Legenda: AAS: ácido acetilsalicílico, -: AINE não testado.

Por conta dos baixos valores de especificidade dos quatro AINEs e da baixa sensibilidade da dipirona em nossos resultados, optamos por focar os experimentos em um só AINE, realizando novas curvas dose-resposta e tempo-resposta.

Selecionamos o ácido acetilsalicílico, por ter sido o único AINE que apresentou diferença estatística no grupo dos pacientes, bem como excelente valor de sensibilidade e valor de especificidade maior do que zero. Ademais, este AINE é bastante versátil: além de suas funções anti-inflamatória, analgésica e antitérmica, é um medicamento receitado em diversas especialidades médicas, sendo usado para inibição de agregação

plaquetária, prevenção de câncer de cólon e retardamento do Alzheimer, entre outros (73).

5.1.8 Etapa B

Tendo em vista o elevado número de controles que responderam ao BAT, questionou-se o uso do tampão de estimulação com IL-3. Nossos resultados revelaram que a ausência do tampão não afetou os resultados positivos dos pacientes, ao passo que um dos controles deixou de ter BAT positivo.

O uso da IL-3 aumenta a sensibilidade dos ensaios com basófilos (50), potencializando a liberação de histamina, sem, no entanto, aumentar a expressão de CD63 na superfície destes leucócitos (74). Segundo Yamaguchi *et al.* (2009) (75), a IL-3 tem a capacidade de potencializar a desgranulação dos basófilos na maioria dos indivíduos atópicos e não atópicos. Dessa maneira, a IL-3 seria bastante útil nos casos onde ocorre pouca estimulação específica, como ocorre geralmente com medicamentos (37, 76). Todavia, Ebo *et al.* (2004) (74) mantém a ressalva de que esta interleucina pode causar ativação inespecífica de basófilos, levando a resultados falsos-positivos, fato observado na etapa A do nosso trabalho.

Em relação à literatura, ainda não há consenso sobre seu uso no BAT com AINEs. Sanz *et al.* (2003) (77), Gamboa *et al.* (2004) (40), de Weck *et al.* (2009) (10), de Weck *et al.* (2010) (78), Korosec *et al.* (2011) (42) utilizaram IL-3 no BAT com AINEs. Por outro lado, alguns artigos mais recentes não têm utilizado tampão de estimulação com IL-3 (39) (30). Na realidade, parece haver uma tendência a não se usar mais IL-3 nos BATs com medicamentos (Mayorga, C, comunicação pessoal).

Assim, como a ausência do tampão de estimulação resultou em BAT negativo de um controle que era positivo na presença do tampão, e não

comprometeu os BATs positivos dos pacientes, optamos por excluir esta etapa de pré-incubação do sangue total com o mencionado tampão. Outra vantagem desta alteração na metodologia foi a otimização no tempo de execução do BAT. Porém, a exclusão desta etapa tornou necessária a realização de novas curvas dose-resposta e tempo-resposta.

Nas curvas dose-resposta, foram observadas diferenças nas concentrações com AAS em relação ao etanol. Comparando as respostas de pacientes e controles, viu-se que, no caso da %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ e do índice de estimulação (SI), as concentrações de 2,00 e 1,25 mg/mL tiveram diferença estatística para pacientes e não para controles; foram concentrações já usadas em literatura (Gamboa *et al.* 2004, Wismol *et al.* e o estudo multicêntrico). Em relação à média de intensidade de fluorescência (MFI), foram as menores concentrações que mostraram diferença.

É sabido que a capacidade de resposta dos basófilos pode variar de indivíduo para indivíduo, portanto, recomenda-se o uso de mais de uma concentração para o BAT (37, 38, 50). Como as concentrações testadas não mostraram diferenças estatísticas nos três parâmetros, escolhemos as que melhor representassem a variedade das concentrações testadas: 2,50 / 1,25 / 0,60 / 0,15 mg/mL.

A comparação com a literatura deve ser feita cuidadosamente, na medida em que a maioria dos trabalhos publicados utilizou lisina aspirina ao invés de aspirina, usada em nosso trabalho. Sanz *et al.* (2005) (46) e Çelik *et al.* (2009) (48) utilizaram as concentrações finais de 5,00 / 1,25 / 0,30 mg/mL de lisina aspirina. Korosec *et al.* (2011) (42) não forneceu maiores detalhes sobre o ácido acetilsalicílico utilizado, mas usou as concentrações de 1,00 e 0,25 mg/mL. Wismol *et al.* (2011) (39) testou as concentrações de 5,00 / 1,25 / 0,30 mg/mL de lisina aspirina, tendo excluído a maior, por não encontrar diferença estatística na resposta de pacientes e controles. Dentre todos os trabalhos publicados, Abuaf *et al.* (2012) (30) utilizou uma das menores concentrações de lisina aspirina: 0,01 mg/mL, testando, também, as concentrações de 0,10 e 1,00 mg/mL. O único trabalho que não usou

AAS na forma de medicamento foi o de De Weck *et al.* (2009) (10), que utilizaram as concentrações finais de 2,00 e 0,40 mg/mL de solução reconstituída de ácido acetilsalicílico indicada para BAT comercial.

Outro ponto importante a ser mencionado é que as concentrações adequadas também variaram de acordo com o protocolo do BAT adotado (37).

Com nossos resultados, verificamos que, diferentemente do encontrado em literatura (42, 78), a ativação de basófilos por AINEs parece não ser estritamente dose-dependente. Certamente, é importante ressaltar que há concentrações que causam ativação inespecífica, como foi verificado por Korosec *et al.* (2011) (42).

A exclusão do tampão de estimulação com IL-3 no BAT também tornou necessária a realização de curvas tempo-resposta. Como não foi encontrada diferença estatística nos tempos de incubação, optou-se por manter o tempo de incubação em 40 minutos, como o encontrado em outros artigos (10, 39, 46, 77).

Na literatura, o tempo de incubação dos basófilos com as soluções de AAS também ainda não é consenso. Korosec *et al.* (2011) (42) avaliou os tempos de 15, 30 e 60 minutos e, não tendo encontrado diferenças nas respostas entre eles, optou pelo tempo de 15 minutos de incubação, o mesmo que Malbrán *et al.* (2006) (56).

5.1.9 Ampliação do tamanho amostral

A ampliação do tamanho amostral foi a etapa com maior número de participantes: 33 pacientes e 26 controles, permitindo melhor avaliação do desempenho do BAT.

Tanto pacientes quanto controles apresentaram diferenças estatísticas nas condições com AAS comparadas com Etanol. No entanto, observou-se que os pacientes apresentaram melhores respostas do que os controles, considerando a quantidade de concentrações que diferiram do Etanol e o grau de significância, baseado no p-valor. Com o parâmetro MFI, os controles não apresentaram diferença estatística para nenhuma concentração.

Gamboa *et al.* (2004) e Sanz *et al.* (2005) convocaram 60 pacientes e 30 controles. Abuaf *et al.* testaram o BAT no mesmo número de pacientes, mas 20 controles. No trabalho de Rodríguez-Trabado *et al.*, participaram 43 pacientes e 29 controles, no de Wismol *et al.*, 30 pacientes e 15 controles. O trabalho com maior tamanho amostral foi do estudo multicêntrico: 152 pacientes e 136 controles, em 11 centros de pesquisa da Europa. Nosso estudo teve um tamanho amostral de controles semelhante à maioria dos trabalhos da literatura, mas mesmo tendo um tamanho amostral menor de pacientes, conseguimos encontrar diferenças nas respostas de pacientes em relação aos controles.

5.1.10 Definição do Critério de Positividade

A construção de curvas ROC gera um conjunto de dados, dentre eles, a área abaixo da curva. Sabe-se que, quanto maior a área abaixo da curva para um teste, maior é a capacidade discriminativa entre pacientes e controles (79), ou seja, melhor é o teste. Contudo, os resultados das áreas mostraram-se bastante semelhantes. Para efeitos de definição de um critério de positividade, foi escolhido o maior valor de área, obtido na concentração de 2,50 mg/mL com o parâmetro MFI. Também com MFI, foi selecionada a concentração de 0,15 mg/mL, por ter mostrado diferença estatística em relação ao Etanol em todos os parâmetros na ampliação do tamanho amostral; além de ser uma concentração na qual os controles não

responderam diferentemente do Etanol. Apesar da concentração 2,50 mg/mL apresentar maior valor de área de curva, portanto, parecer ter melhor capacidade discriminativa, com a concentração de 0,15 mg/mL foi encontrado valor de sensibilidade um pouco mais baixo, mas especificidade superior, por isso, esta foi a escolhida.

A definição do melhor ponto de corte com a menor concentração testada está de acordo com o relatado no estudo europeu multicêntrico (77), no qual pacientes responderiam às menores concentrações de AINEs ao passo que os controles, às maiores.

Contudo, convém esclarecer que, como optamos por uma sensibilidade bastante elevada em detrimento da especificidade, o nosso BAT não é adequado para a população em geral. Ele poderia ser uma alternativa somente em pacientes com história fortemente sugestiva de hipersensibilidade ao AAS. Esta observação já é uma indicação constante nos trabalhos publicados, indicando que o BAT só deve ser executado como teste complementar, nos casos em que há discordância entre a história clínica e os resultados dos testes aplicados ou elevado risco no teste de provocação (38, 50).

Dentre os três parâmetros utilizados para verificar ativação de basófilos, o uso de somente MFI nunca foi relatado em literatura. Um recente artigo de Chirumbolo (2012)(80), sugere o uso de CD63 index, cuja fórmula é a seguinte: $CD63 \text{ index} = MFI \times \%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+} / 100$. Contudo nossos resultados foram mais consistentes com o uso somente de MFI.

A média de intensidade de fluorescência (MFI) avalia a intensidade da expressão de moléculas de CD63 pelos basófilos na amostra, em outras palavras, a abundância deste marcador na superfície dos basófilos. Sabendo que o aumento da expressão de CD63 na superfície dos basófilos está intimamente relacionado a liberação de grânulos de histamina (Schroeder, 2011)(36), através do MFI pode-se verificar a intensidade de desgranulação dos basófilos. Já a $\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+}$ mede qual a proporção dos

basófilos que apresentam moléculas de CD63 em sua superfície, independente da abundância da expressão em cada um deles.

Outro fato que merece destaque, advindo das análises de curvas ROC, diz respeito ao valor de corte. Esperar-se-ia que BATs positivos tivessem maiores valores de MFI, pois, na exposição dos basófilos ao AAS, estes deveriam desgranular, aumentando a expressão de moléculas de CD63 na superfície.

Todavia, em artigo recente, Chirumbolo (79) observou uma distribuição de padrão bimodal de MFIs mesmo após estimulação dos basófilos com a potente anti-IgE, refletindo subpopulações de basófilos com diferentes níveis de capacidade de ativação. Visto isso, ele questionou se o aumento da expressão de CD63 que não é acompanhado pelo aumento de MFI poderia refletir exaustão ou um pool limitado de CD63.

5.1.11 Perfil da Casuística – Etapa B

O perfil da casuística na etapa B foi muito semelhante ao encontrado na etapa A e já discutido: predomínio de mulheres, pacientes reatores a múltiplos AINEs, cujos sintomas mais frequentes foram os cutâneos.

No entanto, cabe mencionar o caso dos três pacientes que relataram somente reação ao AAS: não podemos afirmar que sejam reatores seletivos, pois para tanto, deveríamos testar um AINE de classe diferente do AAS. Dois deles nunca haviam usado dipirona ou diclofenaco, ao passo que o terceiro, fez uso destes medicamentos muito tempo antes da primeira reação de hipersensibilidade com AAS. Dessa forma, em relação a estes pacientes, não se pode concluir sobre o perfil de reatividade a AINEs, lembrando que o caso de reator seletivo a AAS nunca foi relatado em literatura.

Ademais, foram encontrados 13 pacientes que não haviam experimentado os quatro AINEs. Isso ocorre porque, geralmente, quando há

suspeitas de reação a AINEs, o paciente é orientado a não fazer mais uso deste grupo de medicamentos (30).

5.1.12 Resultados do BAT – Etapa B

Quando se analisa quantitativamente o desempenho dos pacientes que tiveram a última reação há menos de um ano e os que tiveram há mais de um ano, observamos diferença estatística em termos de MFI; em termos de sensibilidade, os pacientes com reação recente tiveram valor de 93,7% enquanto no geral, foi de 84,4%. Gamboa *et al.* (2004) (40), Carrapatoso *et al.* (2005)(68), Sanz *et al.* (2005) (46) e Ebo *et al.* (2006) (37) também constataram que os pacientes respondem melhor ao BAT com AINEs quando têm a última reação há menos de um ano e esta resposta é ainda melhor quando o intervalo é de um mês (46). Já Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41) não encontraram diferenças nas respostas dos BATs de pacientes que tiveram a última reação com AINEs em menos de um ano *versus* os que tiveram há mais tempo, mas eles creditam este fato ao pequeno tamanho amostral de pacientes que tiveram a reação há menos de um ano.

Como era de se esperar, de acordo com o critério de positividade estabelecido, os controles tiveram alta reatividade: 17 de 26 tiveram BAT positivo. Ainda, verificamos que há controles que parecem ativar os basófilos por conta da metodologia, não importando o estímulo usado. Foi o caso de dois controles que tiveram BAT positivo com AINEs e com leite de vaca, em experimentos executados por de Sousa (2012) (81), para compor sua monografia do Programa de Aprimoramento Profissional, sendo que estes dois controles relataram fazer uso de AINEs e consumir leite de vaca e seus derivados sem intercorrências. Outro trabalho que também encontrou resposta por parte dos controles foi o estudo europeu multicêntrico (78), que creditaram este fato ao mecanismo de ação dos AINEs, sendo comum tanto

para desencadear hipersensibilidade clínica quanto ativação de basófilos (não mediada por IgE), mas a diferença seria que controles responderiam às concentrações mais altas de AINEs, ao passo que os pacientes, às mais baixas.

Como já mencionado anteriormente, a alta positividade dos controles diminui a credibilidade do teste como ferramenta complementar na hipersensibilidade ao AAS.

Por outro lado, é importante ressaltar que, mesmo com o elevado índice de positividade dos controles, foram encontradas diferenças nas suas respostas, quando comparadas com as dos pacientes, em termos de média de intensidade de fluorescência (MFI).

5.1.13 Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo e Negativo – Etapa B

O melhor valor de sensibilidade e de valor preditivo negativo foi encontrado para etapa B baseado em MFI. O melhor valor de especificidade foi usando a metodologia na etapa B, com os critérios de positividade baseados em %CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ e SI, que também apresentou melhor valor preditivo positivo.

Comparando nossos resultados com a Tabela 13, verificamos que o valor de sensibilidade baseado em nosso critério de positividade, está melhor do que os da literatura, ao passo que a especificidade está aquém. O que já seria de se esperar, baseado em nosso ponto de corte estipulado. Por outro lado, quando analisamos os resultados da etapa B, com os critérios de positividade da literatura, encontramos valores semelhantes de sensibilidade e especificidade aos de outros trabalhos. Logo, possivelmente, o tampão de estimulação com IL-3 estaria “atrapalhando” os resultados dos controles, já que esta foi a única alteração metodológica entre as etapas A e B.

Baseados nos resultados até então encontrados em literatura, Gamboa *et al.* (2003) (61), Gamboa *et al.* (2004) (40), Rodríguez-Trabado *et al.* (2008) (41), de Weck *et al.* (2009) (10) e Wismol *et al.* (2010) (39) concluíram que o BAT pode ser uma boa ferramenta no diagnóstico de hipersensibilidade. Já Abuaf *et al.* (2012) (30) observaram que o BAT funciona melhor em pacientes com reações mais graves. Korosec *et al.* (82) viram outra restrição: BAT pode servir para pacientes reatores a múltiplos AINEs, contanto que eles não apresentem asma ou rinite como sintomas. Diante dos baixos valores de sensibilidade encontrados, Ebo *et al.* (2011) (71) consideram que o BAT não deve ser aplicado em pacientes com reações a múltiplos AINEs; este teste somente teria utilidade nos casos de reação seletiva, que são IgE mediados, onde os valores de sensibilidade são melhores (24).

Uma ressalva na comparação com a literatura é que cada trabalho utilizou uma metodologia distinta, desde o meio onde os basófilos estavam (sangue total, “buffy coat”, “plasma leukocyte”), tipo de estímulo (lisina aspirina, aspirina, ácido acetilsalicílico em pó), marcadores para basófilos (anti-IgE, CD203c, HLA-DR, CD123, CD45, CCR3), marcadores de ativação de basófilos (CD63, CD203c), até os critérios de positividade (%CD45⁺IgE^{+high}CD63⁺ e SI, CD63 index).

Todas estas questões indicam que ainda não há um consenso acerca da melhor metodologia do BAT para AINEs. Estão todos procurando por melhores valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As etapas de preparo das soluções e padronização das concentrações foram mais complexas do que esperávamos. De acordo com a realidade brasileira, tivemos que adaptar os estímulos, exigindo nossa criatividade e habilidade como pesquisadores. Se, por um lado, em relação aos grupos de pesquisa europeus, temos esta desvantagem, por outro lado, temos a vantagem de utilizar exatamente os mesmos medicamentos que a população utiliza, como os comprimidos de AAS, ou os princípios ativos adquiridos de farmácias de manipulação.

Cabe lembrar que a dificuldade de padronização é refletida na literatura, onde são vistos diferentes protocolos, tornando a comparação de dados entre os trabalhos bastante frágil.

A literatura já havia relatado casos de positividade dos controles, mas valores bem abaixo dos que encontramos em nosso trabalho.

Todavia, o foco em somente um AINE permitiu avaliarmos outras questões referentes a metodologia e, por conseguinte, a padronização. A análise dos dados, baseada em três parâmetros, revelou que a média de intensidade de fluorescência (MFI) mostrou-se o melhor deles, sendo este um achado inédito na literatura referente ao BAT com AINEs.

O tamanho amostral deste estudo foi maior do que os trabalhos anteriores de nosso grupo: 20 pacientes e 13 controles na etapa A e 33 pacientes e 26 controles na etapa B, permitindo visualizar diferenças nas respostas de pacientes e de controles, principalmente na etapa B. Outro ponto positivo foi a realização de curvas ROC; com estas análises, pudemos verificar um padrão oculto nos dados: os pacientes tendem a apresentar menores valores de MFI quando comparados com controles. Foi um resultado diferente do esperado, por isso, ainda sem explicação conhecida.

Tendo em mente que o BAT deve ser um teste complementar, não devendo ser aplicado na população em geral, ousamos optar por um valor de corte em que a sensibilidade seria privilegiada, para diminuir a necessidade de testes de provocação; já que um teste falso-positivo é

menos prejudicial ao paciente do que um falso-negativo. Com isso, obtivemos melhor valor de sensibilidade do que quando nos baseamos nos critérios de positividade mais usados na literatura ($\%CD45^{+}IgE^{+high}CD63^{+}>5$ e SI >2). Contudo obtivemos especificidade ainda abaixo do desejável, dificultando a escolha do uso do BAT na rotina médica.

7 CONCLUSÕES

1. A padronização e posterior validação do BAT com diclofenaco, dipirona e paracetamol não foi possível de ser realizada, por conta dos baixos valores de sensibilidade e/ou especificidade encontrados para cada um dos AINEs.

2. A concentração de AAS que apresentou os melhores resultados foi 0,15 mg/mL.

3. O melhor critério de positividade foi com a média da intensidade de fluorescência (MFI), estipulando o ponto de corte como MFI menor do que 6575 para BAT positivo.

4. Com esses parâmetros, foi encontrado valor de sensibilidade de 84,4%, especificidade de 34,6%, valor preditivo positivo de 61,4% e valor preditivo negativo de 64,3%. O BAT foi mais sensível em pacientes cuja última reação de hipersensibilidade ocorreu há menos de um ano: 93,7%

5.

6. Mesmo com a padronização focada no AAS, não foi possível padronizar e validar o BAT.

7. Todavia, apesar das dificuldades, este trabalho foi capaz de inovar em três aspectos no BAT com AINEs:

- Uso da aspirina como fonte do ácido acetilsalicílico testado, ao invés da lisina-aspirina;

- O melhor desempenho nos resultados baseados na média de intensidade de fluorescência, quando comparados com % CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ ou índice de estimulação.

- Ter como ponto de corte do BAT um valor baseado somente em MFI, sendo que os pacientes têm menores valores do que os controles.

Anexo A - Aprovação do projeto pela CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Clínica Médica

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU ad-referendum** em 21.12.11 a execução do subprojeto intitulado "**Validação do Teste de ativação de Basófilos no diagnóstico de reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais**", que será **dissertação de mestrado** da aluna **Denise Shimbo Misumi**, tendo como **orientadora** a **Dra. Cristina Maria Kokron**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0662/08**, intitulado "**Padronização do Teste de Ativação de Basófilos para Diagnóstico de Reações Adversas a Medicamentos**", aprovado por esta CAPPesq em 17.12.08.

CAPPesq, 21 de Dezembro de 2011.

Prof. Dr. Fabio Morato Castro
Vice Coordenador do Curso de Pós-Graduação
Área de Alergia e Imunopatologia
FMUSP

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:Nº.....APTO.....

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Validação do Teste de Ativação de Basófilos para Diagnóstico de Reações de Hipersensibilidade a Anti-Inflamatórios Não Esteroidais.**

2. PESQUISADOR : Cristina Maria Kokron

CARGO/FUNÇÃO: médica assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 49888

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Alergia e Imunologia Clínica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** **RISCO MÉDIO** ☐

RISCO BAIXO ☐ **RISCO MAIOR** ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária em estudo para o desenvolvimento de um teste laboratorial, ou seja, *in vitro*, a ser realizado numa amostra de sangue de pacientes que, como o(a) senhor(a), têm alergia quando recebem várias medicações. Normalmente, é difícil descobrir quais são os medicamentos responsáveis pela alergia, uma vez que o único teste diagnóstico confiável e disponível no Brasil é o teste de provocação. Este teste consiste em administrar o remédio suspeito e ver se a reação alérgica aparece, o que pode ser desagradável ou até mesmo arriscado para o paciente. Neste estudo, queremos desenvolver um teste para diagnóstico de alergia a medicamentos a ser feito no sangue, sem a necessidade do teste de provocação com a medicação suspeita e, portanto, sem risco de desencadeamento da reação alérgica. Estamos pedindo que você participe deste estudo que é novo no Brasil. A sua participação será responder a um questionário e doar um pouco de sangue (10 mL) no qual será realizado o teste no nosso laboratório, não envolvendo riscos de alergia.

2– Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

Colheremos 10 ml de sangue para fazer o teste de alergia ao remédio no sangue. O exame será feito em tubo de ensaio (*in vitro*) em nosso laboratório e o(a) senhor(a) não será exposto(a) à medicação suspeita (teste de provocação). Portanto, não haverá risco de desencadeamento da reação alérgica pelo medicamento como acontece durante o teste de provocação.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados –

Apesar de a coleta de sangue ser rotineira o exame a ser feito com o sangue colhido é novo.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Apenas aqueles relacionados à punção venosa (dor ao inserir a agulha e eventual hematoma).

5 – **Benefícios para o participante:** Padronizando este teste feito no sangue coletado, podemos facilitar a confirmação do diagnóstico de alergia a medicamentos sem causar os riscos que podem ocorrer com o teste convencional que é a provocação.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente possa optar: Não há.

7 – **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a *Dra. Cristina Kokron com ajuda do Dr. Antônio Abílio Mota* que podem ser encontrados no endereço

Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º andar bloco 4B Telefone(s) 3069-6098. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. **“Padronização do Teste de Ativação de Basófilos *in vitro* para Diagnóstico de Reações Adversas a Medicamentos”**.

Eu discuti com a Dra. **Cristina Maria Kokron** (ou Dr. Antônio Abílio Mota) sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo C - Questionário sobre histórico de uso e hipersensibilidade aos AINEs testados

Nome		
Data		
Data da última reação de hipersensibilidade		
Qual medicamento?		
Ácido Acetilsalicílico:	AAS, aspirina, Coristina D, Doril, Engov, Melhoral C, Sinutab, Sonrisal	
Já tomou?	SIM	NÃO
Teve algum sintoma?	SIM	NÃO
Quanto tempo depois de tomar o medicamento?		
Sintomas e localização	Urticária	
	Angioedema	
	Outros	
Diclofenaco:	Cataflam, Tandrilax, Flotac, Voltaren	
Já tomou?	SIM	NÃO
Teve algum sintoma?	SIM	NÃO
Quanto tempo depois de tomar o medicamento?		
Sintomas e localização	Urticária	
	Angioedema	
	Outros	
Dipirona:	Apracur, Benegrip, Lisador, Neosaldina, Novalgina	
Já tomou?	SIM	NÃO
Teve algum sintoma?	SIM	NÃO
Quanto tempo depois de tomar o medicamento?		
Sintomas e localização	Urticária	
	Angioedema	
	Outros	
Paracetamol:	Descon, Naldecon, Resfenol, Resprin, Sonridor, Tandrilax, Trimedal, Tylenol, Tylex	
Já tomou?	SIM	NÃO
Teve algum sintoma?	SIM	NÃO
Quanto tempo depois de tomar o medicamento?		
Sintomas e localização	Urticária	
	Angioedema	
	Outros	
Outras alergias		
Medicamentos em uso		

Anexo D - Composições dos reagentes usados no BAT

Solução de PBS 1x concentrada

Composto	Concentração
NaCl	95,2 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

Solução de lise de hemácias

Composto	Concentração
NaHCO ₃	20 mM
NH ₄ Cl	155,1 mM
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (EDTA)	0,7 mM

Tampão de estimulação com IL-3

Composto	Concentração
NaCl	133 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	7 mM
MgCl ₂	3,5 mM
Glucosa	1 g/ L
Hepes	20 mM
Albumina humana	1 g/ L
Interleucina-3	60 mg/ L
Heparina sódica	20 mL/ L

Solução de fixação

Composto	Concentração
HO(CH ₂ O)nH (paraformaldeído)	2,9 M

Anexo E - Tabela dos pontos de corte baseados em curvas ROC

Valor de corte	0,15 mg/mL		Valor de corte	2,50 mg/mL	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
< 3625	50,00	69,23	< 2736	51,52	73,08
< 3780	50,00	65,38	< 2803	51,52	69,23
< 3936	53,13	65,38	< 2898	51,52	65,38
< 4159	53,13	61,54	< 3032	54,55	65,38
< 4314	56,25	61,54	< 3114	57,58	65,38
< 4349	56,25	57,69	< 3132	60,61	65,38
< 4435	56,25	53,85	< 3154	63,64	65,38
< 4554	59,38	53,85	< 3194	66,67	65,38
< 4665	59,38	50,00	< 3310	66,67	61,54
< 4797	59,38	46,15	< 3444	66,67	57,69
< 4929	62,50	46,15	< 3555	66,67	53,85
< 4997	65,63	46,15	< 3651	69,70	53,85
< 5239	65,63	42,31	< 3770	69,70	50,00
< 5510	65,63	38,46	< 3894	69,70	46,15
< 5627	68,75	38,46	< 3966	72,73	46,15
< 5709	71,88	38,46	< 4120	72,73	42,31
< 5723	75,00	38,46	< 4348	72,73	38,46
< 5765	78,13	38,46	< 4530	75,76	38,46
< 5890	78,13	34,62	< 4622	78,79	38,46
< 6164	81,25	34,62	< 4926	78,79	34,62
< 6575	84,38	34,62	< 5298	81,82	34,62
< 6834	84,38	30,77	< 5520	81,82	30,77
< 7054	87,50	30,77	< 5817	84,85	30,77
< 8516	87,50	26,92	< 6101	84,85	26,92
< 10155	90,63	26,92	< 6234	87,88	26,92
< 10759	90,63	23,08	< 6279	87,88	23,08
< 11334	90,63	19,23	< 6509	90,91	23,08
< 11764	93,75	19,23	< 7137	90,91	19,23
< 11881	93,75	15,38	< 7591	90,91	15,38
< 11949	96,88	15,38	< 8032	93,94	15,38
< 12707	100,0	15,38	< 8646	96,97	15,38
< 13431	100,0	11,54	< 9008	96,97	11,54
< 15682	100,0	7,692	< 11058	96,97	7,692
< 24832	100,0	3,846	< 16048	96,97	3,846
			< 19207	96,97	0,0

Tabelas de pontos de corte baseados em sensibilidade e especificidade, para as concentrações de 0,15 mg/mL e 2,50 mg/mL. Somente estão apresentados os valores de cortes cujas sensibilidades são igual ou superior a 50%.

Legenda: <: menor

Anexo F - Resultados dos BATs dos pacientes na Etapa A

	FMO		Basal		Etanol		fMLP	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
PA1	0,2	3200,0	0,1	2928,0	/	/	10,0	13412,0
PA2	0,0	0,0	9,5	2744,0	/	/	35,9	7434,0
PA3	0,0	0,0	1,9	1564,0	/	/	56,7	19234,0
PA4	0,0	0,0	0,8	4099,0	/	/	12,1	15331,0
PA5	0,0	0,0	12,8	2017,0	/	/	46,5	16031,0
PA6	0,1	2071,0	3,2	4284,0	/	/	26,2	20775,0
PA7	0,0	0,0	6,6	3083,0	/	/	12,6	9435,0
PA7	0,2	1512,0	2,0	760,0	/	/	22,4	3523,0
PA8	0,1	372,0	2,9	354,0	/	/	15,3	1893,0
PA9	0,0	0,0	2,7	3195,0	/	/	44,6	10628,0
PA10	0,0	1010,0	0,4	1770,0	/	/	0,2	1064,0
PA11	0,1	5772,0	0,3	15094,0	0,3	20871,0	39,9	27491,0
PA12	0,0	8961,0	6,6	13683,0	6,0	18148,0	43,9	19867,0
PA13	0,0	3315,0	0,4	8234,0	/	/	1,8	10230,0
PA14	0,0	3970,0	0,2	15297,0	0,2	6475,0	6,0	16593,0
PA15	0,0	0,0	15,2	2244,0	1,4	2554,0	69,5	22364,0
PA16	0,0	582,0	33,7	2113,0	/	/	50,8	7755,0
PA17	0,0	2476,0	2,8	3291,0	3,3	3398,0	45,8	12295,0
PA18	0,0	3561,0	0,2	4830,0	8,0	18976,0	14,9	13969,0
PA19	0,0	0,0	5,3	4161,0	6,4	3879,0	28,7	8126,0
PA20	0,0	0,0	10,2	3216,0	2,8	3768,0	17,3	7621,0

Dados de FMO, Basal, Etanol, fMLP, baseados em %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ e média de intensidade de fluorescência (MFI). Nem todos os pacientes foram testados para todas as condições, pois conforme o desempenho no BAT, algumas foram excluídas e outras inseridas.

Legenda: %: %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, FMO: "fluorescence minus one", Etanol: controle negativo das condições com AAS, fMLP: Nformil-metionil-leucil-fenilalanina, /: condição não testada no BAT.

Anexo F – Resultados dos BATs dos pacientes na Etapa A (continuação)

Ácido acetilsalicílico - Pacientes																
	5,00 mg/mL		2,5 mg/mL		1,25 mg/mL		0,60 mg/mL		0,30 mg/mL		0,15 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
PA3	35,4	1707	37,8	1396	19,4	1345	13,1	1435	2,5	2359	5,4	2067	5,5	1857	3,3	2278
PA11	0,495	4717	4,9	5975	1,0	8030	0,5	10952	0,7	5695	0,6	6498	0,4	9788	0,5	4264
PA14	/	/	/	/	0,0	7369	0,2	7865	0,2	8101	/	/	/	/	/	/
PA15	1,86	2429	83,4	2699	35,7	2189	23,7	2086	/	/	/	/	/	/	/	/
PA17	/	/	22,2	3292	3,9	3625	0,8	4224	/	/	/	/	/	/	/	/
PA18	/	/	16,6	4021	2,8	4039	1,4	9024	/	/	/	/	/	/	/	/
PA19	/	/	/	/	51,7	6390	32,7	4836	14,0	4715	/	/	/	/	/	/
PA20	/	/	36,5	3651	11,8	3418	4,1	4106	/	/	3,9	4730	/	/	/	/
Diclofenaco injetável - Pacientes																
	1,25 mg/mL		0,60 mg/mL		0,30 mg/mL		0,15 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL		0,02 mg/mL		0,01 mg/mL	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
PA1	39,6	3889	3,9	3414	2,0	3580	0,8	4038	0,9	4473	0,5	6465	0,2	6989	0,7	4407
PA2	72,7	2591	45,0	2021	37,6	2034	25,5	2273	15,4	2613	13,0	2743	/	/	/	/
PA5	88,9	1890	83,2	1591	20,5	1407	9,1	2337	16,3	2418	18,8	2405	20,5	1969	5,7	2397
PA6	61,7	2332	34,9	2136	25,6	2150	3,2	2436	1,6	4253	3,4	3023	2,2	3390	1,6	3635
PA7	33,3	2341	55,3	2752	7,2	2435	2,3	2585	1,4	2708	5,6	2938	5,9	2697	5,1	2508
PA17	/	/	16,7	5263	3,3	4216	0,6	4487	/	/	/	/	/	/	/	/
PA18	/	/	13,0	3213	5,9	3857	2,2	5347	/	/	/	/	/	/	/	/
PA20	87,2	4856	10,8	3398	23,8	3405	18,9	3384	13,8	3049	5,4	4059	/	/	/	/

Anexo F – Resultados dos BATs dos pacientes na Etapa A (continuação)

Dipirona - Pacientes																
	5,00 mg/mL		2,50 mg/mL		1,25 mg/mL		0,60 mg/mL		0,30 mg/mL		0,15 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
PA2	12,4	2609	11,0	2200	13,2	2517	16,0	3008	18,3	2847	10,2	2499	10,3	3049	10,8	2556
PA3	1,5	2399	2,7	1897	3,2	2797	15,2	7672	5,4	2312	4,0	2319	3,9	2334	1,7	3056
PA4	1,5	5676	1,8	5512	1,0	6376	3,5	5768	1,1	4457	1,2	4548	1,9	4715	1,4	4072
PA5	3,3	1829	5,2	1862	10,8	1943	13,3	1790	14,2	2159	9,2	1930	5,9	2459	9,7	1701
PA6	1,7	3072	0,8	3468	1,2	4054	3,7	3216	4,7	2813	6,4	2555	3,1	2810	6,7	2524
PA7	2,0	536	3,4	509	5,3	544	7,3	465	1,6	513	3,2	609	5,2	532	/	/
PA8	2,1	385	3,4	407	2,2	375	1,7	429	2,5	711	1,6	644	1,5	432	/	/
PA9	1,4	2953	3,9	2443	3,6	2775	3,8	2968	4,2	2865	4,7	2825	2,6	2875	1,9	3530
PA11	0,4	12423	0,3	10950	1,0	7723	0,8	5708	0,4	6916	0,5	9502	0,6	8604	0,5	15950
PA12	4,3	12065	5,9	18554	7,1	17240	7,5	24876	7,3	16376	7,0	17302	8,0	14574	8,2	17517
PA13	/	/	/	/	0,8	7562	0,9	9218	0,7	8492	/	/	0,9	9392	0,5	7240
PA14	/	/	/	/	0,2	10153	/	/	0,1	12047	/	/	0,1	6245	0,1	2934
PA15	/	/	/	/	9,9	2350	16,0	2520	21,7	2338	14,0	2273	17,0	2326	/	/
PA16	/	/	/	/	16,4	1878	22,7	2002	20,1	2134	/	/	13,3	2075	14,8	2087
PA17	/	/	/	/	2,0	3509	0,8	3554	1,2	3748	1,9	3584	1,2	4284	/	/
PA18	/	/	/	/	0,6	5008	0,9	6676	1,0	6870	0,7	6268	0,7	6795	/	/
PA19	/	/	/	/	3,0	3412	/	/	3,5	3823	7,7	3605	0,8	2896	/	/

Anexo F – Resultados dos BATs dos pacientes na Etapa A (continuação)

	Paracetamol - Pacientes											
	2,50 mg/mL %	MFI	1,25 mg/mL %	MFI	0,60 mg/mL %	MFI	0,30 mg/mL %	MFI	0,15 mg/mL %	MFI	0,08 g/mL %	0,04 mg/mL %
PA4	0,6	6183	4,1	7389	3,8	16167	11,1	20602	15,7	18396	10,5	17316
PA8	2,1	376	2,0	328	2,3	442	2,0	429	3,1	395	2,3	474
PA10	0,2	889	0,1	557	0,1	1027	0,1	1227	0,3	743	0,2	1711
PA14	/	/	/	/	/	/	0,2	8873	0,3	5777	0,6	10147
PA15	4,7	2064	/	/	/	/	6,7	1960	9,6	2104	9,7	2042
PA17	10,1	4991	/	/	/	/	0,7	3154	1,5	3507	1,5	3399
PA18	/	/	/	/	/	/	2,3	3677	0,3	9827	1,0	7417
PA19	/	/	/	/	/	/	5,6	3859	2,5	4294	4,7	4717
PA20	5,3	3013	1,9	3818	5,7	3850	14,6	3226	3,3	4214	8,1	3503

Dados de ácido acetilsalicílico, diclofenaco, dipirona e paracetamol, baseados em %CD45⁺IgE⁺highCD63⁺ e média de intensidade de fluorescência (MFI). Nem todos os pacientes foram testados para todas as condições, pois conforme o desempenho no BAT, algumas foram excluídas e outras inseridas.

Legenda: %: %CD45⁺IgE⁺highCD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, /: condição não testada no BAT.

Anexo G - Resultados dos BATs dos controles na Etapa A

	FMO		Basal		Basal etanol		fMLP	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CA1	0,6	2140	4,6	2609	/	/	36,6	21747
CA2	0,0	2252	3,9	3470	/	/	53,8	13837
CA3	0,0	0	13,8	2676	/	/	51,2	19188
CA4	0,9	359	8,5	276	/	/	31,6	3255
CA5	0,2	2945	0,2	6807	/	/	4,8	27489
CA6	0,0	0	2,8	12914	/	/	59,5	28171
CA7	0,2	2576	0,9	8897	1,1	6979	53,2	25652
CA8	0,0	0	0,4	11743	/	/	7,3	15966
CA9	0,3	1920	2,6	3113	0,7	3699	76,5	18005
CA10	0,1	3680	0,3	1389	1,2	1741	4,0	8184
CA11	0,0	3561	0,2	4830	8,0	18976	14,8	13969
CA12	0,0	0	3,3	3428	0,4	3183	46,4	26108
CA13	0,0	881	0,3	1175	/	/	0,5	546

Dados de FMO, Basal, Etanol, fMLP, baseados em %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ e média de intensidade de fluorescência (MFI). Nem todos os controles foram testados para todas as condições, pois conforme o desempenho no BAT, algumas foram excluídas e outras inseridas. Legenda: %: %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, FMO: "fluorescence minus one", Etanol: controle negativo das condições com AAS, fMLP: Nformil-metionil-leucil-fenilalanina, /: condição não testada no BAT.

Anexo G - Resultados dos BATs dos controles na Etapa A (continuação)

	Ácido acetilsalicílico - Controles															
	5,00 mg/mL		2,50 mg/mL		1,25 mg/mL		0,60 mg/mL		0,30 mg/mL		0,15 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CA3	47,1	2918	66,0	3121	68,1	3187	56,3	2990	5 ^{21,}	2588	31,5	2665	15,7	2756	6,7	3172
CA7	1,1	8284	2,3	7168	1,4	8141	0,8	10041	0,9	11902	0,7	10166	0,8	13594	0,8	10922
CA10	/	/	30,0	1749	19,2	1680	0,6	2529	/	/	/	/	/	/	/	/
CA12	/	/	/	/	37,6	4326	17,1	3249	2,2	2891	/	/	/	/	/	/
CA9	2,3	4976	53,5	2131	4,0	2251	4,8	2104	/	/	/	/	/	/	/	/
CA11	/	/	16,6	4021	2,8	4039	1,4	9024	/	/	/	/	/	/	/	/
Diclofenaco - Controles																
CA2	1,25 mg/mL	0,60 mg/mL	0,30 mg/mL	0,15 mg/mL	0,08 mg/mL	0,04 mg/mL	0,02 mg/mL	0,01 mg/mL								
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CA6	25,6	2245	21,7	2129	17,3	3108	10,5	3216	13,1	5878	12,7	4724	/	/	/	/
	33,7	4366	10,8	4731	13,0	11441	5,8	18974	4,6	19798	3,4	20475	/	/	3,2	19232
CA10	/	/	57,5	4325	17,5	2857	3,2	1727	/	/	/	/	/	/	/	/
CA9	/	/	14,1	1857	29,6	2051	8,1	1995	/	/	/	/	/	/	/	/
CA1	95,7	3496	82,5	2622	35,0	2018	13,3	2262	13,4	2315	2,2	3026	6,2	2421	6,0	2267
CA5	78,2	4379	28,6	3446	8,9	3345	1,4	3499	0,8	4034	0,9	11844	1,0	7952	1,3	6571
CA11	/	/	13,1	3213	5,9	3857	2,2	5347	/	/	/	/	/	/	/	/

Anexo G - Resultados dos BATs dos controles na Etapa A (continuação)

Paracetamol - Controles														
	2,50 mg/mL		1,25 mg/mL		0,60 mg/mL		0,30 mg/mL		0,15 mg/mL		0,08 mg/mL		0,04 mg/mL	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CA3	3,9	3362	30,5	2598	48,6	3028	3,6	5097	62,0	3181	53,9	3263	7,2	3238
CA4	4,7	358	4,1	278	7,7	263	10,0	291	14,1	250	4,1	281	/	/
CA9	6,0	2294	/	/	/	/	3,2	2266	1,3	2383	6,4	1923	2,2	1939
CA10	16,8	1980	/	/	/	/	0,6	3457	0,6	2032	0,6	4779	0,9	1865
CA11	/	/	/	/	/	/	2,3	3677	0,3	9827	1,0	7417	0,4	5811
CA12	/	/	/	/	/	/	3,2	4129	8,1	7006	3,8	5570	5,1	4204
CA13	0,1	733	0,1	721	0,2	992	/	/	/	/	0,3	957	/	/

Dados de ácido acetilsalicílico, diclofenaco, dipirona e paracetamol, baseados em %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺ e média de intensidade de fluorescência (MFI). Nem todos os controles foram testados para todas as condições, pois conforme o desempenho no BAT, algumas foram excluídas e outras inseridas.

Legenda: %: %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, /: condição não testada no BAT.

Anexo H - Resultados dos BATs dos pacientes da etapa B

	Etanol		fMLP		2,50 mg/mL			1,25 mg/mL			0,60 mg/mL			0,15 mg/mL		
	%	MFI	%	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI
PB1	3,75	3409	26,10	7668	25,00	6,7	1686	18,10	4,8	2253	19,10	5,1	2125	13,90	3,7	2400
PB2	11,80	2910	25,50	6434	26,40	2,2	2967	17,30	1,5	3056	13,00	1,1	2988	10,80	0,9	2999
PB3	1,78	2033	53,70	11688	3,85	2,2	1379	4,93	2,8	2150	5,93	3,3	2245	3,02	1,7	2402
PB4	0,60	5166	16,60	8408	2,46	4,1	4466	2,40	4,0	4622	2,23	3,7	5964	3,15	5,3	6346
PB5	0,30	3560	33,90	11467	1,00	3,3	5645	1,10	3,7	8008	0,90	3,0	4417	1,20	4,0	5982
PB6	1,90	2754	6,90	5547	2,50	1,3	2696	2,70	1,4	2763	1,30	0,7	3282	2,20	1,2	3147
PB7	0,89	3040	7,18	11247	4,74	5,3	2180	1,42	1,6	4420	0,57	0,6	5631	1,27	1,4	5714
PB8	3,66	11870	56,70	75733	7,28	2,0	8440	3,30	0,9	14400	1,60	0,4	18615	2,20	0,6	11906
PB9	2,70	4488	26,60	17333	5,50	2,0	3097	4,20	1,6	4646	5,80	2,1	5012	4,90	1,8	6864
PB10	3,30	1747	52,60	5529	18,90	5,7	1465	17,50	5,3	2198	13,50	4,1	3364	14,20	4,3	3541
PB11	1,70	3391	24,60	8757	2,70	1,6	3133	1,50	0,9	3195	2,00	1,2	3424	2,40	1,4	3851
PB12	2,12	18586	26,90	37671	3,86	1,8	19268	3,64	1,7	20931	6,03	2,8	18417	/	/	/
PB13	5,63	2177	60,10	18637	12,90	2,3	1523	10,60	1,9	1848	17,80	3,2	1552	20,00	3,6	1872
PB14	3,60	3069	30,40	6964	2,70	0,8	3628	4,50	1,3	4203	3,60	1,0	4223	5,30	1,5	5549
PB15	2,18	1542	67,30	20766	5,25	2,4	1723	10,40	4,8	2310	5,06	2,3	2832	7,31	3,4	1515
PB16	3,10	1432	20,10	5009	6,00	1,9	1731	4,40	1,4	2149	4,00	1,3	2272	3,70	1,2	2587
PB17	0,61	7685	19,70	9684	0,98	1,6	1567	0,61	1,0	4090	0,67	1,1	3095	1,18	2,0	2672
PB18	4,62	2106	15,40	5010	16,90	3,7	1701	8,22	1,8	1981	6,44	1,4	2049	7,24	1,6	1998
PB19	0,80	6974	37,00	10014	1,79	2,2	3922	3,33	4,2	7285	4,06	5,1	7825	2,94	3,7	11671
PB20	0,87	4264	13,90	4539	10,90	12,5	1409	4,45	5,1	1442	3,03	3,5	2545	0,98	1,1	2325
PB21	2,28	2612	30,20	11510	1,57	0,7	2672	2,35	1,0	2243	2,31	1,0	4607	2,76	1,2	2449

Anexo H - Resultados dos BATs dos pacientes da etapa B (Continuação)

	Etanol		fMLP		2,50 mg/mL			1,25 mg/mL			0,60 mg/mL			0,15 mg/mL		
	%	MFI	%	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI
PB22	1,08	2302	63,20	14264	13,30	12,3	2018	4,33	4,0	2776	5,61	5,2	2416	5,32	4,9	3251
PB23	2,33	3001	18,70	5015	6,88	3,0	2518	7,77	3,3	1698	3,76	1,6	2998	15,50	6,7	2121
PB24	3,43	3527	74,90	18730	3,42	1,0	3174	4,40	1,3	3771	5,99	1,7	3952	4,51	1,3	4502
PB25	11,30	1548	41,50	8609	23,50	2,1	1439	12,10	1,1	1652	13,90	1,2	1648	9,60	0,8	2155
PB26	0,32	7019	23,60	13873	0,77	2,4	7623	0,83	2,6	8297	1,55	4,9	8849	1,64	5,2	9788
PB27	0,88	19404	13,00	15304	3,40	3,9	6304	2,84	3,2	8680	2,48	2,8	11214	2,39	2,7	11991
PB28	2,05	6142	30,80	12195	17,60	8,6	3130	11,70	5,7	3947	5,79	2,8	4908	11,70	5,7	4298
PB29	0,10	2416	6,16	7795	0,10	1,0	6214	0,70	7,0	5284	0,10	1,0	2638	0,30	3,0	4870
PB30	0,10	4255	1,36	9095	0,10	1,0	4594	0,20	2,0	9430	0,30	3,0	6827	0,30	3,0	5731
PB31	2,80	2815	43,00	24724	6,39	2,3	1190	3,30	1,2	2254	4,79	1,7	3202	2,90	1,0	3376
PB32	2,20	6143	5,23	8350	6,41	2,9	5201	3,90	1,8	5869	4,27	1,9	5173	2,50	1,1	5704
PB33	1,70	3006	20,7	11405	11,90	7,0	2640	3,10	1,8	4675	2,60	1,5	4103	2,90	1,7	4988

Dados da ampliação do tamanho amostral: BATs de Etanol, fMLP e concentrações de ácido acetilsalicílico, baseados em %CD45⁺IgE⁺h^{gh}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).
Legenda: Etanol: controle negativo para as condições com AAS, fMLP: Nformil-metoniil-leucil-fenilalanina, %: %CD45⁺IgE⁺h^{gh}CD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, /: condição não testada no BAT.

Anexo I - Resultados dos BATs dos controles da etapa B

	Etanol			fMLP			2,50 mg/mL			1,25 mg/mL			0,60 mg/mL			0,15 mg/mL		
	%	MFI	%	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI		
CB1	4,83	11115	16,60	53061	4,36	0,9	12951	2,19	0,5	12092	2,70	0,6	17869	4,74	1,0	17926		
CB2	3,40	5981	33,00	9827	12,20	3,6	4009	11,40	3,4	4592	9,70	2,9	4233	6,60	1,9	4606		
CB3	3,83	4580	31,30	19143	3,26	0,9	5395	2,91	0,8	7122	4,93	1,3	5221	2,71	0,7	5006		
CB4	0,98	2148	55,30	12887	0,60	0,6	3405	0,90	0,9	2541	0,70	0,7	3695	0,60	0,6	4368		
CB5	4,01	2026	3,02	4460	18,40	4,6	1775	15,70	3,9	1827	14,70	3,7	2074	2,76	0,7	2125		
CB6	0,63	3273	29,70	9264	2,16	3,4	3482	2,71	4,3	2960	2,54	4,1	2840	2,13	3,4	2231		
CB7	3,60	2718	52,20	12592	20,30	5,6	1971	10,20	2,8	2780	7,90	2,2	2928	11,20	3,1	2345		
CB8	0,39	14387	22,80	13070	0,75	1,9	6254	0,37	0,9	8376	0,69	1,8	7901	0,78	2,0	13423		
CB9	1,69	4224	3,64	7816	3,21	1,9	4230	1,70	1,0	7582	1,65	1,0	2825	1,98	1,2	3307		
CB10	1,62	3665	26,20	23072	0,83	0,5	5988	1,91	1,2	5983	1,82	1,1	7135	1,38	0,9	4724		
CB11	4,40	3886	53,20	14582	16,60	3,8	2776	9,00	2,0	3652	22,10	5,0	3368	19,00	4,3	3373		
CB12	1,40	4502	32,40	13674	3,70	2,6	1616	2,30	1,6	2561	4,90	3,5	5363	3,60	2,6	3708		
CB13	2,20	5226	62,20	23978	4,02	1,8	4650	5,08	2,3	6587	7,32	3,3	6163	4,98	2,3	6804		
CB14	1,10	1363	38,30	8390	1,30	1,2	1238	4,50	4,1	1650	1,20	1,1	1786	1,50	1,4	2136		
CB15	0,05	3276	52,60	20385	0,21	3,9	3674	1,67	30,8	9043	2,16	39,8	7866	0,89	16,3	10521		
CB16	0,47	11743	28,30	11353	2,92	6,2	6714	1,13	2,4	9995	2,64	5,6	9006	3,46	7,4	10996		
CB17	46,20	688	81,90	9669	81,20	1,8	1081	42,70	0,9	664	40,60	0,9	649	25,80	0,6	506		
CB18	0,40	18775	19,30	83894	0,50	1,3	19145	1,30	3,3	19552	0,60	1,5	20723	0,30	0,8	31738		
CB19	2,88	2845	57,60	21687	5,74	2,0	2213	2,27	0,8	2804	2,50	0,9	3599	5,04	1,8	4020		
CB20	3,40	6432	26,40	13484	11,00	3,2	3214,0	6,30	1,9	4934,0	4,01	1,2	5641,0	4,26	1,3	4329		

Anexo I - Resultados dos BATs dos controles da etapa B (Continuação)

	Etanol		fMLP		2,50 mg/mL			1,25 mg/mL			0,60 mg/mL			0,15 mg/mL		
	%	MFI	%	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI	%	SI	MFI
CB21	6,40	4293	29,70	9138	8,00	1,3	3865	7,00	1,1	4909	6,90	1,1	5107	11,40	1,8	5471
CB22	1,79	5586	7,28	6658	7,60	4,2	2829	2,60	1,5	3657	4,20	2,3	4050	2,00	1,1	5798
CB23	0,50	7429	19,50	18883	1,19	2,4	8852	1,82	3,7	11156	1,90	3,8	14431	1,79	3,6	13438
CB24	2,60	1709	14,90	2258	2,70	1,0	1294	3,80	1,5	1517	2,30	0,9	1912	1,90	0,7	1451
CB25	0,60	3264	27,40	11975	0,60	1,0	7559	0,70	1,2	5057	0,80	1,3	8181	1,00	1,7	7244
CB26	1,19	16869	56,80	20773	1,11	0,9	9164	2,91	2,4	11197	3,88	3,3	11780	4,11	3,5	11856

Dados da ampliação do tamanho amostral: BATs de Etanol, fMLP e concentrações de ácido acetilsalicílico, baseados em %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, índice de estimulação (SI) e média de intensidade de fluorescência (MFI).

Legenda: Etanol: controle negativo para as condições com AAS, fMLP: Nformil-metionil-leucil-fenilalanina, %: %CD45⁺IgE^{high}CD63⁺, MFI: média de intensidade de fluorescência, /.: condição não testada no BAT.

9 REFERÊNCIAS

1. Organization WH. Medicines: safety of medicines - adverse drug reactions 2008 [cited 2011 05/12/2011]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs293/en/index.html>.
2. Khan DA, Solensky R. Drug allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S126-U48.
3. Greenberger PA. Drug allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(2):S464-S70.
4. Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. *Med Clin North Am*. 2010;94(4):645-64, xv.
5. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813-24.
6. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564 p.
7. Chong Neto HJ, Rosario NA. Studying specific IgE: in vivo or in vitro. *Allergologia Et Immunopathologia*. 2009;37(1):31-5.
8. Demoly P, Pichler W, Pirmohamed M, Romano A. Important questions in Allergy: 1--drug allergy/hypersensitivity. *Allergy*. 2008;63(5):616-9.
9. Hilário M, Terreri M, Len C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *J Pediatr*. 2006:S206-12.
10. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Blanca M, Correia S, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Hypersensitivity Syndrome. A Multicenter Study I. Clinical Findings and In Vitro Diagnosis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2009;19(5):355-74.
11. Castro R, Crespo-Magalhães M, Aun M, Ribeiro M, Garro L, Kalil J, et al., editors. Perfil dos pacientes atendidos por reações adversas a drogas em ambulatório especializado. XXXIX Congresso Brasileiro de Alergia e ImunopatologiaXV Congresso Luso-Brasileiro de Alergia e Imunologia ClínicaIII Congresso Nacional de Asma - CONASMA 2012I Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias 2012; Casa Grande HotelGuarujá - SP: Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
12. Sanchez-Borges M. NSAID Hypersensitivity (Respiratory, Cutaneous, and Generalized Anaphylactic Symptoms). *Medical Clinics of North America*. 2010;94(4):853-+.
13. Szczelik A, Nizankowska-Mogilnicka E, Sanak M. Hypersensitivity to aspirin and non-steroidal antiinflammatory drugs. In: Adkinson N, Holgate S, Simons F, Busse W, Bochner B, Lemanske R, editors. *Middleton's allergy Principles and practice*. 7th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2009. p. 1227-43.
14. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998;38:97-120.
15. Viola M, Quarantino D, Gaeta F, Caruso C, Valluzzi R, Romano A. Etoricoxib tolerability in patients with hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2007;143(2):103-8.
16. Isik SR, Karakaya G, Celikel S, Demir AU, Kalyoncu AF. Association between Asthma, Rhinitis and NSAID Hypersensitivity in Chronic Urticaria Patients and Prevalence Rates. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2009;150(3):299-306.
17. Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, Bavbek S, Bochenek G, Bousquet J, et al. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) - classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA and GA2LEN/HANNA. *Allergy*. 2011;66(7):818-29.

18. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118(4):773-86.
19. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawskamysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *British Medical Journal*. 1975;1(5949):67-9.
20. Palikhe NS, Kim J-H, Park H-S. Update on Recent Advances in the Management of Aspirin Exacerbated Respiratory Disease. *Yonsei Medical Journal*. 2009;50(6):744-50.
21. Kim SH, Park HS. Genetic markers for differentiating aspirin-hypersensitivity. *Yonsei Medical Journal*. 2006;47(1):15-21.
22. Mastalerz L, Setkowicz M, Sanak M, Szczeklik A. Hypersensitivity to aspirin: Common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(4):771-5.
23. Downing A, Jacobsen J, Sorensen HT, McLaughlin JK, Johnsen SP. Risk of hospitalization for angio-oedema among users of newer COX-2 selective inhibitors and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2006;62(4):496-501.
24. Gomez E, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G, et al. Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009;39(8):1217-24.
25. Rerkpattanapipat T, Chiriac A-M, Demoly P. Drug provocation tests in hypersensitivity drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2011;11(4):299-304.
26. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy*. 2003;58(9):854-63.
27. Aun MV, Bisaccioni C, Garro LS, Rodrigues AT, Tanno LK, Ensina LF, et al. Outcomes and safety of drug provocation tests. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32(4):301-6.
28. Hermes B, Hein UR, Henz BM. Assessment of psychological aspects during systemic provocation tests in patients with pseudoallergic drug reactions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2006;20(7):800-3.
29. Ensina L, Tanno L, de Oliveira A, Kalil J, Motta A. Teste de provocação em indivíduos com hipersensibilidade aos anti-inflamatórios não esteroidais - Proposta de uma Abordagem prática. *Rev bras alerg imunopatol*. 2008;60-3.
30. Abuaf N, Rostane H, Barbara J, Toly-Ndour C, Gaouar H, Mathelier-Fusade P, et al. Comparison of CD63 Upregulation Induced by NSAIDs on Basophils and Monocytes in Patients with NSAID Hypersensitivity. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:580873.
31. Romano A, Torres MJ, Castells M, Sanz ML, Blanca M. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3 Suppl):S67-73.
32. Mayorga C, Sanz ML, Gamboa PM, Garcia BE, Spanish Soc Allergology C. In Vitro Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Drugs: An Update. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2010;20(2):103-9.
33. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(6):814-20.
34. Sullivan BM, Locksley RM. Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity. *Immunity*. 2009;30(1):12-20.
35. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*. 2000;96(13):4028-38.
36. Schroeder JT. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunol Rev*. 2011;242(1):144-60.

37. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, et al. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy*. 2006;61(9):1028-39.
38. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: More potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2008;18(3):143-55.
39. Wismol P, Putivoranat P, Buranapraditkun S, Pinnobphun P, Ruxrungtham K, Klaewsongkram J. The values of nasal provocation test and basophil activation test in the different patterns of ASA/NSAID hypersensitivity. *Allergol Immunopathol*. 2011.
40. Gamboa P, Sanz ML, Caballero MR, Urrutia I, Antepara I, Esparza R, et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAID hypersensitivity syndrome. *Clinical and Experimental Allergy*. 2004;34(9):1448-57.
41. Rodriguez-Trabado A, Camara-Hijon C, Ramos-Cantarino A, Porcel-Carreño SL, Jimenez-Timon S, Pereira-Navarro G, et al. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2008;29(3):241-9.
42. Korosec P, Mavsar N, Bajrovic N, Silar M, Mrhar A, Kosnik M. Basophil Responsiveness and Clinical Picture of Acetylsalicylic Acid Intolerance. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2011;155(3):257-62.
43. Hausmann OV, Gentinetta T, Fux M, Ducrest S, Pichler WJ, Dahinden CA. Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. *Allergy*. 2011;66(1):85-91.
44. Sanz ML, Gamboa PM, Antepara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Aviles C, et al. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clinical and Experimental Allergy*. 2002;32(2):277-86.
45. Sanz ML, Gamboa PM, Mayorga C. Basophil activation tests in the evaluation of immediate drug hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2009;9(4):298-304.
46. Sanz ML, Gamboa P, de Weck AL. A new combined test with flowcytometric basophil activation and determination of sulfidoleukotrienes is useful for in vitro diagnosis of hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2005;136(1):58-72.
47. de Weck AL, Gamboa PM, Esparza R, Sanz ML. Hypersensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12:3347-58.
48. Celik GE, Schroeder JT, Hamilton RG, Saini SS, Adkinson NF. Effect of in vitro aspirin stimulation on basophils in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009;39(10):1522-31.
49. Pedreschi M. Padronização do Teste de Ativação de Basófilos para diagnóstico de reações adversas a medicamentos [monografia]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
50. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: Potentials, pitfalls and perspectives. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2006;141(1):79-90.

51. Misumi D. Padronização do Teste de Ativação de Basófilos no diagnóstico de reações de hipersensibilidade a anti-inflamatórios não esteroidais [monografia]: Universidade de São Paulo; 2009.
52. Maia G. Contribuição ao Estudo Termodinâmico das Soluções de Ácido Acetilsalicílico [tese]. São Carlos, SP, Brasil: Universidade Federal de São Carlos; 2007.
53. Souza R. Análise quantitativa de diclofenaco em preparações farmacêuticas [dissertação]. Campinas, SP, Brasil: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
54. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*. 2001;45(3):194-205.
55. Sanz ML, Sanchez G, Gamboa PM, Vila L, Uasuf C, Chazot M, et al. Allergen-induced basophil activation: CD63 cell expression detected by flow cytometry in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Lolium perenne*. *Clinical and Experimental Allergy*. 2001;31(7):1007-13.
56. Malbran A, Yeyati E, Rey GL, Galassi N. Diclofenac induces basophil degranulation without increasing CD63 expression in sensitive patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 2007;147(1):99-105.
57. Monneret G, Gutowski MC, Bienvenu J. Detection of allergen-induced basophil activation by expression of CD63 antigen using a tricolour flow cytometric method. *Clinical and Experimental Immunology*. 1999;115(3):393-6.
58. Aliu O, Chung KC. Assessing Strength of Evidence in Diagnostic Tests. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012;129(6):989-98.
59. Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The Basophil Activation Test in Immediate-Type Drug Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2009;29(3):555-+.
60. Bühlmann. Diclofenac. Available from: http://www.buhlmannlabs.ch/files/documents/core/CellularAllergy/AllergenDataSheets/0902analgesics/ADS014E_C52.pdf.
61. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antepara I, Urrutia I, Jauregui I, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy*. 2003;58(4):312-7.
62. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Brasília, DF, Brasil 2010.
63. Bittar R, Aun M, Ribeiro M, Garro L, Kalil J, Giavina-Bianchi P, et al., editors. Hipersensibilidade ao paracetamol: mito ou realidade? XXXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia XV Congresso Luso-Brasileiro de Alergia e Imunologia Clínica III Congresso Nacional de Asma - CONASMA 2012 I Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias 2012; Casa Grande Hotel Guarujá- SP - Brazil Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
64. Borges MS, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Pérez CR. Tolerability to new COX-2 inhibitors in NSAID-sensitive patients with cutaneous reactions. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2001;87(3):201-4.
65. Magalhães M, Castro R, Aun M, Garro L, Ribeiro M, Kalil J, et al., editors. Perfil dos pacientes com reação adversa a anti-inflamatórios não esteroidais avaliados em ambulatório especializado. XXXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia XV Congresso Luso-Brasileiro de Alergia e Imunologia Clínica III Congresso Nacional de Asma - CONASMA 2012 I Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias 2012; Casa Grande Hotel Guarujá - SP Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
66. Melo J, Menezes U, Barroso P, Franco C, Cordeiro D, Sousa J, et al. Aspectos clínicos de pacientes com hipersensibilidade a AINEs atendidos no Ambulatório de Alergia a Fármacos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

- XXXIX Congresso Brasileiro de Alergia e ImunopatologiaXV Congresso Luso-Brasileiro de Alergia e Imunologia ClínicaIII Congresso Nacional de Asma - CONASMA 2012I Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias Casa Grande HotelGuarujá Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia; 2012.
67. ANVISA. Voltaren: diclofenaco sódico [bula de remédio]. 2009.
 68. Carrapatoso I, Cadinha S, Sanz M. Aplicação do teste de activação dos basófilos no estudo de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos. *Rev Port Imunoalergologia*. 2005;13(2):153-64.
 69. Faria E. Diagnóstico de Alergia a Drogas: atualização. *Rev bras alerg imunopatol*. 2008;133-8.
 70. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(5):913-21.
 71. Ebo DG, Leysen J, Mayorga C, Rozieres A, Knol EF, Terreehorst I. The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives. *Allergy*. 2011;66(10):1275-86.
 72. Gamboa PM, Garcia-Aviles MC, Urrutia I, Antepara I, Esparza R, Sanz ML. Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to betalactam antibiotics and negative skin tests. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2004;14(4):278-83.
 73. Stevenson DD. Aspirin and NSAID sensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24(3):491-505, vii.
 74. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clinical and Experimental Allergy*. 2004;34(3):332-9.
 75. Yamaguchi M, Koketsu R, Suzukawa M, Kawakami A, Ikura M. Human Basophils and Cytokines/ Chemokines. *Allergology International*. 2009;58(1):1-10.
 76. Ebo DG, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, De Clerck LS, Stevens WJ. Basophil activation test by flow cytometry: Present and future applications in allergology. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*. 2008;74B(4):201-10.
 77. Sanz ML, Garcia MC, Caballero MR, Diéguez I, Gamboa PM. Test de activación de basófilos en el diagnóstico de alergia a medicamentos. *An sis sant Navar*. 2003;26(Supl.2):39-47.
 78. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Jermann JM, Kowalski M, Medrala W, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Hypersensitivity Syndrome: A Multicenter Study II. Basophil Activation by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Its Impact on Pathogenesis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2010;20(1):39-57.
 79. Komori O, Eguchi S. A boosting method for maximizing the partial area under the ROC curve. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:314.
 80. Chirumbolo S. Monitoring of CD63% in basophil activation test and suggested new parameters for allergy diagnosis. *Inflamm Res*. 2012;61(2):171-6.
 81. de Sousa LB. Padronização do teste de ativação de basófilos no diagnóstico de alergia alimentar às proteínas do leite de vaca.: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.
 82. Korosec P, Silar M, Mavser N, Bajrovic N, Kosnik M. Basophil activation test and clinical picture of the acetylsalicylic acid intolerance. *Allergy*. 2009;64:85.